

**Principais Diferenças Entre Ácido  
Nítrico, EDTA, ETDA na  
Descalcificação de Medula Ossea,  
Dentes, Ossos longos.**

**Dimitrius Leonardo Pitol PhD**

**FORP/USP**

Pesquisador(a)

## Dimitrius Leonardo Pitol

Endereço para acessar este espelho: [dgp.cnpq.br/dgp/espelhorh/1706427209620213](http://dgp.cnpq.br/dgp/espelhorh/1706427209620213)

### Dados Gerais

Grupos de pesquisa

Linhas de pesquisa

Estudantes orientados

Egresso

Indicadores de produção

### Dados Gerais

**Nome em citações bibliográficas:** PITOL, Dimitrius Leonardo; PITOL, D; PITO,D.L.; PITOL, D.L

**Titulação:** Doutorado

**Áreas de atuação:** • Morfologia

**Bolsista CNPq:**

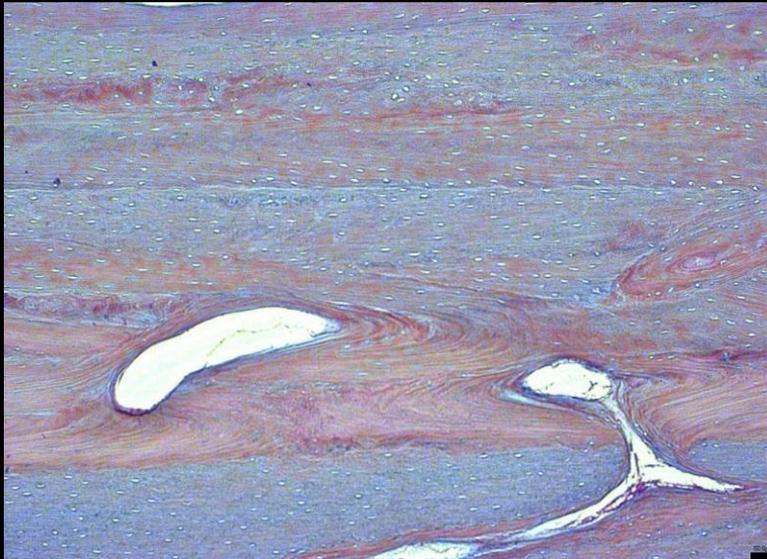
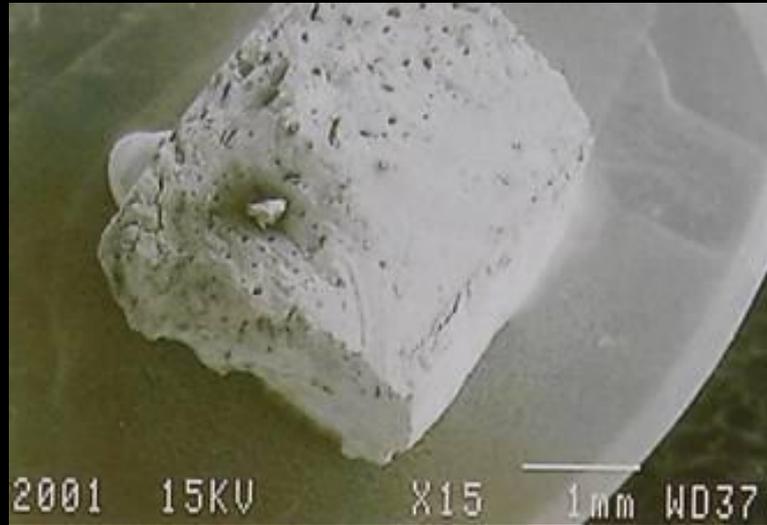
**Última atualização do Currículo Lattes:** 22/09/2015

### Grupos de pesquisa em que atua

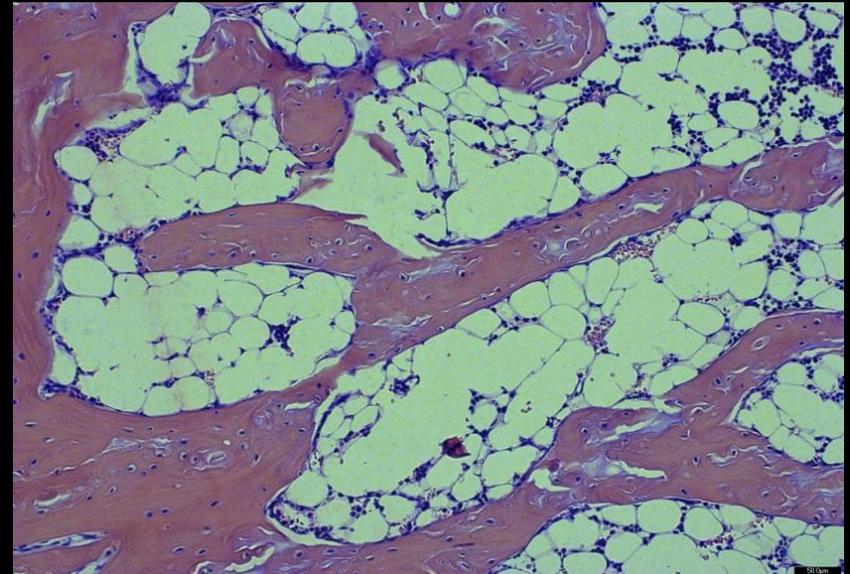
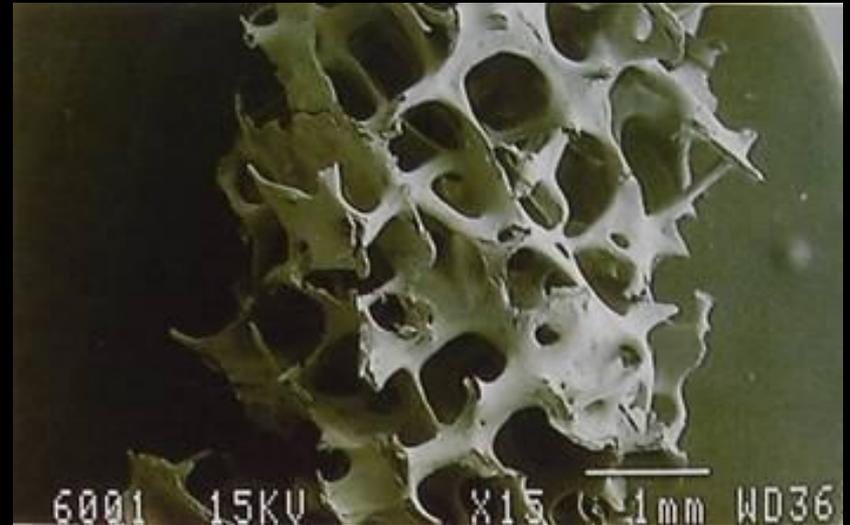
Nome do grupo	Instituição	Perfil	Ações
Modelos experimentais para estudo do reparo ósseo	USP	Pesquisador	
Núcleo Multidisciplinar de Pesquisa em Tecido Ósseo - NMPTO	USP	Pesquisador	
Grupo de Estudos Avançados em Toxicologia	UFOB	Pesquisador	



