

Artigo de Revisão de Literatura
Literature Review Article

Histomorfometria óssea: uma análise entre as técnicas com metacrilato de metila e parafina

Bone histomorphometrics: an analysis between techniques with methyl methacrylate and paraffin

Barbara Lais de Albuquerque¹
Mariana Campos Ferreira¹
Letícia Capote dos Santos^{1,2}
Carolina Aguiar Moreira^{2,3}
Rafaela Ceron²
Maria Carolina Botelho Pires de Campos¹
Cintia Mussi Milani¹
Isabela Ribeiro Madalena^{4,6}
Flares Baratto-Filho^{1,4}
Liliane Roskamp^{1,2}

Autor para correspondência:

Liliane Roskamp
Universidade Tuiuti do Paraná, Faculdade de Odontologia
Rua Candido Hartmann, n. 528
CEP 80730-440 – Curitiba – PR – Brasil
E-mail: lroskamp@gmail.com

¹ Universidade Tuiuti do Paraná – Curitiba – PR – Brasil.

² Centro de Pesquisa Acadêmica do Instituto Pró-Renal de Curitiba – Curitiba – PR – Brasil.

³ Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Paraná – Curitiba – PR – Brasil.

⁴ Departamento de Odontologia, Universidade da Região de Joinville – Joinville – SC – Brasil.

⁵ Faculdade de Odontologia, Centro Universitário Presidente Tancredo de Almeida Neves – São João del Rei – MG – Brasil.

⁶ Departamento de Odontologia Restauradora, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Juiz de Fora – Juiz de Fora – MG – Brasil.

Data de recebimento: 13 abr. 2022. Data de aceite: 13 out. 2022.

Palavras-chave:

histomorfometria;
metacrilato de metila;
osso; parafina.

Resumo

Introdução: A histomorfometria permite um estudo quantitativo da microscopia óssea, a fim de obter parâmetros estruturais e de formação e remodelação óssea. **Objetivo:** Realizar uma revisão integrativa da literatura e comparar as técnicas de histomorfometria óssea realizada por meio da emblocação da peça óssea em parafina e emblocação da peça óssea em metacrilato de metila (MMA). **Material e métodos:** Trata-se de um estudo exploratório descritivo de carácter integrativo. As bases de dados Educational Resources Information Center, Scientific

Electronic Library Online (SciELO), PubMed/Medline, Periódicos Capes/MEC e Cochrane Library foram utilizadas para busca. Os critérios de inclusão foram pesquisas originais de estudos observacionais de caso-controle, estudos experimentais clínicos, revisões sistemáticas com e sem metanálises. **Revisão de literatura:** A histomorfometria aprofunda a análise histológica porque avalia estruturas de forma bidimensional e tridimensional. A histomorfometria óssea destaca-se por avaliar desde parâmetros estáticos, quando se usa a parafina, e dinâmicos, quando se utiliza o MMA. **Conclusão:** A técnica com o uso do MMA é considerada padrão ouro por ser uma análise dinâmica do tecido ósseo não descalcificado.

Keywords:

histomorphometry;
methyl methacrylate;
bone; paraffin.

Abstract

Introduction: Histomorphometry allows a quantitative study of bone microscopy to obtain structural parameters and bone formation and remodeling. **Objective:** To carry out an integrative review of the literature and compare the bone histomorphometry techniques performed by means of embedding the bone piece in paraffin and embedding the bone piece in methyl methacrylate (MMA). **Material and methods:** This is an exploratory descriptive study of an integrative nature. The Educational Resources Information Center, Scientific Electronic Library Online (SciELO), PubMed/Medline, Capes/MEC Periodicals, and Cochrane Library databases were used for the search. Inclusion criteria were original searches of observational case-control studies, clinical experimental studies, and systematic reviews with and without meta-analyses. **Literature review:** Histomorphometry deepens the histological analysis as it evaluates structures in a two-dimensional and three-dimensional way. Bone histomorphometry stands out for evaluating static parameters when using paraffin, and dynamic parameters, when using MMA. **Conclusion:** The technique using MMA is considered the gold standard because it is a dynamic analysis of undecalcified bone tissue.

