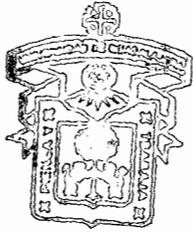


CUCBA



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

BIBLIOTECA CENTRAL

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

"ANALISIS DEL USO SELECTIVO DE TECNICAS DESCALCIFICANTES
Y SUS INDICACIONES PARA EL ESTUDIO DE LA CITOARQUITECTU
RA Y ACTIVIDAD ENZIMATICA DE TEJIDOS MINERALIZADOS".

(Investigación Bibliográfica).

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

P R E S E N T A

M A R I O R E A L N A V A R R O

Asesores: M. en C. Joaquín García Estrada
M.V.Z. Jorge Hernández Gobora

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

A G R A D E C I M I E N T O S

A MIS PADRES:

TEODULO REAL MORALES

MARIA SOLEDAD NAVARRO DE REAL

POR SU DEDICACION, ESFUERZO Y CARINO

A MIS ABUELITAS:

MARIA QUINTERIA MORALES ENCISO

MAXIMILIANA HERRERA +

A MIS HERMANOS:

BENITO

RAFAEL ENRIQUE +

MARIA DE JESUS AIDA

SILVIA ELENA

SERGIO

CARLOS ALFONSO

JAIME ALBERTO

ELOY RENE

CUCBA



BIBLIOTECA CC. RAJ

A MIS ASESORES:

M. en C. JOAQUIN GARCIA ESTRADA

M.V.Z. JORGE HERNANDEZ COBORA

CON AGRADECIMIENTO Y RESPETO

A MI ESPOSA:

MONICA ALEJANDRA TAMAYO DE REAL

POR SU PACIENCIA Y CARIÑO

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS.

A LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

Y ZOOTECNIA DE LA UNIVERSIDAD DE

GUADALAJARA.

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL DEPARTAMENTO
DE INVESTIGACION CIENTIFICA DE LA FACULTAD DE ME-
DICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA DE LA UNIVERSIDAD
DE GUADALAJARA.

1986

"ANALISIS DEL USO SELECTIVO DE TECNICAS DESCALCIFICANTES Y SUS INDICACIONES PARA EL ESTUDIO DE LA CITOARQUITECTURA Y ACTIVIDAD ENZIMATICA DE TEJIDOS - MINERALIZADOS".

(INVESTIGACION BIBLIOGRAFICA)

P R O L O G O

Ante la necesidad de someter a diferentes procesos de descalcificación los tejidos que contienen calcio, para poder realizar estudios histológicos y patológicos y por las alteraciones estructurales que resultan, se realizó el presente trabajo que tiene como propósito poner al alcance de profesores y alumnos la metodología más actualizada sobre el fenómeno de descalcificación.

Para de esta manera tener elementos de decisión respecto a la naturaleza de los tejidos y la aplicación de técnicas específicas, esto es en base al análisis de los diferentes elementos que participan en la calidad final de la preparación y las indicaciones particulares según los objetivos que se tratan de alcanzar.

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

I N T R O D U C C I O N

Para el estudio de tejidos con cierto grado de dureza es necesario emplear procedimientos especiales que nos permitan conocer su estructura fina y composición química, esto es importante cuando se tratan de determinar alteraciones patológicas tisulares, tal como las que se presentan en fracturas, hemorragias periosteales y mineralización anormal de algunos tejidos, entre las más importantes.

Para poder conseguir lo anterior es necesario preservar la organización citológica individual además de mantener las relaciones anatómicas precisas entre las diferentes estructuras y de esta forma establecer las anomalías que se presenten, para esto existen técnicas específicas de preparación y coloración del material bajo estudio.

Por otra parte, también se utilizan procedimientos de descalcificación para la comprensión de diversos fenómenos biológicos como desarrollo del sistema esquelético y dientes, reducción y reparación de lesiones óseas y modificaciones enzimáticas que ocurren durante la maduración celular entre otras.