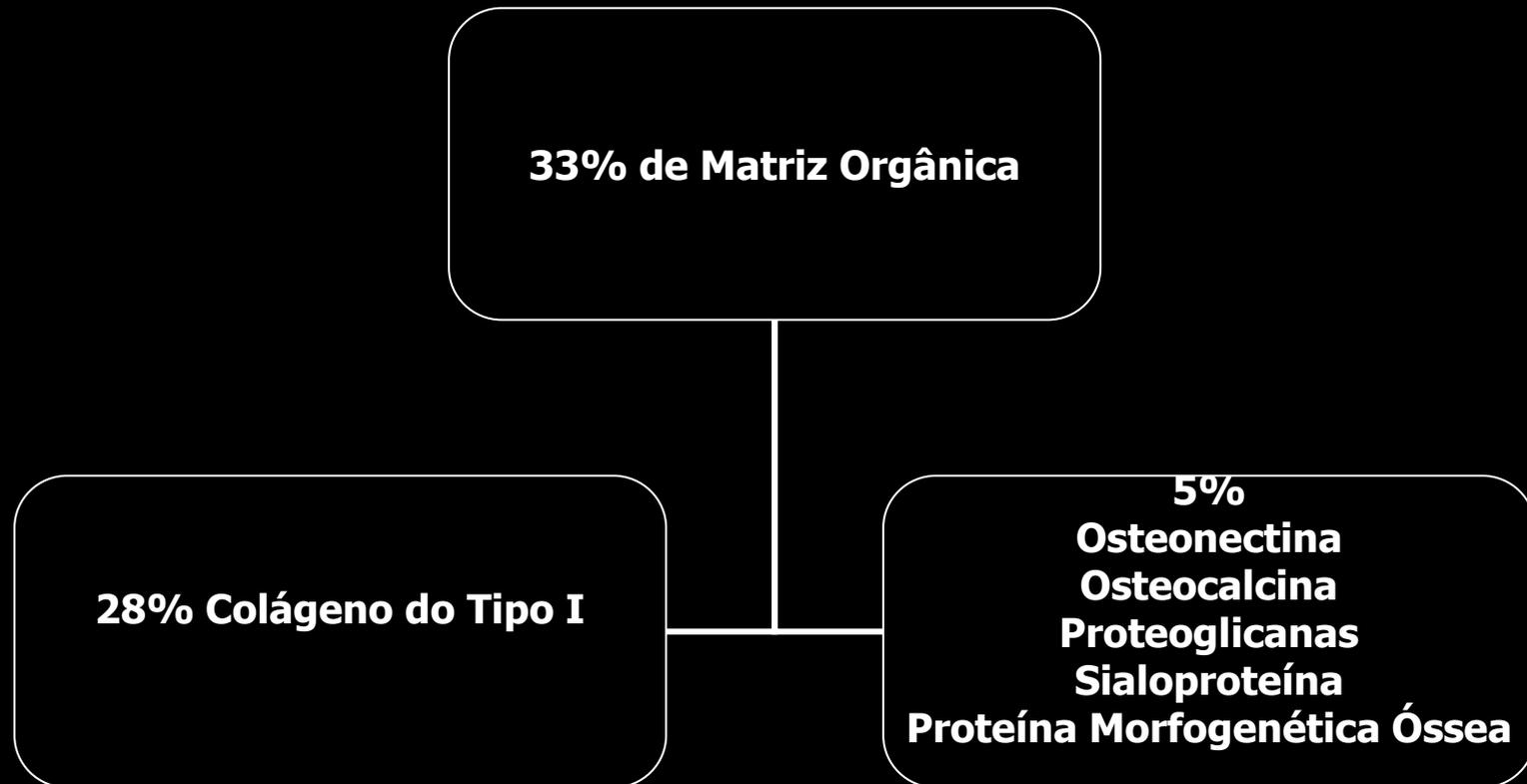
**Osso Cortical**



**Osso trabecular**



# Tecido Mineralizado

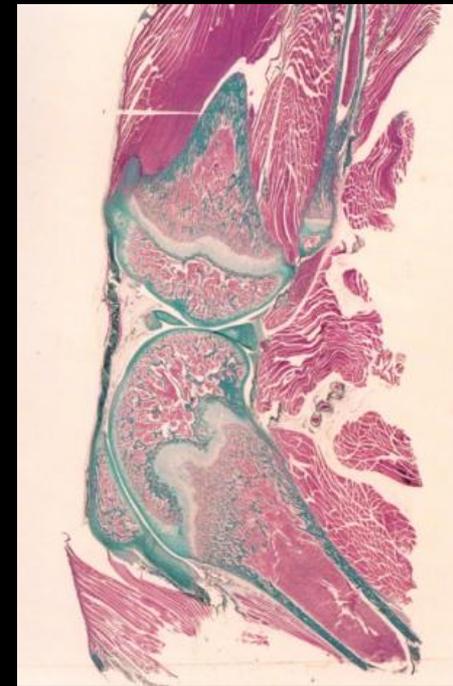


# • **Matriz inorgânica**

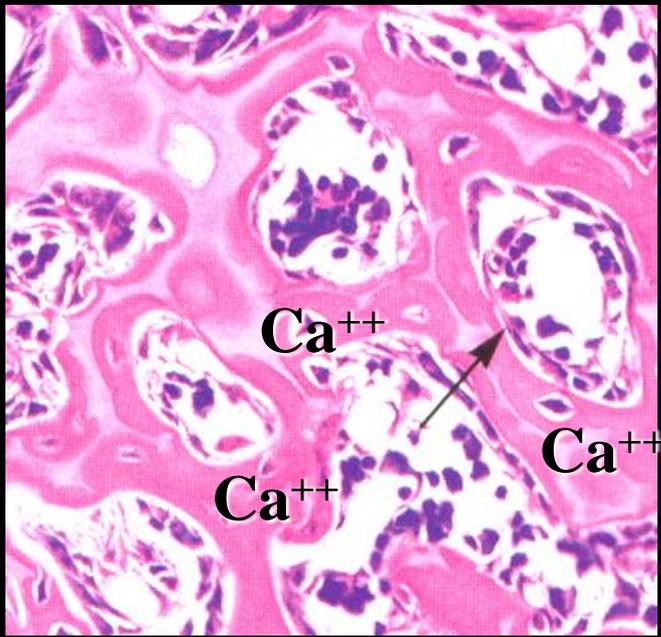
- Cálcio
- Fosfato
- Magnésio
- Potássio
- Sódio
- Citrato

# Métodos de descalcificação

- Soluções ácidas diluídas.
- Soluções quelantes.
- Misturas de soluções ácidas + soluções quelantes.



# Mecanismo de ação dos agentes descalcificadores



Solução descalcificadora

Ácido (H<sup>+</sup>)



H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (ácido fosfórico) + cloreto de cálcio + água

# Tempo para a troca do descalcificador

Table II: Decalcification tissue by EDTA

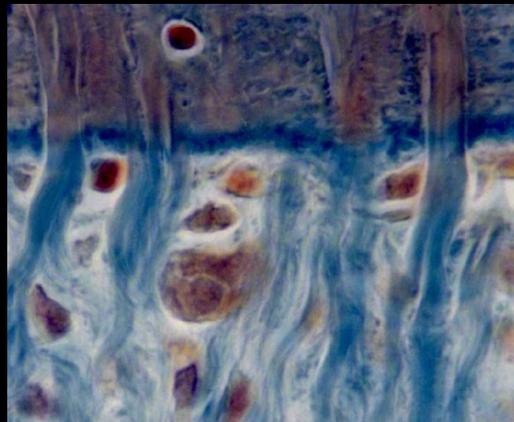
TIME	EDTA-IMMERSION [Ca <sup>2+</sup> ], ppm	EDTA- MICROWAVE [Ca <sup>2+</sup> ], ppm
6 hours	.....	142.3
2 days	.....	2425.8
3 days	.....	948.8
5 days	5.9	385.7
15 days	5.1	77.3
35 days	2373.3	12.3
65 days	4113.0	.....
110 days	125.5	.....
150 days	37.3	.....

Table I: Decalcification tissue by HNO<sub>3</sub>

TIME	HNO <sub>3</sub> - IMMERSION [Ca <sup>2+</sup> ], ppm	HNO <sub>3</sub> - MICROWAVE [Ca <sup>2+</sup> ], ppm
6 hours	.....	1242.3
2 days	.....	2425.8
3 days	.....	948.7
5 days	6.5	385.7
15 days	20.3	43.4
35 days	4953.8	.....
65 days	433.1	.....

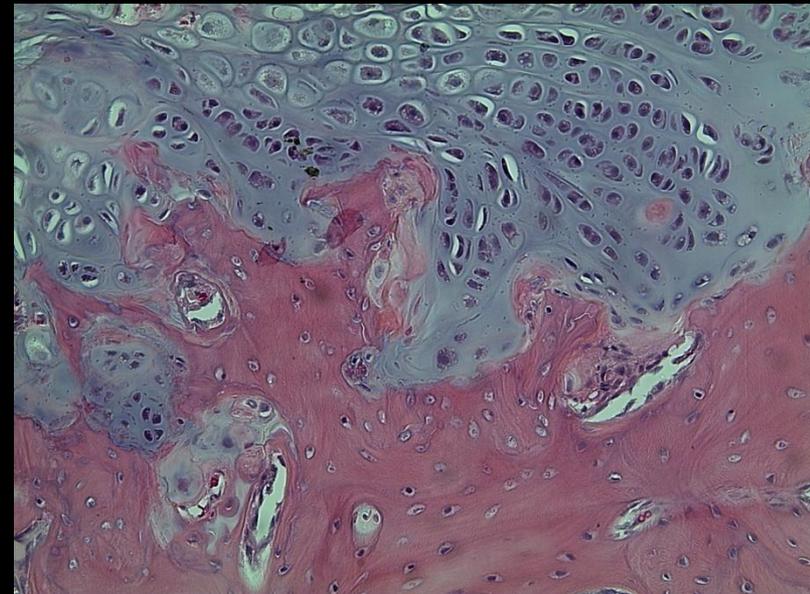
# Descalcificadores mais utilizados

- Acido nítrico 5%.
- Acido fórmico + citrato de sódio.
- EDTA (ácido etileno-diamino-tetracético).
- ETDA (tartarato de sódio e potássio, tartarato de sódio Hcl).