Introdução

Com o passar dos anos, novas e mais precisas técnicas de diagnóstico de doenças ósseas foram desenvolvidas, e a histomorfometria óssea obteve um grande destaque na análise da microarquitetura e principalmente na remodelação óssea [13]. Ela permite um estudo quantitativo da microscopia óssea, a fim de obter parâmetros estruturais e de remodelação óssea tanto de osso trabecular quanto cortical. Esses parâmetros são analisados de forma bidimensional, medidos em seções com extrapolação para teoria da estereologia padrão [24]. A histomorfometria é desenvolvida por duas principais técnicas, a emblocação da peça óssea em parafina e a emblocação da peça óssea em metil metacrilato de metila (MMA) [13]. A técnica

da histomorfometria desenvolvida por emblocação da peça em MMA apresenta como vantagem a dispensabilidade da etapa de descalcificação óssea, obtendo resultados mais precisos, permitindo a avaliação de diferentes estágios da remodelação ou formação óssea [13].

Especialmente na Odontologia a histomorfometria é importante para avaliação da formação/reabsorção óssea em casos de lesões periapicais, doença periodontal, regeneração de alvéolo após exodontias dentárias, osteointegração de implantes, estratégias terapêuticas em tratamentos ortodônticos etc. A formação/remodelação óssea é avaliada de forma dinâmica [1, 2, 4, 14, 20]. Assim, tem-se como objetivos realizar uma revisão integrativa da literatura e comparar as técnicas de histomorfometria óssea realizada por meio da

emblocação da peça óssea em parafina e emblocação da peça óssea em MMA.

Material e métodos

Trata-se de um estudo exploratório descritivo de carácter integrativo. Tal abordagem metodológica compreende a síntese de conhecimentos e a aplicabilidade de dados que tenham significado para o objetivo deste estudo. Sua questão norteadora foi: “Qual a melhor técnica de avaliação histomorfométrica no processo de reabsorção/aposição óssea?”. A coleta de dados foi feita em artigos científicos, publicados nos idiomas português e inglês, disponíveis nas bases de dados Educational Resources Information Center, Scientific Electronic Library Online (SciELO), PubMed/Medline, Periódicos Capes/MEC e Cochrane Library. Definiram-se os descritores de acordo com os Descritores em Ciências da Saúde (DeCs): em português, “histomorfometria óssea”, “parafina”, “metacrilato de metila”; em inglês, “histomorphometry”, “methyl methacrylate”, “paraffin”.

Os critérios de inclusão foram pesquisas originais de estudos observacionais de caso-controle, estudos experimentais clínicos, revisões sistemáticas com e sem metanálises publicados entre os anos de 2016 e 2021.

Revisão de literatura

Desenvolvimento ósseo

Grande parte dos ossos é constituída por meio da ossificação endocondral, que consiste na mineralização do citoplasma da célula cartilaginosa em regiões específicas, conhecidas como placas de crescimento. Nessas regiões ordenadas, os condrócitos estão em constante proliferação e diferenciação [19]. A síntese da matriz óssea inicia-se com a construção de colágeno tipo I via osteoblastos. A maior parte da proteína de matriz extracelular do osso é do colágeno do tipo I, que fornece força e elasticidade de osso para a deposição de outros componentes da matriz, como hidroxiapatita. A síntese e a mineralização da matriz extracelular são intensificadas pelo aumento na produção e atividade da fosfatase alcalina [19].

O colágeno é a maior classe de proteína fibrosa insolúvel encontrada na matriz extracelular e nos tecidos conectivos. É uma família de proteínas relacionadas, geneticamente diferentes, cuja principal função é estrutural, graças à sua estrutura

proteica formada pelo entrelace em tríplice hélice de três cadeias polipeptídicas chamadas cadeias-alfa, o que justifica suas propriedades físicas e biológicas, rigidez, solidez e estabilidade. Os colágenos são classificados em pelo menos 18 tipos e suas subunidades, cadeias-alfa, são codificadas por *genes* diferentes. Os colágenos tipo I, II e III são os mais abundantes no organismo. O tipo I está presente na pele, tendão e osso; o tipo II, em cartilagem e humor vítreo; o tipo III, em pele e músculos [19].