En los últimos años se han conseguido mejoras importantes de las técnicas para preparar fragmentos de tejidos mediante descalcificación, tanto para exámenes a nivel de microscopía de luz, como para análisis con microscopía electrónica de transmisión y barrido, sin embargo, es necesario que se reúnan condiciones especiales para obtener preparaciones de buena calidad que nos permitan algún propósito particular, tal como:

- Preservar la actividad enzimática.
- Inmovilizar pigmentos que contengan hierro.
- Aumentar la afinidad tintorial de las muestras.
- Disminuir el tiempo del procedimiento.
- Preservar la integridad de algunos componentes como fibras de colágena, proteoglucanos y glucoproteínas.

Para poder conseguir lo anterior es necesario conocer la influencia de variables que intervienen en el proceso, entre las principales están:

- Duración de la descalcificación.
- Elección de fijador así como de la concentración óptima del mismo.
- Tiempo de la fijación.
- Condiciones de pH de la solución descalcificante.
- Temperatura.
- Utilización de vacío para especímenes especiales.
- Preinclusión en medios de soporte antes de iniciar el proceso de descalcificación.

La selección de las condiciones particulares más apropiadas para el tratamiento de los diferentes tejidos dependerá además del propósito que se pretende alcanzar.

El perfeccionamiento de los procedimientos de descalcificación se basa en la comprensión de los principios tradicionales donde se emplean ácidos minerales u orgánicos fuertes o débiles, entre estos se encuentran el ácido clorhídrico, ácido tricloroacético, ácido sulfuroso, etc. que pueden utilizarse en un baño electrolítico donde se eleva la temperatura como resultado del paso de una corriente eléctrica entre dos electrodos.

Los ácidos actúan como agentes que remueven el calcio de los tejidos y entre más fuerte es el ácido es más intensa la desmineralización. Como resultado de lo anterior se producen distorsiones en la estructura de los tejidos, así como disminución en la afinidad hacia colorantes. Esto no sucede con el ácido etilen-diamino tetracético (EDTA) que produce una desmineralización más lenta, por esta propiedad se le considera uno de los mejores agentes descalcificantes en investigación biomédica, razón por la cual ocupa parte importante en el presente trabajo.

J U S T I F I C A C I O N

Debido a la dificultad que existe para extraer las sustancias minerales presentes en la matriz citoplasmática celular sin alterar la naturaleza física y química de los tejidos con alto contenido mineral, y puesto que las técnicas actuales plantean la manipulación de un gran número de variantes en el tratamiento de las muestras, es necesario estudiar los principales procedimientos, así como las indicaciones especiales para cada uno de ellos con el objeto de poder utilizarlos para la obtención de preparaciones de buena calidad para diferentes propósitos de estudio en el área de morfología veterinaria.

OBJETIVOS

GENERAL:

Actualizar la información relacionada con procedimientos de descalcificación para procesamiento histológico e histopatológico.

PARTICULARES:

- I. Describir las variantes de aplicación de las técnicas de descalcificación para estudios de:
 - a) Histoquímica y citoquímica.
 - b) Histopatología.
 - c) Inmunocitoquímica.
 - d) Anatomía macro y microscópica.

- II. Seleccionar los procedimientos de preparación de muestras más convenientes en base a la disponibilidad de reactivos y equipo, así como por la facilidad y resolución que se obtiene.

- III. Proporcionar información altamente especializada en el área de morfología que permita la incorporación de las técnicas más actuales para estudiar tejidos que contengan minerales.

M E T O D O L O G I A

El presente trabajo consistió en revisar la bibliografía relacionada con el uso de agentes descalcificantes en tejidos mineralizados como dientes y huesos, y en algunos tejidos blandos anormalmente mineralizados. Se consultaron los "Index Medicus" de 10 años anteriores a 1984 utilizando las siguientes combinaciones de palabras; técnicas de descalcificación, procedimientos histológicos, desmineralización.

De la consulta de hemerotecas especializadas se obtuvo una lista de referencias bibliográficas de las cuales se seleccionaron las más relacionadas con el motivo del trabajo.

Se obtuvieron los artículos originales mediante el servicio del Centro de Investigación Científica y Humanística de la UNAM, así como mediante la solicitud directa a los autores.

Una vez con los trabajos en el idioma original se procedió a clasificarlos respecto al tipo de metodología que se utilizó, se omitieron todos aquellos procedimientos que por la instrumentación necesaria están fuera de alcance de nuestro país.