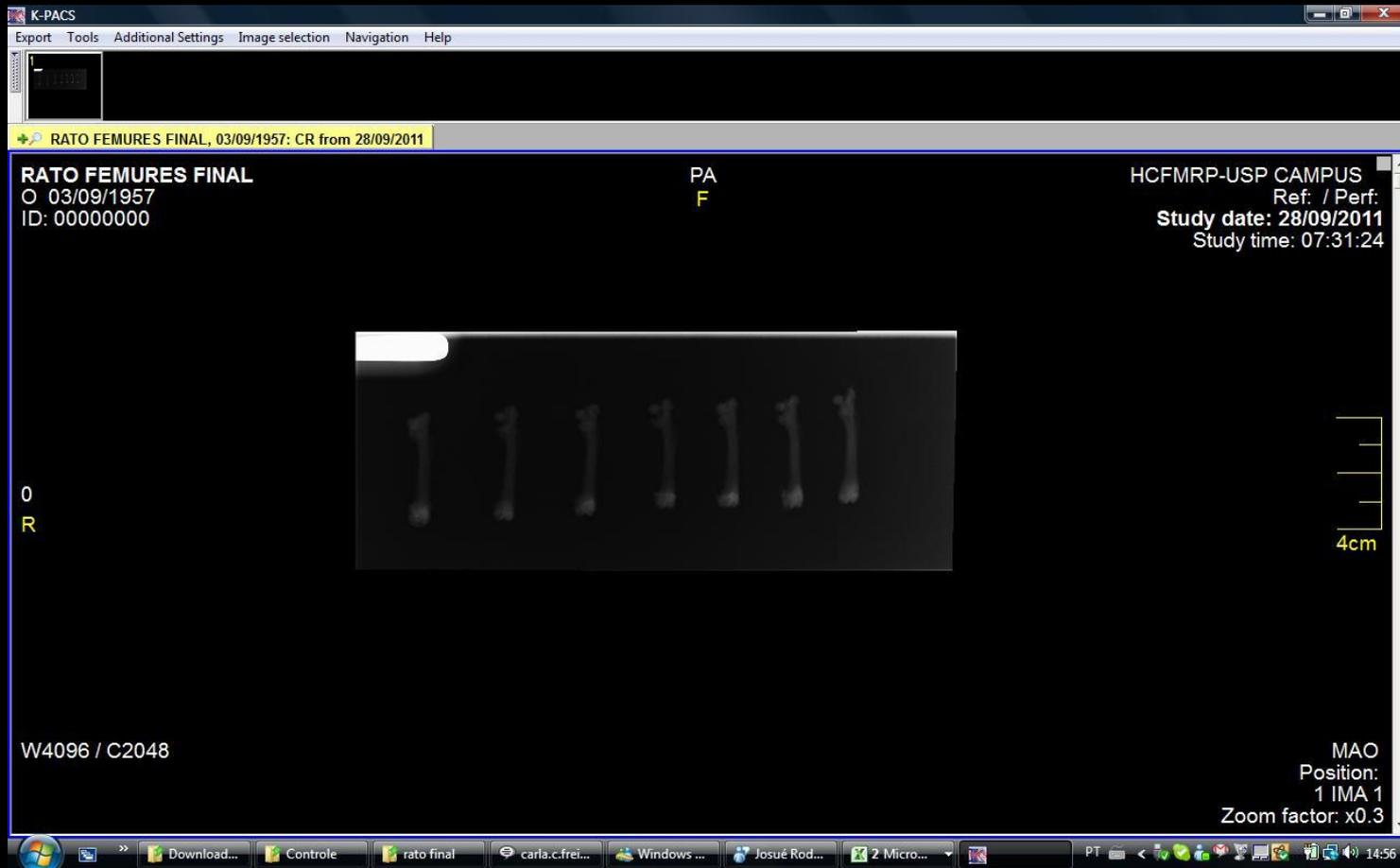


# ETDA

- EDTA. 0,7g
- Tartarato de sódio e potássio. 8g
- Tartarato de sódio. 0.14g
- Hcl. 120ml
- H<sub>2</sub>O destilada. 900ml

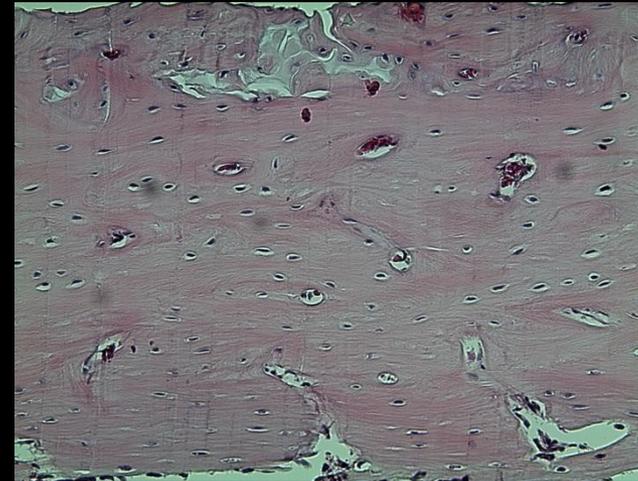
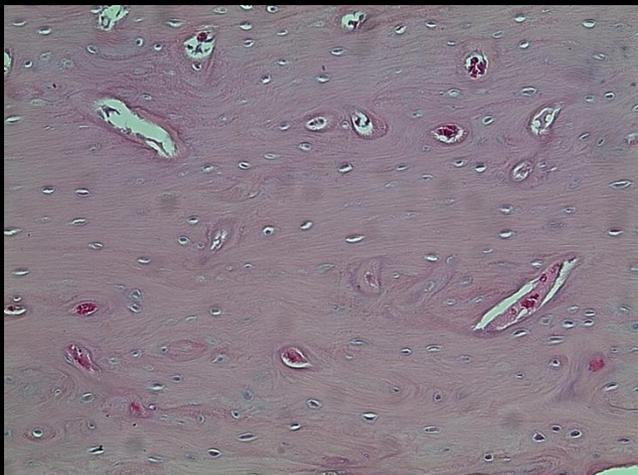
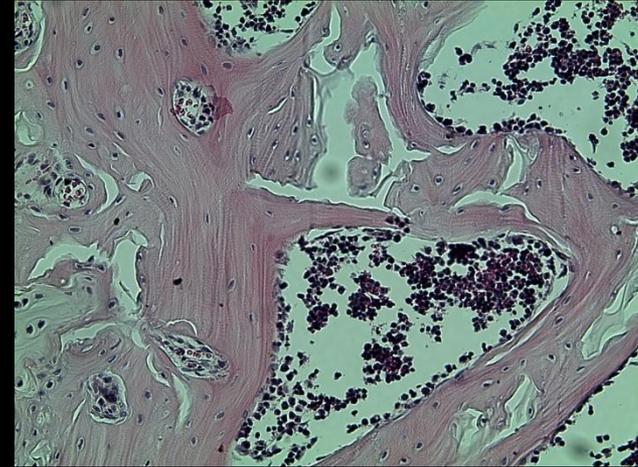
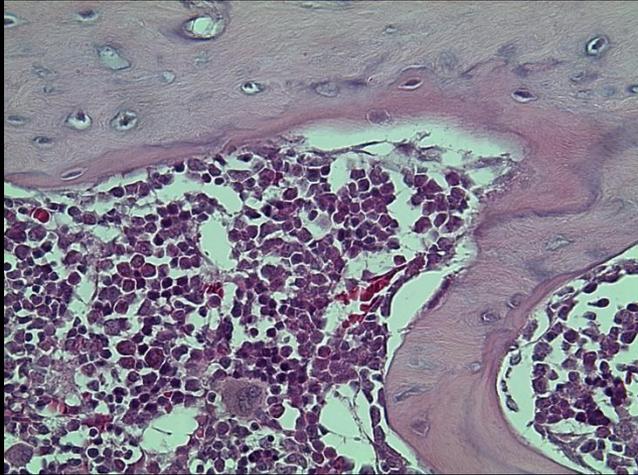