O tecido ósseo é composto por células de suporte para o tecido chamadas osteoblastos, que são progenitoras dos osteócitos, as células que sustentam o tecido. Células de remodelação denominadas de osteoclastos são responsáveis por reabsorver o osso, matriz não mineral de proteínas, colágeno e não colágeno e depósito de sais minerais inorgânicos [23, 25]. A remodelação óssea é regulada por vários hormônios e vias de sinalização, entre eles o hormônio da paratireoide (PTH), vitamina D, sistema receptor ativador NF- κ B (RANK) e seu ligante (RANKL), osteoprotegerina (OPG) e a via de sinalização WNT [11, 23, 25].

O RANKL, secretado principalmente por osteoblastos imaturos, pode se ligar ao RANK expresso nas superfícies de progenitores de osteoclastos, promovendo assim a diferenciação de precursores de osteoclastos em osteoclastos maduros. Por outro lado, a osteoclastogênese regulada por RANKL pode ser inibida pela OPG, que é secretada principalmente por osteoblastos ativos e serve como um receptor chamariz solúvel para RANKL, dessa forma, regulando o metabolismo ósseo [23].

Histomorfometria óssea

A histomorfometria óssea é uma técnica para avaliar o processo de formação e reabsorção óssea, mineralização e microarquitetura do tecido ósseo. A medida da remodelação pode ser avaliada por meio de parâmetros estáticos e dinâmicos, sendo a histomorfometria considerada padrão ouro para tais parâmetros [13]. É indicada para o diagnóstico de osteomalácia, pacientes com fragilidade e dor óssea excessiva sem causa aparente, jovens com perda óssea ou fraturas sem causa secundária definida. Também em pacientes com doença renal crônica em que há uma discrepância entre exames bioquímicos que impede uma interpretação definitiva do caso, suspeita de intoxicação por alumínio, antes de iniciar tratamento em pacientes com fraturas, assim como em doenças osteometabólicas e avaliação do mecanismo de ação das medicações antiosteoporóticas [13].

A técnica consiste em um exame histológico de uma biópsia óssea calcificada, com o objetivo de obter informações qualitativa da microestrutura e quantitativa da remodelação do tecido ósseo. A análise é realizada em cortes bidimensionais, porém destinados à determinação de parâmetros tridimensionais, a qual é possível por intermédio da estereologia. O uso de agentes fluorescentes (tetraciclina e calceína) como marcadores do tecido ósseo se incorpora na frente de mineralização e permite o estudo dinâmico da formação e mineralização óssea. A crista ilíaca é o sítio mais favorecido para a realização da biópsia óssea, contendo osso trabecular e cortical em um único fragmento [13].

Para a avaliação dos parâmetros estruturais e microarquitetura óssea, existem dois tipos diferentes de técnicas: a técnica da parafina, em que se processa a amostra histológica após um período de descalcificação, empregando o uso de uma solução ácida para remover o componente mineral; e a técnica que não descalcifica o tecido, que consiste em deixar a parte mineral intacta. As amostras não descalcificadas podem ser incorporadas em uma resina, como o MMA, após um período de impregnação do tecido em soluções teste com diferentes concentrações de peróxido de benzoíla; sua deformação é menor [13].

Agente fluorescente / fluoróforo

Tetraciclina e calceína

O objetivo da utilização desta técnica é detectar corantes fluorescentes ligados às biomoléculas do tecido ósseo analisado. A distribuição dos marcadores fluorescentes pode ser identificada com precisão pela luz emitida em virtude da radiação eletromagnética emitida pelas moléculas que absorveram a excitação primária, ou seja, os marcadores fluorescentes contêm fluoróforos que são moléculas com propriedades fluorescentes, sendo possível a visualização [13].

O uso de marcadores fluorescentes permite identificar a direção e localização topográfica da neoformação óssea. Um dos marcadores que vêm se mostrando promissor em estudos envolvendo a análise do reparo ósseo é a tetraciclina. Para estudos em animais, a calceína também pode ser empregada. Esta marca sequencialmente camadas de nova deposição e mineralização óssea durante o mecanismo de reparo. Dessa forma, o uso de marcadores fluorescentes possibilita compreender como ocorrem a deposição do tecido mineralizado e seu processo de remodelação [8].