Después de lo anterior se continuó con el siguiente procedimiento:

- Traducción.
- Análisis de todos los artículos.
- Discusión particular de cada técnica y en su conjunto.
- Síntesis; el producto de esta última etapa representa el contenido principal del presente trabajo.

Para presentar la información se estructuraron los siguientes apartados;

- Subdivisión en 4 capítulos.
- Cada capítulo consta de:
 - a) Introducción
 - b) Procedimiento metodológico.
 - c) Resultados
 - d) Conclusiones generales.
 - e) Bibliografía del contenido del capítulo.

El material completo abarca 13 técnicas representativas de los procedimientos más usuales, mismas que fueron agrupadas en base a su similitud metodológica, asimismo, en la introducción de cada capítulo se hace referencia general al contenido de los diferentes trabajos, al final de cada uno de estos se presentan las conclusiones, y existe además una discusión general para cada capítulo, así como las referencias bibliográficas referentes al tema descrito.

El presente trabajo servirá como una fuente de consulta para la realización de investigaciones en tejidos que poseen minerales, así como para la documentación de estudiantes en el área de morfología microscópica que se encuentran en etapas de formación.

C O N T E N I D O

- CAPITULO 1. Técnicas de descalcificación de tejidos para estudios con microscopía de luz.
- a) Descalcificación con EDTA
 - b) Descalcificación con ácidos fuertes.
 - c) Descalcificación con ácidos débiles.
 - d) Variante de Bassolati.
 - e) Bibliografía.
- CAPITULO 2. Procedimientos histoquímicos específicos para determinación de actividad enzimática en tejidos que contengan calcio.
- a) Identificación de deshidrogenasa del ácido láctico.
 - b) Procedimientos de inmunohistoquímica.
 - c) Bibliografía.
- CAPITULO 3. Utilización de agentes descalcificantes para microscopía electrónica de transmisión y barrido.
- a) Estudios de dentina y hueso coclear.
 - b) Bibliografía
- CAPITULO 4. Control de descalcificación.
- a) Mediante espectrofotometría de absorción atómica.
 - b) Identificación directa de descalcificación mediante determinación del punto final de descalcificación.
 - c) Manejo y control de tejidos durante la descalcificación.
 - d) Bibliografía.

C A P I T U L O I

INTRODUCCION:

Existe una gran dificultad metodológica para obtener cortes de buena calidad cuando el material para estudio posee depósitos de minerales, ya que se requiere de procedimientos especiales de inclusión, por lo anterior se hace necesario remover los minerales presentes, esto produce una modificación del arreglo estructural normal, sin embargo, es posible identificar la organización primaria mediante el uso de coloraciones específicas que muestran selectividad por los diferentes componentes celulares particulares.

Con el objeto de disminuir el efecto descrito se han aplicado recursos químicos que reducen la extracción de compuestos orgánicos, principalmente proteoglucanos que están presentes tanto en matriz mineralizada y no mineralizada.

Otra aplicación de los agentes descalcificantes es para la coloración específica de mycobacterium tuberculosis, de tal manera que sea posible la identificación positiva de estos cuando se realizan estudios de diagnóstico en nódulos linfáticos de pacientes sospechosos de tuberculosis, este criterio de preservación debe aplicarse también para la identificación de patologías de origen ósteo-medular, para esto es necesario mantener la integridad de los elementos intracelulares después de someter los tejidos a tratamientos enérgicos para la extracción de minerales.

Es posible utilizar también equipo especial que facilite el trabajo de preparación de la muestra, a continuación se presentan diferentes procedimientos que por su aplicación resultan importantes para estudios histológicos normales, así como para la identificación de patologías.

TECNICA No. 1

PROCEDIMIENTO PARA LA IDENTIFICACION DE MATRIZ OSTEOIDE EN HUESO DESCALCIFICADO. S. Yoshki (1973).

En este experimento se utilizaron huesos raquíuticos de rata debido a que estos contienen una gran cantidad de matriz osteoide, para esto se alimentaron ratas con raciones bajas en calcio y deficientes en vitamina D.