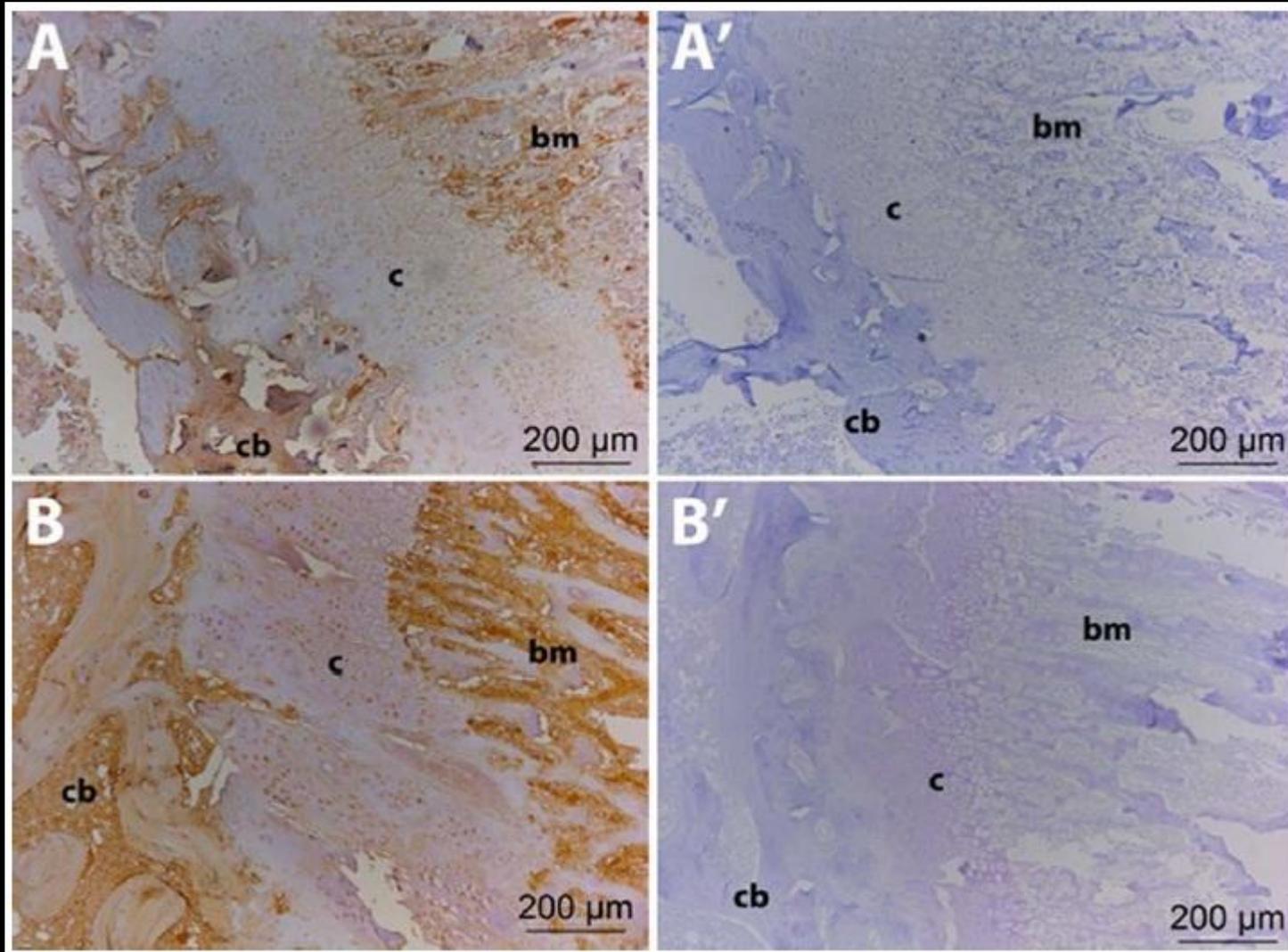
# FÊMUR ETDA DESCALCIFICADO EM 24 HORAS



**ETDA**

**EDTA**





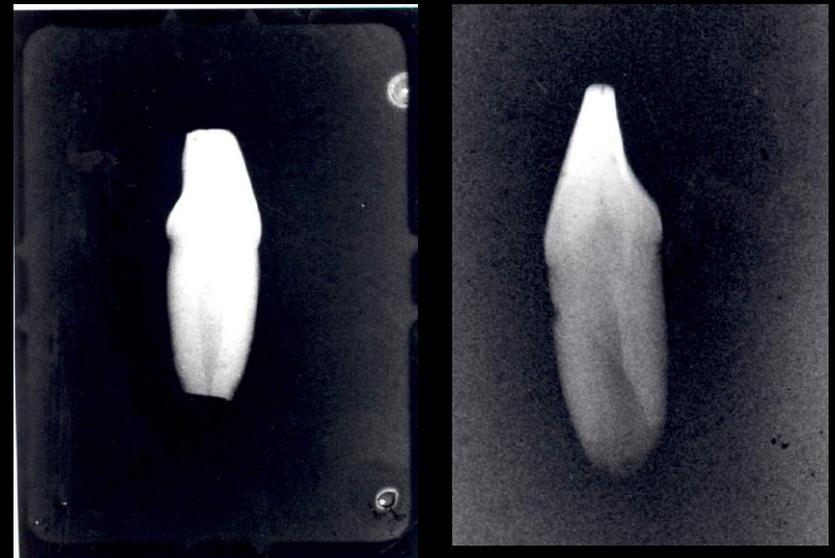
# Cuidados com a descalcificação

- Material bem fixado.
- Concentração.
- Volume do descalcificador.
- Trocas constantes.
- Ponto Ideal.
- Neutralizar o descalcificador.

**Como saber o ponto ideal da  
descalcificação ?**

# Métodos mais utilizados

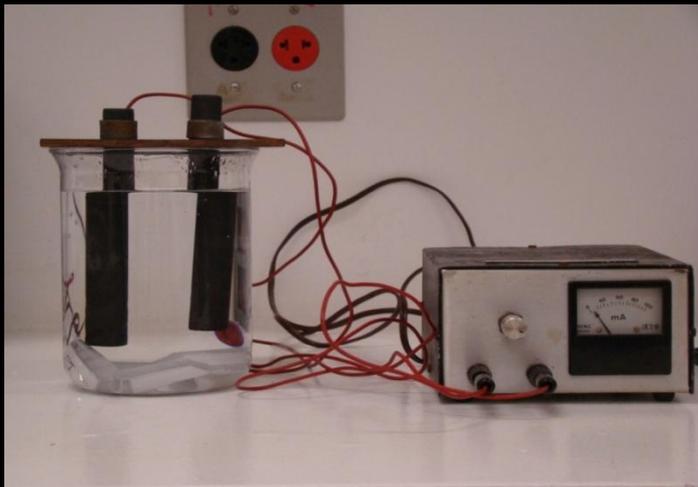
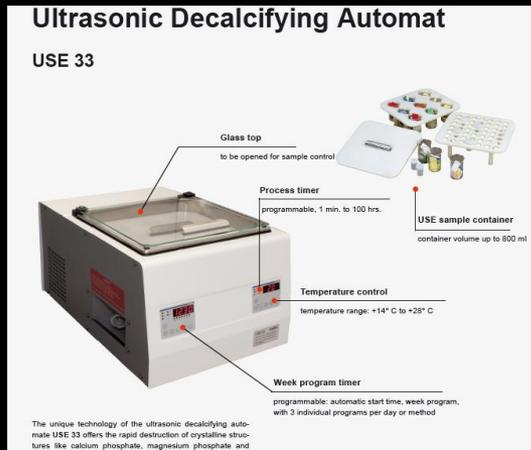
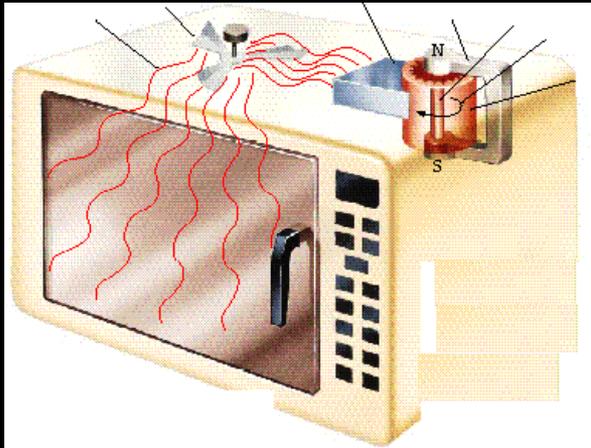
- Método radiográfico.
- Flexibilidade do tecido.
- Utilização de alfinete.
- Método quantitativo.



# Método Quantitativo

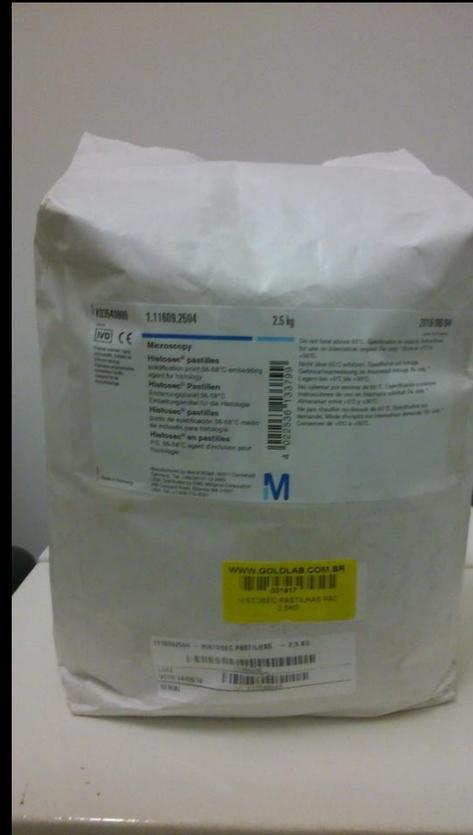
- Pegar 5ml de Descalcificador do fundo do Frasco.
- Acrescentar 1 ml de Amônia concentrada (Misturar).
- Acrescentar 0,1ml de Oxalato de amônia.
- Deixar por 10 minutos para verificar a presença de cálcio.
- Se não formar precipitado acrescentar mais 0,1ml , com intervalo de 10 minutos.
- Até no Máximo 0,6 ml .
- Se não formar precipitado o tecido e considerado descalcificado.

# Métodos para acelerar as descalcificação



# Métodos de inclusão

- Parafina (Histosec Merck)
- Histoiresina ( Leica Histoiresin)