Na histomorfometria, o fluoróforo é marcado no tecido ósseo e visualizado, na maioria dos casos, como marcações simples e duplas. Uma dupla marcação sucede quando a formação óssea em um determinado sítio está acontecendo durante a sequência inteira do uso do fluoróforo. Diferentemente, a marcação simples acontece quando a formação óssea se iniciou após os primeiros dias de uso do fluoróforo ou terminou antes do segundo curso de sua administração. A marcação simples também ocorre em situações em que a formação óssea está muito lenta. A microscopia de fluorescência é uma técnica muito eficaz para otimizar a captação de imagens em pesquisas de tecido ósseo em que certas estruturas não são observáveis com microscópios tradicionais [16].

Corantes ou marcadores

O azul de toluidina é um corante catiônico, metacromático, do grupo das tiazinas, que marca seletivamente grupos ácidos de componentes teciduais, apresentando afinidade pelo ácido desoxirribonucleico (DNA) dos núcleos celulares e pelo ácido ribonucleico (RNA) presente no citoplasma, os quais fixam o corante e se coram profundamente. Serve para avaliação estrutural na histomorfometria óssea, incluindo a contagem das células ósseas [3].

Histomorfometria com parafina

A descalcificação de espécimes ósseos é necessária para rotina de inclusão e corte em parafina. A descalcificação ocorre geralmente com duas categorias de agentes descalcificantes, nomeadamente ácidos e agentes quelantes. O uso de ácidos fortes, alta concentração de ácidos e alta temperatura aumentaria a velocidade de descalcificação, mas o tecido pode ser danificado durante esse processo [5].

O processamento de parafina de tecido é o método mais amplamente utilizado na preparação de lâmina histológica. Descalcificação constitui uma etapa necessária para a preparação de amostras ósseas compatíveis com a configuração usada no corte histológico de rotina. No entanto a descalcificação geralmente leva muito tempo, o que pode atrasar o progresso do estudo e o diagnóstico clínico [5].

O seccionamento pode ser obtido por retificação que produz uma seção mais espessa, que é ideal para estudos como a análise de fluorocromo. Isso é melhor alcançado usando uma lâmina de

diamante em um micrótomo (aparelho que faz cortes microscópicos que pode variar seus cortes de 1 a 10 μm) [10].

Avaliação da estrutura óssea e parâmetros estáticos da remodelação

Volume ósseo trabecular (BV/TV, %): a porcentagem da cavidade de medula óssea que é ocupada por osso trabecular, tanto mineralizado como não mineralizado.

Espessura das trabéculas (Tb.Th, em micrômetros): média da medida transversal das trabéculas ósseas.

Número trabecular (Tb. N): o número de trabéculas ósseas por mm de tecido ósseo.

Separação das trabéculas (Tb.Sp.): distância média entre as trabéculas, em mm.

Espessura cortical (Ct. Wi): a largura média das duas corticais, interna e externa.

Superfície osteoide (OS/BS %): a porcentagem de superfície óssea coberta por osteoide (osso não mineralizado).

Espessura osteoide (O.Wi): a largura média das camadas de osteoide, medida em número de lamelas.

Superfície reabsorvida (ES/BS%): a porcentagem de superfície óssea ocupada por cavidades de reabsorção (lacunas de Howship), com ou sem osteoclastos.

Área cortical: área total de osso cortical incluindo interno e externo.

Espessura cortical (Ct.Wi): média da espessura de ambas as corticais. Em indivíduos em idade de crescimento, em que há diferença na atividade das células ósseas da cortical interna para a externa, são medidos separadamente.

Porosidade cortical (Ct.Po.N): número total de poros de ambas corticais.

Área de porosidade cortical (Ct.Po.Ar): Área total de poros.

Todas as variáveis histomorfométricas são derivadas de medições feitas no microscópio, como área, perímetro e espessura. Nomenclatura, derivações e unidades foram padronizadas pela American Society of Bone and Mineral Research [21].

Histomorfometria com historesina (MMA)

Diferentemente das técnicas de rotina, a histologia de processamento ósseo não descalcificado usando MMA de alta temperatura exige uma metodologia de processamento de amostra complexa e precisa, assim como a disponibilidade de equipamentos sofisticados para preparação e análise das amostras,

como micrótomo com navalha de tungstênio, e *software* [15].

A impregnação de MMA no tecido, apesar de ser um procedimento complexo, ainda é preferida a outros tipos de incorporação. À base de resina, por suas características peculiares, permite o estudo de amostras de grandes dimensões. A polimerização de metacrilatos é um processo exotérmico de reação em cadeia radical. Misturas convencionais de MMA principalmente usam peróxidos orgânicos, peróxido de benzoíla como iniciadores de polímeros, e a polimerização é geralmente realizada em temperaturas entre 30 e 45 graus centígrados. A inclusão do MMA convencional resulta na quase completa destruição da atividade enzimática e determinantes antigênicos no tecido incorporado, por modificação covalente de moléculas biológicas através de radicais gerados durante o processo de polimerização [13].

Até hoje a técnica com MMA é a mais utilizada, considerada padrão ouro, mesmo sendo um procedimento bastante difícil. É ainda a mais escolhida dentre os outros tipos de incorporação à base de resina, graças às suas propriedades únicas, em comparação também ao MMA de baixa temperatura. Permite adquirir lâminas mais finas, sendo possível obter uma avaliação mais precisa do corte histopatológico. Entretanto, para a incorporação com base em MMA na histologia, se requer que os laboratórios proporcionem um espaço de trabalho apropriado para todas as etapas de processamento e incorporação para as fases subsequentes da realização das lâminas histológicas. Ao se considerar a alta temperatura de polimerização do MMA, são exigidos moldes resistentes a uma alta temperatura e uma maior atenção às amostras, pois, diferentemente da parafina, a reação de polimerização do MMA é irreversível [15].

A presença de locais de emissões químicas adequadas é obrigatória para a manipulação e preparação seguras, não só dos fixadores à base de formaldeído, como também das soluções de infiltração e inclusão à base de MMA, de forma a evitar ou minimizar a exposição aos vapores do monômero [15]. Além disso, deve ser realizado um descarte correto do monômero de MMA e da primeira solução de infiltração, que necessitam de procedimentos específicos, em comparação às outras técnicas. A inclusão de MMA em alta temperatura indica etapas mais longas e um consumo maior de álcool na desidratação, exigindo reagentes adicionais nas etapas de inclusão [15]. Seu protocolo de incorporação é confiável e homogêneo.

Comparado ao da parafina, o MMA pode penetrar de uma forma mais adequada no tecido [9].

A incorporação de MMA permite uma distinção entre osso mineralizado e osteoide não mineralizado, com uma excelente preservação óssea e de estruturas celulares, que são obrigatórias para um histórico ósseo confiável na análise morfométrica [3]. Além das estruturas ósseas e parâmetros de remodelação estáticos avaliados na histomorfometria pela técnica anteriormente descrita, nesta podem-se também observar a atividade óssea dinâmica, por meio da mineralização das linhas de referência, e unidades de remodelação, que detecta as áreas focais em áreas de mineralização [3].

Avaliação da estrutura óssea e parâmetros dinâmicos da remodelação

Superfície de mineralização (MS/BS %): a porcentagem de superfície óssea que contém marcação com tetraciclina e que reflete mineralização ativa. O cálculo é realizado usando a medida de todas as superfícies que contém marcação dupla mais a metade da superfície que contém marcação simples em relação à superfície óssea. Tal medida reflete a proporção de superfície óssea sobre a qual novo osso mineralizado estava sendo depositado durante o período de marcação com tetraciclina.

Taxa de aposição mineral (MAR): é a distância entre os bordos de duas marcações por tetraciclina dividida pelos dias decorridos entre as duas marcações por tetraciclina, em $\mu\text{m}/\text{dia}$.

Taxa de formação óssea (BFR/BS): é a quantidade de osso novo formado por unidade de superfície óssea por unidade de tempo. É calculada multiplicando a superfície de mineralização pela taxa de aposição mineral, em $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{dia}$.

Taxa de aposição óssea ajustada (Aj.AR): indica a quantidade de osso novo formado por unidade de superfície de osteoide por unidade de tempo. É calculada pela divisão da taxa de formação óssea pela superfície osteoide, em $\mu\text{m}/\text{dia}$.