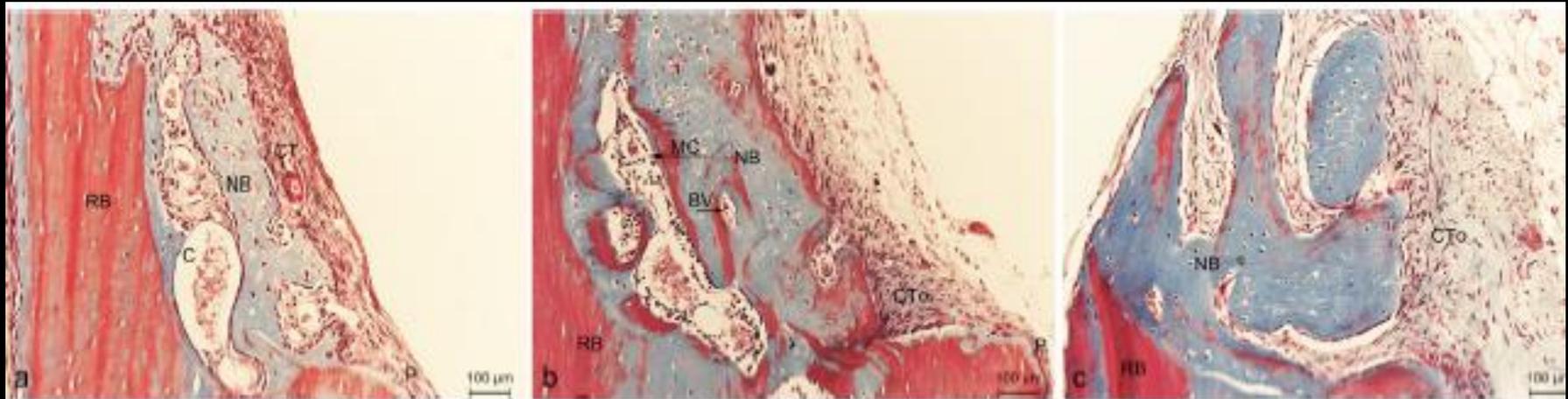
Lasers Med Sci (2015) 30:1599–1607

DOI 10.1007/s10103-015-1773-y

ORIGINAL ARTICLE

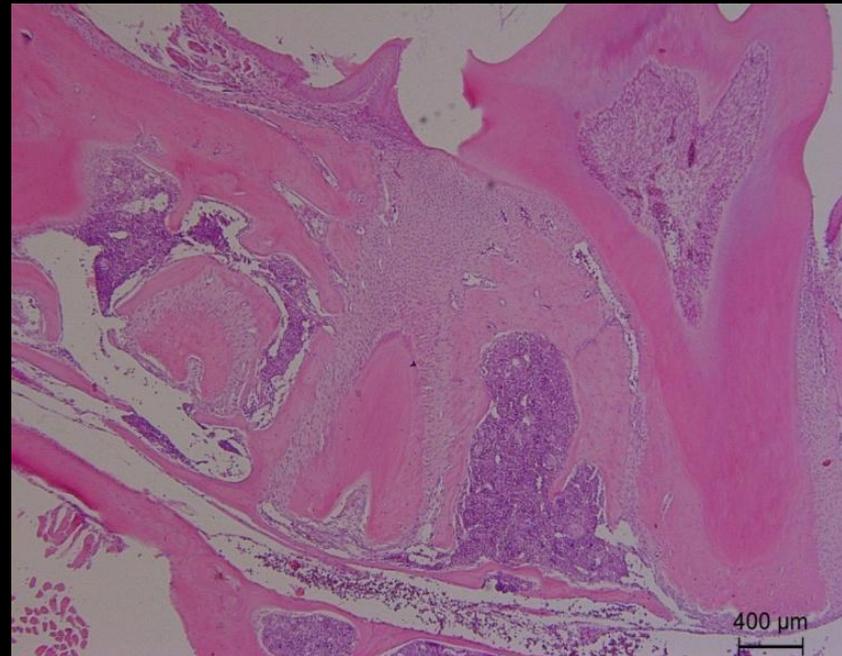
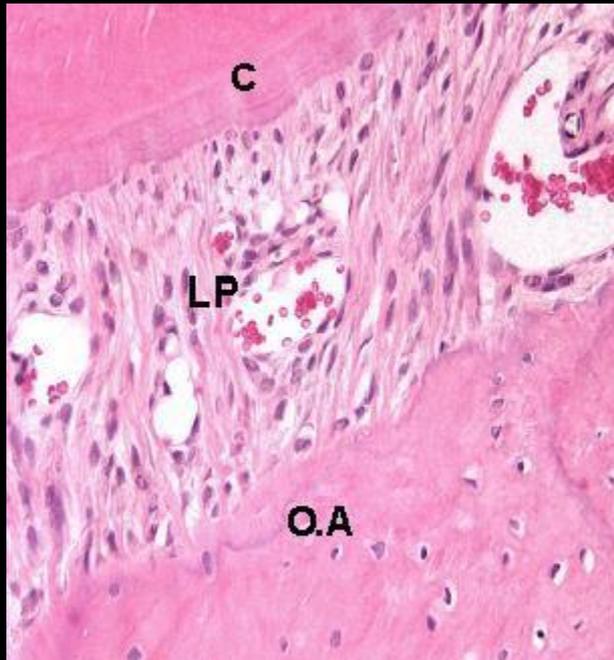
## Low-level laser therapy improves bone formation: stereology findings for osteoporosis in rat model

Priscilla Hakime Scalize<sup>1</sup> · Luiz Gustavo de Sousa<sup>1</sup> · Simone Cecílio Hallak Regalo<sup>1</sup> ·  
Marisa Semprini<sup>1</sup> · **Dimitrius Leonardo Pitol<sup>1</sup>** · Giselle Aparecida da Silva<sup>1</sup> ·  
Jéssica de Almeida Coelho<sup>1</sup> · Antônio Augusto Coppi<sup>2</sup> · Aliny A B Lobo Laad<sup>3</sup> ·  
Karina Fittipaldi Bombonato Prado<sup>1</sup> · Selma Siessere<sup>1</sup>

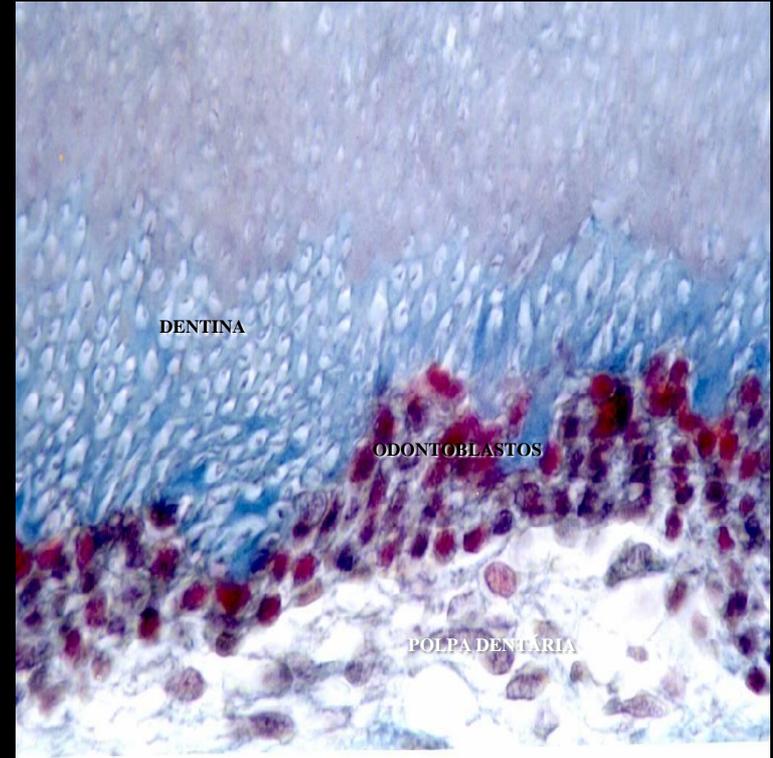
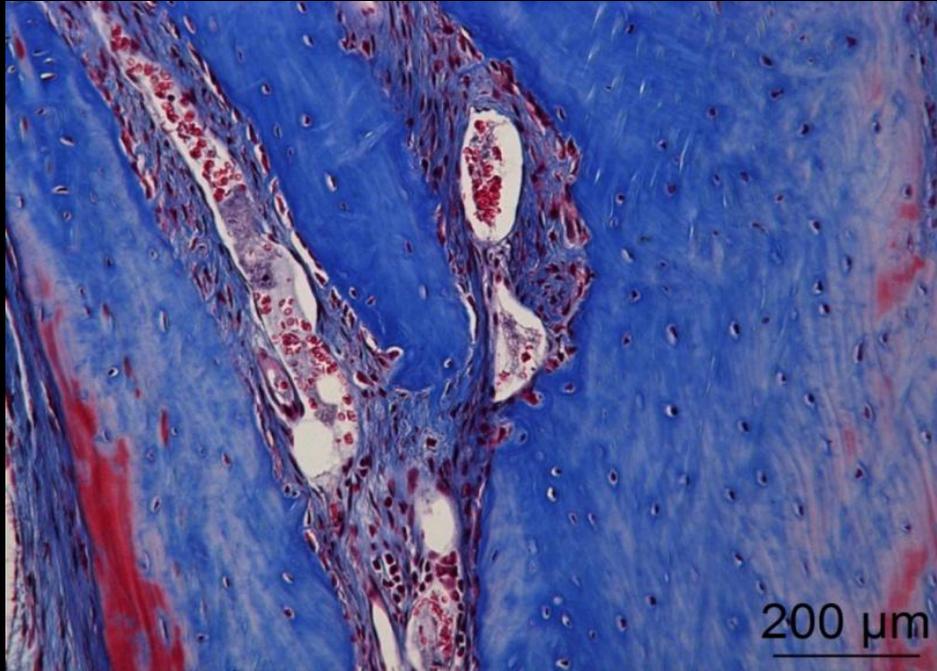


# Métodos de coloração

# Hematoxilina Eosina



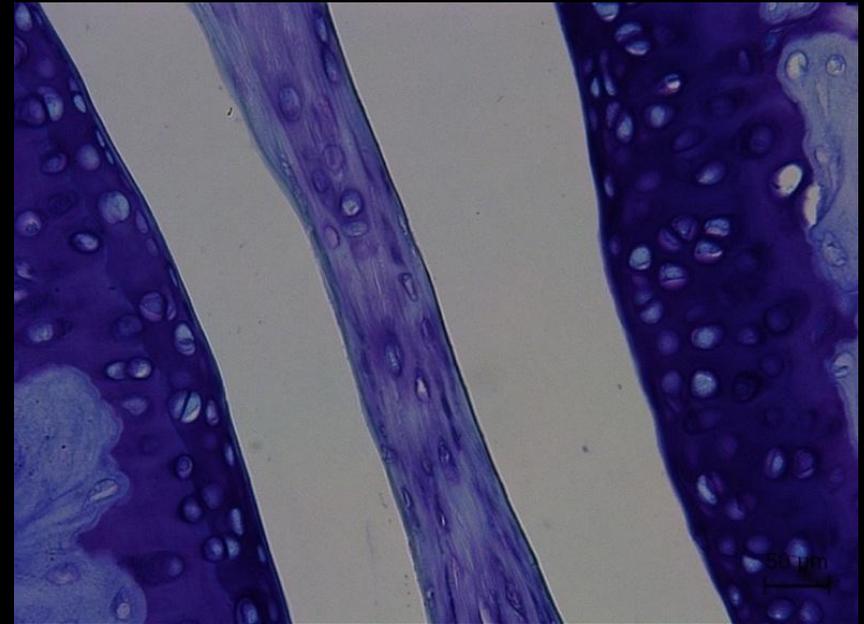
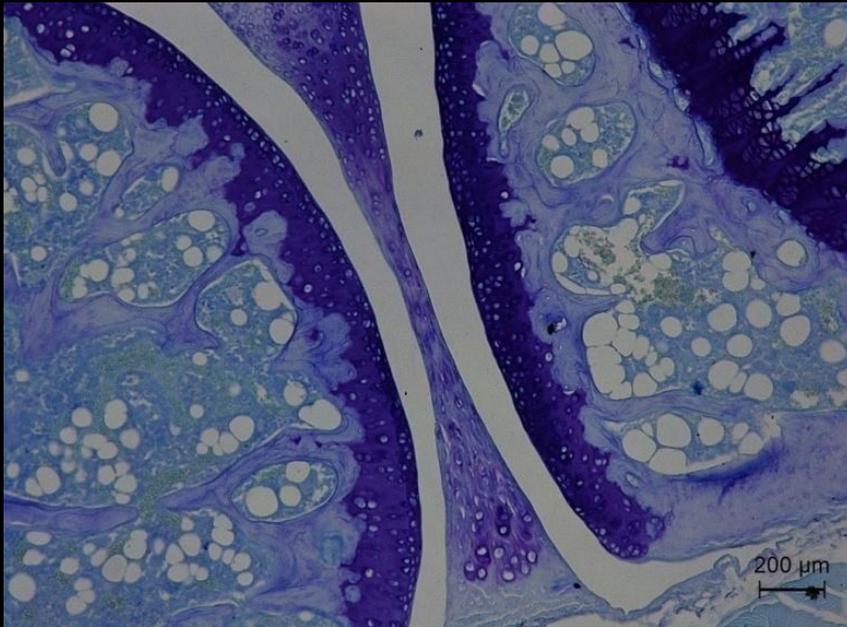
# Tricômico de Masson