Todas as variáveis histomorfométricas são derivadas de medições feitas no microscópio, como área, perímetro e espessura. Nomenclatura, derivações e unidades foram padronizadas pela American Society of Bone and Mineral Research [21].

Histomorfometria na mandíbula

A estrutura interna do osso está em constante adaptação ao seu ambiente funcional por meio de processos que removam o osso existente e depositem um novo osso. Os músculos fornecem um estímulo mecânico importante para a formação óssea. Uma

série de estudos com animais sugere a relação entre mastigação, função muscular e adaptação esquelética do crânio [18].

O osso mandibular é menos sensível à desnaturação proteica do que a tíbia esponjosa proximal. Presume-se que as diferentes origens, ossificação e função dos ossos longos e da mandíbula explicam as diferenças em sua resposta aos estímulos [18]. É importante a avaliação da mandíbula para analisar doenças metabólicas. Embora a redução do estrogênio na tíbia seja grande, quando comparada à da mandíbula, a redução do estrogênio pode ser ainda maior, por causa das suas funções mastigatórias [14].

A mandíbula sofre remodelação intracortical mais rápida, em comparação a outras regiões do corpo. Alguns autores sugerem que a remodelação óssea está relacionada à remodelação de supressão. É possível que a resposta da ovariectomia seja diferente no osso trabecular da mandíbula, em comparação aos locais avaliados mais tradicionalmente (vértebra ou tíbia proximal). Também a superfície adjacente ao ligamento periodontal sofre ativa modelagem óssea [12].

A mandíbula é um osso membranoso, altamente cortical, com pouco suprimento de sangue. Portanto, a alteração induzida por radiação ionizante em sua estrutura arquitetônica afeta, intimamente, tanto a capacidade de remodelação como suas propriedades biomecânicas. Estudos de dano induzido por radiação ionizante no osso cortical demonstraram que a XRT (terapia de raio x) afeta inicialmente a permeabilidade vascular, seguida pela reabsorção óssea, diminuição de osteócitos viáveis e, em consequência, a remodelação óssea. Os osteócitos são considerados uma célula do tipo radiorresistente, cuja morte após a radioterapia pode ser atribuída sobretudo ao dano vascular. A privação desses componentes celulares, a perda de vascularização e a formação de osteoide contribuem para uma remodelação óssea prejudicada [22].

Para melhorar a análise da compreensão da estrutura óssea, novos métodos vêm sendo utilizados. A fim de detalhar a conexão do osso e do implante, uma análise histomorfológica vem sendo utilizada para monitorar a dinâmica do crescimento do osso. Os métodos de rotulagem com corantes fluorocromo são incorporados durante a mineralização do osteoide, por meio de um processo de quelação. Portanto, a análise de remodelação óssea em torno de implantes dentários pode ser realizada com marcação sequencial com vários corantes fluorescentes. Isso permite seguir a direção e localização topográfica de neoformação óssea [15].

A avaliação da microarquitetura óssea de maxila e mandíbula em humanos *in vivo* pode ajudar a compreender a sua influência na resistência óssea ou se pode ou não afetar a mudança na interface osso-implante.

Discussão

Por ser uma análise dinâmica de estruturas morfológicas, as quais na histologia comum não é possível visualizar, a histomorfometria óssea se destaca por avaliar desde parâmetros estáticos até dinâmicos, podendo-se extrapolar a análise até uma terceira dimensão. Importante para diagnóstico de diversas doenças metabólicas, é capaz de avaliar a taxa de aposição mineral e formação óssea, também realizando análise de patologias ósseas [13].

A histomorfometria óssea dinâmica é a única análise capaz de medir parâmetros como a taxa mineral, taxa de aposição e sua frequência de ativação. Além dessas medidas, que são taxas de formação óssea, obtêm-se taxas de volume ósseo e superfície erodida, ou seja, taxas de volume e de tamanho ósseo [13].

Citando os parâmetros histomorfométricos dinâmicos, enfatiza-se que a leitura funcional é fora da matriz dos osteoblastos e das células ósseas subsequentes da mineralização da matriz. Portanto, tais parâmetros são superiores a qualquer avaliação morfológica de atividade osteoblástica, como perímetro de osteoblastos ou número dos osteoblastos, sendo também as medidas retiradas para avaliação padronizadas pela American Society of Bone and Mineral Research [21].