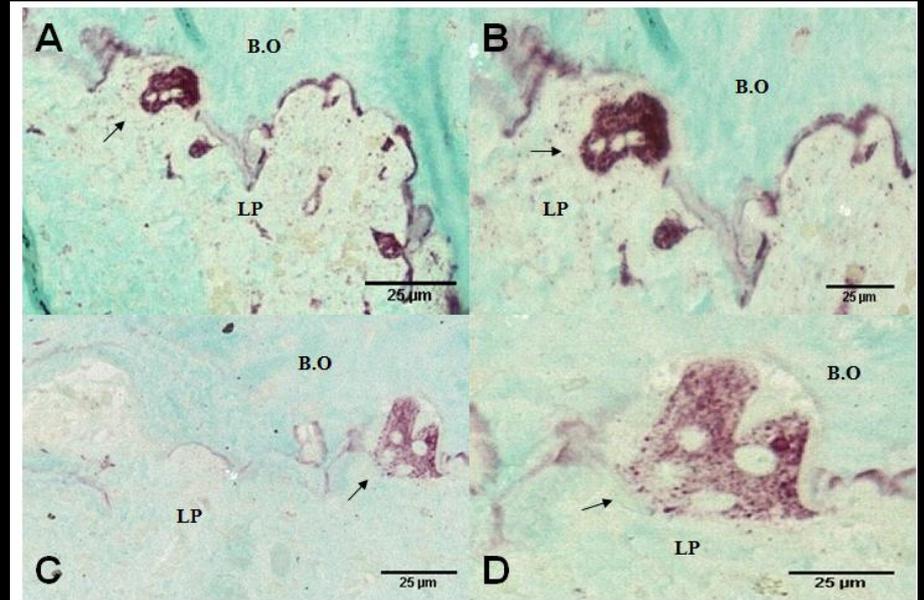
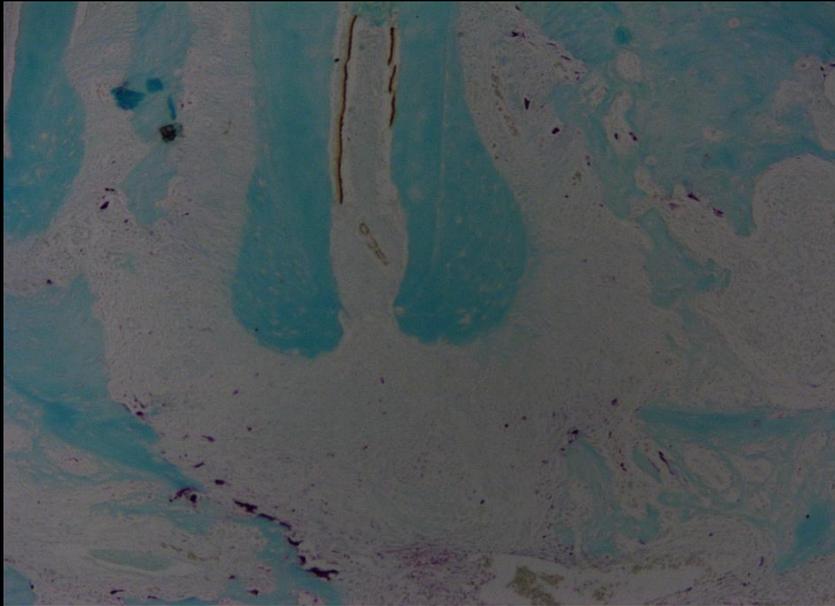
# Picro Sirius



# Azul de Toluidina



# TRAP

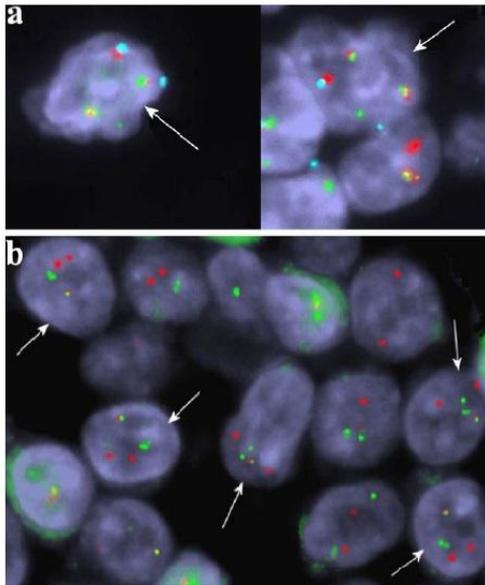


# Medula Óssea

- Biopsia de medula óssea por trefina.
- Geralmente fixação bem.
- São amostras pequenas que facilitam a penetrabilidade do fixador.
- E também a ação dos agentes descalcificadores.

# EDTA

**Figure 1** Fluorescence *in situ* hybridisation analysis. Cells (arrowed) showing (A) *IGH@-MYC* fusions in Patient 1 and (B) *IGH@-CCND1* fusions in Patient 2.



- Entretanto os protocolos com EDTA em biopsia de medula variam de 48 a 72 horas

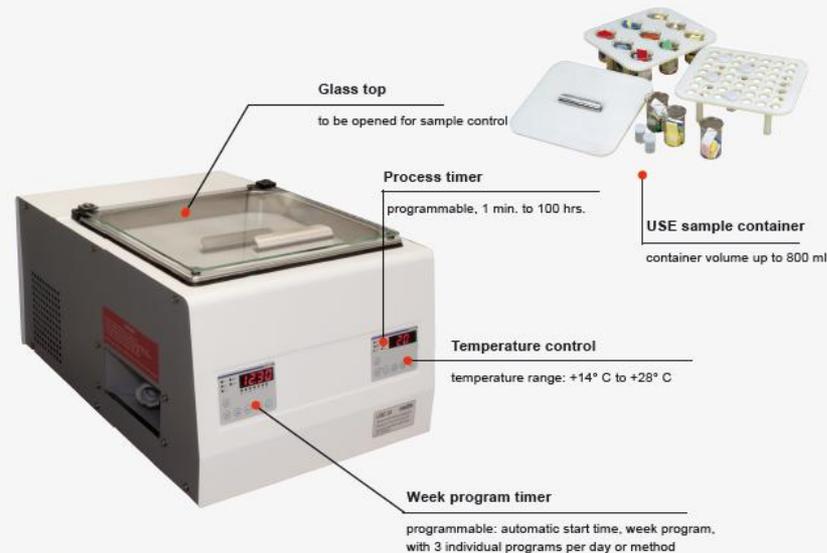
SPECIAL ARTICLE

# Ultrasonic Decalcification Offers New Perspectives for Rapid FISH, DNA, and RT-PCR Analysis in Bone Marrow Trepshines

*Tanja Reineke, MD, Bettina Jenni, MD, Marie-Therese Abdou, Simona Frigerio, PhD, Petra Zubler, Holger Moch, MD, and Marianne Tinguely, MD*

## Ultrasonic Decalcifying Automat

USE 33



The unique technology of the ultrasonic decalcifying automate USE 33 offers the rapid destruction of crystalline structures like calcium phosphate, magnesium phosphate and

**TABLE 1. Eight Trephine Biopsies per Fixation Time (24 and 48 h) From Patient 1 Where Subjected to the Following Decalcification Protocols**

	Time of Ultrasonic Decalcification in Hours (h)		Time of Decalcification Without Ultrasonic Treatment (h)
USEDECALC	2*	3	2
EDTA 10%	2*	3	2
USERAPID	nd	nd	2
Nitric acid 5%	nd	nd	2

\*Treatments were repeated for patient 2 (fixation time 24 h).  
nd indicates not done.