A técnica histomorfométrica requer biópsia do tecido, que pode causar dor e desconforto ao paciente. Porém, ao comparar os benefícios e resultados obtidos com a técnica, o procedimento invasivo não chega a ser um dos pontos negativos da técnica [6].

A técnica com MMA em alta temperatura tornou-se muito utilizada porque, durante o seu processo de manuseio, não se descalcifica o osso, obtendo assim resultados mais precisos, podendo avaliar diferentes estágios da remodelação ou formação óssea [13]. É considerada padrão ouro na histomorfometria. Mesmo que a realização do procedimento seja mais exigente em termos de manuseio e incorporação da resina à amostra, a técnica pode ser bastante útil em níveis de estudo quando comparada à da

parafina, pois os resultados encontrados são mais amplos [13]. Permite uma discriminação entre o osso mineralizado e o osteoide não mineralizado, proporcionando uma preservação excepcional de estruturas ósseas e minerais.

O protocolo de incorporação de polimerização é confiável, preciso e homogêneo se comparado ao da parafina. O MMA pode penetrar de uma forma mais adequada no tecido, obtendo lâminas mais finas e convenientes para a análise. Com a penetração do MMA nos tecidos, pode ocorrer uma coloração superior com excepcionais detalhes morfológicos. Porém tal incorporação pode causar uma perda total de atividade enzimática, impedindo o uso de métodos químicos e imuno-histoquímicos [13]. Atualmente existem poucos laboratórios no Brasil que realizam a técnica de histomorfometria óssea com MMA. Contudo, apesar de ser considerado padrão ouro na avaliação de remodelação óssea, o SUS não cobre o exame, tendo em vista ser um exame de alto custo e um procedimento invasivo.

A técnica da parafina, que apresenta uma desvantagem importante – a necessidade de descalcificação óssea –, utiliza agentes quelantes e ácidos fortes em alta temperatura. Os ácidos fortes, concomitantemente à alta temperatura, aceleram a descalcificação óssea, sendo o tecido mais danificado durante o processo. Sugerem-se mais estudos sobre a técnica histomorfométrica com MMA, pois a presente revisão de literatura teve uma limitação de dados. A análise histomorfométrica na Odontologia poderia ocorrer com mais frequência para o estudo de doenças periodontais, lesões apicais, reabsorções radiculares, entre outras.

Conclusão

A histomorfometria óssea é um método de avaliação tanto da estrutura do tecido ósseo como da remodelação óssea, com muita utilidade nas pesquisas das doenças osteometabólicas. A técnica de processamento com o uso do MMA é considerada padrão ouro, por permitir uma análise mais ampla e dinâmica do tecido ósseo não descalcificado.

Agradecimentos

Nós agradecemos a todos os envolvidos neste trabalho.