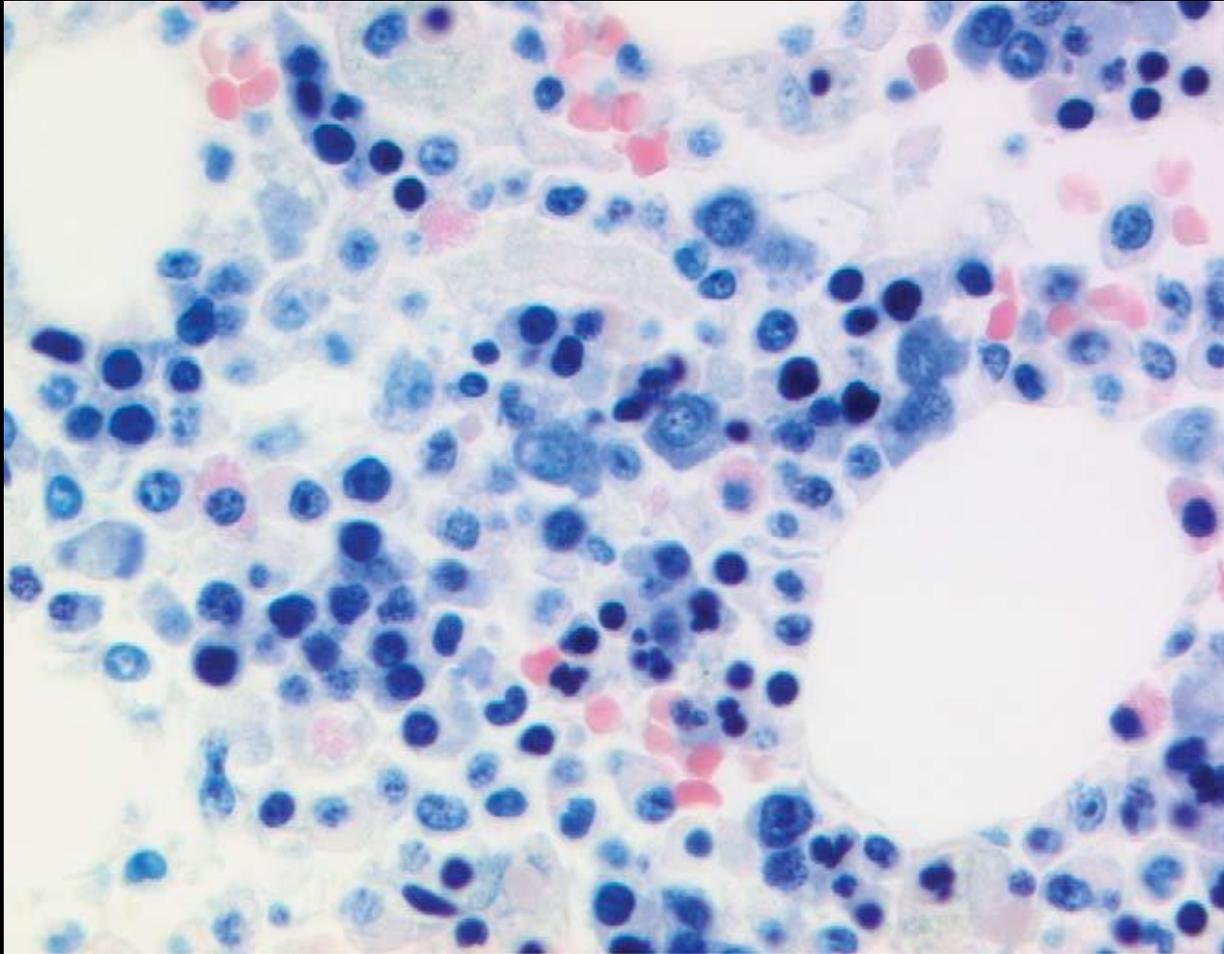


FIGURE 2. Giemsa stain showing morphologic details of a trephine decalcified by ultrasound and a 10% EDTA solution.

# Acido Nítrico

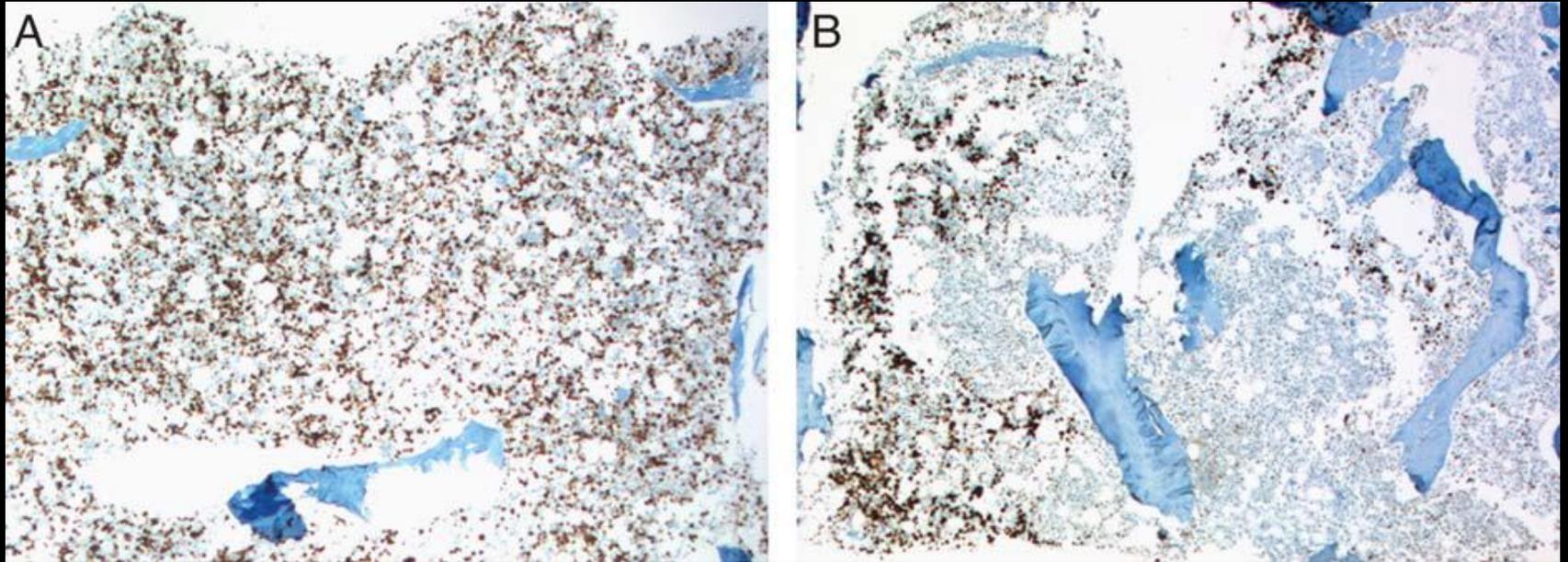
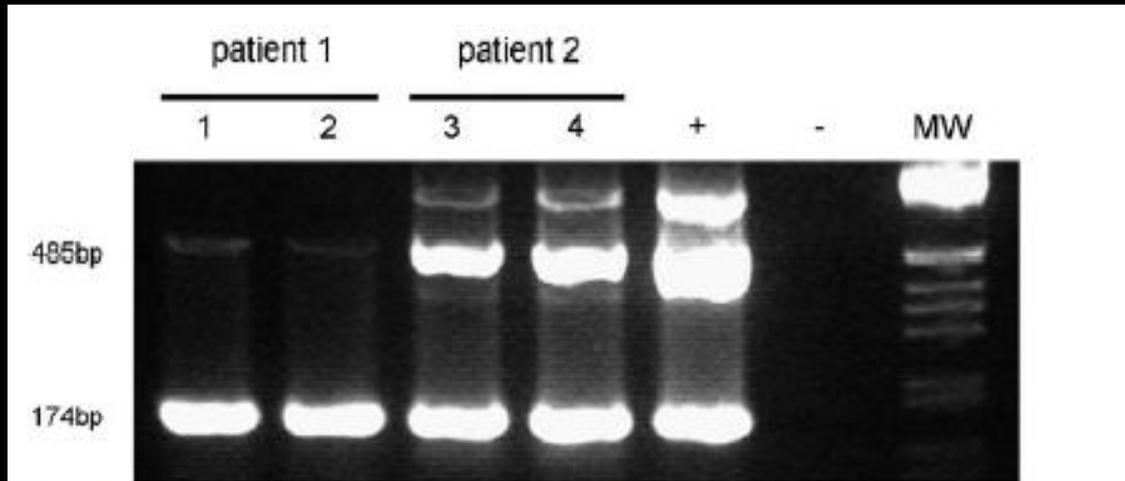


FIGURE 3. A, Homogenous Mib1 staining in an EDTA-decalcified sample. B, Heterogenous Mib1 staining in an acid-decalcified sample of the same patient.



**FIGURE 6.** Samples of 2 patients (patient 1: No. 1 and 2; patient 2: No. 3 and 4) fixed in 4% formalin for 24 hours and decalcified by ultrasound and EDTA-based solutions showing variable amounts of amplified RNA for  $\beta$ -actin. No. 1 and 3 = USEDECALC; No. 2 and 4 = 10% EDTA. RNA from paraffin-embedded tissue as PCR positive control. - water as negative control.

# Conclusões

Oscilação na forma de ultra-som, acelera a penetração de agentes quelantes dentro do tecido ósseo, conduzindo a uma rápida destruição de estruturas cristalinas como fosfato de cálcio, de magnésio fosfato, cálcio e carbonato.

Formalina tamponada, seguido por uma descalcificação ultrasons baseados em EDTA, significativamente acelera o processamento de medula óssea

# Processamento de Unhas

- As unhas são placas de células queratinizadas localizadas na superfície dorsal das falanges terminais dos dedos.
- A porção proximal da unha é chamada de raiz da unha. O epitélio da dobra de pele que cobre a raiz da unha consiste nas camadas usuais da epiderme.
- A camada córnea desse epitélio forma a cutícula da unha.

- É na raiz da unha que se observa a sua formação, graças a um processo de proliferação e diferenciação das células epiteliais aí colocadas, que gradualmente se queratinizam , formando uma placa córnea.
- A unha é constituída essencialmente por escamas córneas compactas, fortemente aderidas umas às outras.

# Processamento de unhas

- Fixar com formol 10 %.
- Duas lavagens rápida com água destilada.
- Passar alguns segundos na solução de 40% de hidróxido de sódio.
- Se for uma unha com lesões passa mais alguns segundos ate a unha ficar clara.
- Lavar em H<sub>2</sub>O.
- Desidratar e emblocar em parafina
- Cortar o mais rápido possível, se não a rigidez retorna .



# **Microscopic examination of normal nail clippings**

Betina Werner<sup>1</sup>, Andre Antunes<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dermatopathologist, Department of Pathology, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil

<sup>2</sup> Graduate student, Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba, Brazil

# **Outra maneira de processamento**

- **Não Usar fixação com formalina.**
- **Processamento automatizado (ganha tempo).**
- **Depois do material emblocado, colocar os blocos de cabeça para baixo em uma superfície gelada ( 1c°) em uma solução de hidróxido de amônia a 10%, por trinta minuto.**
- **Corte 2  $\mu\text{m}$ .**

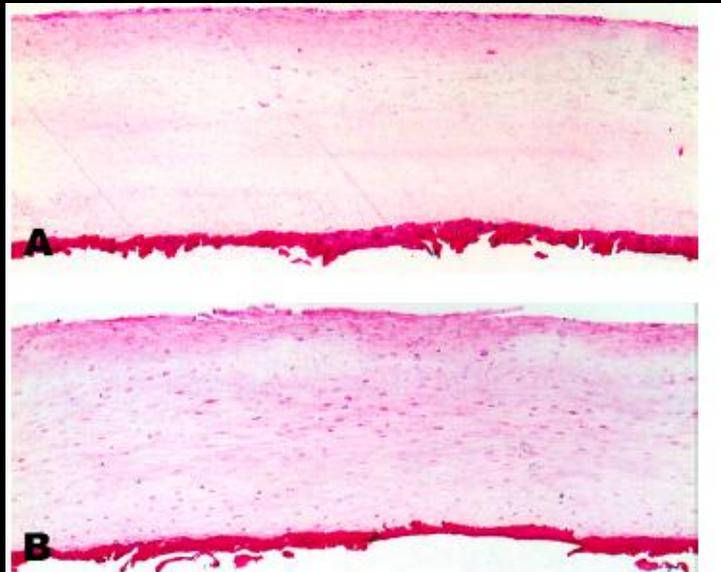
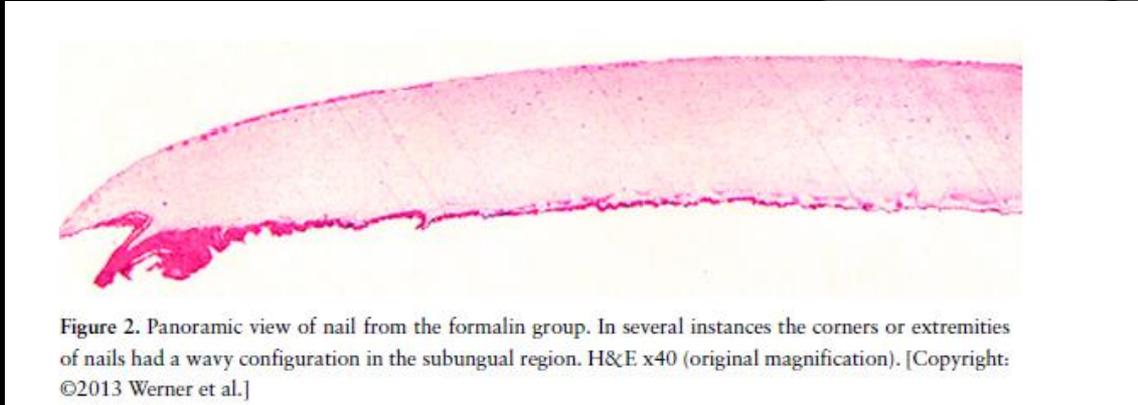


Figure 1. (A) Nail from the formalin group and (B) nail from the dry group. Two regions are readably discernable: nail plate (above) and subungual region (below). H&E x100 (original magnification). [Copyright: ©2013 Werner et al.]



Figure 5. Nail of the dry group showing prominent hyper-eosinophilic nuclear shadows in the inferior/internal aspect of the plate. H&E x400 (original magnification). [Copyright: ©2013 Werner et al.]

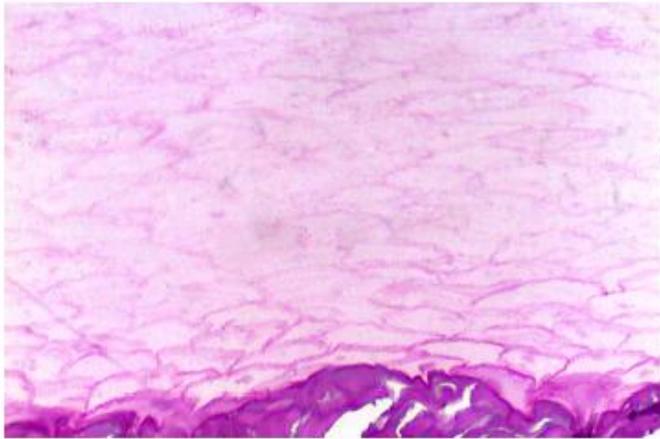


Figure 3. Nail from the formalin group. Onychocytes borders are better seen in the PAS staining. PAS x400 (original magnification). [Copyright: ©2013 Werner et al.]

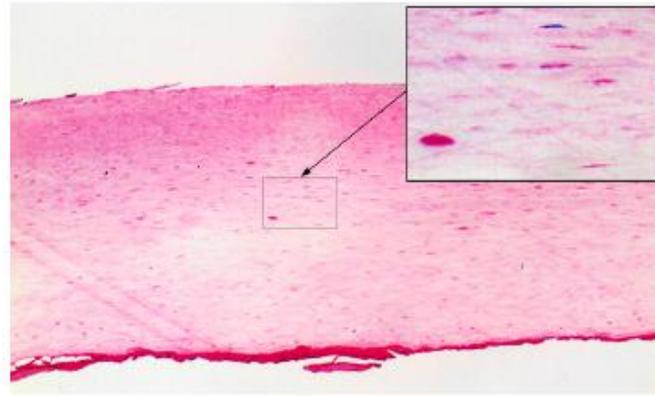


Figure 4. Nail from the dry group showing several hyper eosinophilic nuclear shadows and onychokaryosis. Insert: one fusiform basophilic nucleus (upper half) and several hyper eosinophilic "stains" in the center of onychocytes. H&E x100 and x400 (original magnification). [Copyright: ©2013 Werner et al.]

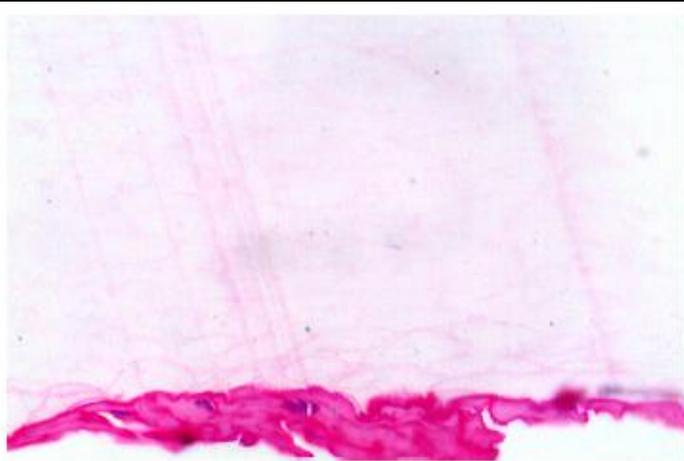


Figure 6. Nuclei in the subungual region (parakeratosis) in a nail of the formalin group. H&E x400 (original magnification). [Copyright: ©2013 Werner et al.]

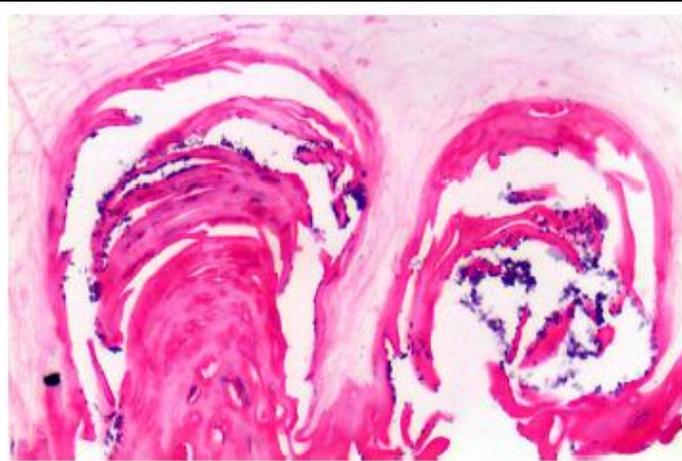


Figure 7. Bacteria in subungual region in a nail of the formalin group. H&E x400 (original magnification). [Copyright: ©2013 Werner et al.]

**Obrigado !!!**

[dimitrius@forp.usp.br](mailto:dimitrius@forp.usp.br)

[dimipitol@yahoo.com.br](mailto:dimipitol@yahoo.com.br)