Referências

- Alharbi H, Khalil W, Alsofi L, Binmadi N, Elnahas A. The effect of low-level laser on the quality of dentin barrier after capping with bioceramic material: a histomorphometric analysis. *Aust Endod J.* 2022.
- Barbosa DD, Delfino MM, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, Sasso-Cerri E, Silva GF et al. Histomorphometric and immunohistochemical study shows that tricalcium silicate cement associated with zirconium oxide or niobium oxide is a promising material in the periodontal tissue repair of rat molars with perforated pulp chamber floors. *Int Endod J.* 2021;54(5):736-52.
- Bittencourt RAC, Pereira HR, Felisbino SL, Ferreira RR, Guilherme GRB, Moroz A et al. Cultura de condrócitos em arcabouço tridimensional: hidrogel de alginato TT. *Acta Ortop Bras.* 2009;17(4):242-6.
- Canellas JVS, Costa RC, Breves RC, Oliveira GP, Figueredo CMS, Fischer RG et al. Tomographic and histomorphometric evaluation of socket healing after tooth extraction using leukocyte- and platelet-rich fibrin: A randomized, single-blind, controlled clinical trial. *J Craniomaxillofac Surg.* 2020;48(1):24-32.
- Chow DH, Zheng L, Tian L, Ho KS, Qin L, Guo X. Application of ultrasound accelerates the decalcification process of bone matrix without affecting histological and immunohistochemical analysis. *JOT.* 2019;17:112-20.
- Dalle Carbonare L, Giannini S. Histologic diagnosis of metabolic bone diseases: bone histomorphometry. *Reumatismo.* 2011;56(1):15-23.
- Dias DR, Leles CR, Batista AC, Lindh C, Ribeiro-Rotta RF. Agreement between histomorphometry and microcomputed tomography to assess bone microarchitecture of dental implant sites. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2015;17(4):732-41.
- Dourado RC, Rolim AEH, Rosa FP. Uso de marcadores fluorescentes na engenharia tecidual óssea: estudo piloto. *Rev Ciênc Méd Biol.* 2018;17(3):359-68.
- Erben RG. Embedding of bone samples in methylmethacrylate: an improved method suitable for bone histomorphometry, histochemistry, and immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem.* 1997;45(2):307-13.
- Goldschlager T, Abdelkader A, Kerr J, Boundy I, Jenkin G. Undecalcified bone preparation for histology, histomorphometry and fluorochrome analysis. *J Vi Exp.* 2010;(35):1707.
- Kim JM, Lin C, Stavre Z, Greenblatt MB, Shim JH. Osteoblast-osteoclast communication and bone homeostasis. *Cells.* 2020;9(9):2073.
- Kubek DJ, Burr DB, Allen MR. Ovariectomy stimulates and bisphosphonates inhibit intracortical remodeling in the mouse mandible. *Orthod Craniofac Res.* 2010;13(4):214-22.
- Kulak CAM, Dempster DW. Bone histomorphometry: a concise review for endocrinologists and clinicians. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2010;54(2):87-98.
- Liu H, Li W, Liu YS, Zhou YS. Bone micro-architectural analysis of mandible and tibia in ovariectomised rats: a quantitative structural comparison between undecalcified histological sections and micro-CT. *Bone Joint Res.* 2016;5(6):253-62.
- Maglio M, Salamanna F, Brogini S, Borsari V, Pagani S, Aldini N et al. Histological, histomorphometrical, and biomechanical studies of bone-implanted medical devices: hard resin embedding. *Biomed Res Int.* 2020;2020.
- Martin I, Mastrogiacomo M, Leo G, Muraglia A, Beltrame F, Cancedda R et al. Fluorescence microscopy imaging of bone for automated histomorphometry. *Tissue Eng.* 2002;8(5):847-52.
- Martins R, Cestari TM, Arantes RVN, Santos PS, Taga R, Carbonari MJ et al. Osseointegration of zirconia and titanium implants in a rabbit tibiae model evaluated by microtomography, histomorphometry and fluorochrome labeling analyses. *J Periodontal Res.* 2018;53(2):210-21.
- Mavropoulos A, Kiliaridis S, Bresin A, Ammann P. Effect of different masticatory functional and mechanical demands on the structural adaptation of the mandibular alveolar bone in young growing rats. *Bone.* 2004;35(1):191-7.
- Myllyharju J. Extracellular matrix and developing growth plate. *Curr Osteoporos Rep.* 2014;12(4):439-45.
- Panzarini SR, Gulinelli JL, Saito CTMH, Poi WR, Sonoda CK, Oliveira JA et al. Short-term vs long-term calcium hydroxide therapy after immediate tooth replantation: A histomorphometric study in monkey's teeth. *Dent Traumatol.* 2012;28(3):226-32.
- Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units: report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res.* 1987;2(6):595-610.

22. Rauch F, Travers R, Glorieux FH. Cellular activity on the seven surfaces of iliac bone: A histomorphometric study in children and adolescents. *J Bone Miner Res.* 2006;21(4):513-9.
23. Roskamp L, Vaz RS, Lima JHC. Revisão sobre os fatores imunológicos e moleculares envolvidos na reabsorção de tecido ósseo na doença periodontal. *Revista de Periodontia.* 2006;16(2):62-6.
24. Slyfield CR, Tkachenko EV, Wilson DL, Hernandez CJ. Three-dimensional dynamic bone histomorphometry. *J Bone Mine Res.* 2012;27(2):486-95.
25. Vidal B, Pinto A, Galvão MJ, Santos AR, Rodrigues A, Cascão R et al. Bone histomorphometry revisited. *Acta Reumatol Port.* 2012;37(4):294-300.