Posteriormente bajo condiciones de anestesia se obtuvieron rebanadas de 3-5 mm. de espesor del peroné, la tibia y la mandíbula con dientes con el uso de una sierra. Este material se fijó por inmersión en cloruro cianúrico (Cl_2Cn) al 0.5% en metanol con morgolona N-Metil al 1.0% durante 24 a 48 horas a temperatura ambiente, posteriormente se separaron dos grupos, uno incluido en parafina sin descalcificar y el otro previamente descalcificado con EDTA al 10%.

El material proveniente de ambos grupos se seccionó a 5 μ m. de espesor en un microtomo y se tiñó con hematoxilina de Mayers y Eosina acuosa al 1%, se utilizó también el método de Hedenhains Azan y el método de Van Gieson para la tinción de fibras de tejido conectivo.

De algunos cortes del material no descalcificado se obtuvieron radiografías con película Kodak 949-0, otros cortes se montaron en portaobjetos para ser teñidos con el método Von Kossa y/o el método rojo de Alizarina para identificar la matriz mineralizada.

RESULTADOS:

Con la técnica de hematoxilina-eosina se observó consistentemente en material no desmineralizado una región trabecular periférica fuertemente eosinofílica que se podría diferenciar claramente de las regiones centrales. Esta correspondió a matriz osteoide cuando se le comparó con las microradiografías y se confirmó con las técnicas de Von Kossa y rojo de alizarina. Esta propiedad eosinofílica provocada por la fijación con cloruro cianúrico persistió aún después de la descalcificación del tejido ya que las regiones mineralizadas centrales menos eosinofílicas correspondieron también a matriz mineralizada.

cuando los cortes descalcificados se volvieron a fijar nuevamente en cloruro cianúrico y se tiñeron con hematoxilina-eosina se perdió la diferenciación tintorial.

Otros tejidos no mineralizados con matrices colágenas presentes en predentina, dientes y fibras de tejido conectivo alrededor de las trabéculas óseas aparecieron fuertemente eosinofílicos tanto en tejidos fijados descalcificados como sin descalcificar, sin embargo con el método de Heidenhain Azan y Van Gieson no se observó una coloración diferencial entre matrices mineralizadas y no mineralizadas.

CONCLUSIONES:

En huesos fijados con cloruro cianúrico la matriz osteoide se diferenció de la matriz mineralizada por su eosinofilia intensa tanto en tejidos descalcificados y normales con la técnica de H y E. El uso de esta mezcla fijadora no impide la aplicación de otras técnicas para fibras de tejido conectivo (Heidenhain Azan y Van Gieson).

Al parecer la eosinofilia de la matriz osteoide está dada por la presencia de colágena en esta, tal como ocurre en tejidos blandos.

Se recomiendan las siguientes condiciones para la aplicación más adecuada de este método:

- 1.- El material que se desea fijar debe ser del menor tamaño posible (3 a 5 Mm de espesor) y realizar la fijación por 24 a 48 horas en la solución de cloruro cianúrico debido a la escasa velocidad de penetración de éste. El material que haya sido previamente fijado en etanol se fijará nuevamente en esta solución Cl_2Cn .
- 2.- La descalcificación se realiza con EDTA amortiguado a un pH de 7.0 a fin de evitar la descalcificación ácida que impide la diferenciación tintorial.
- 3.- Deshidratar, incluir y cortar como se hace rutinariamente para otros tejidos blandos.
- 4.- Teñir con hematoxilina de Mayers 5 a 20 min., lavar y luego teñir con eosina acuosa al 1% (2 a 3 min.).
- 5.- Diferenciar con alcohol al 70% (2 a 3 min.). Este paso es importante ya que la eosina en exceso se extrae fácilmente de la matriz mineralizada pero no de la osteoide.

TECNICA No. 2

EFEECTO DE LOS AGENTES DESCALCIFICANTES EN LA COLORACION DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS. G. Anderson and A.J. Coup (1975).

Con el objeto de estudiar la forma como influyen los agentes descalcificantes sobre la afinidad tintorial de mycobacterium tuberculosis se obtuvieron nódulos linfáticos de cobayos previamente inoculados con mycobacterium tuberculosis, se fijaron en formol amortiguado y se incluyeron en parafina para utilizarlos como control.

Otros nódulos linfáticos que también fueron inoculados después de la fijación se trataron con las soluciones de Gooding y Stewart's y de Von Ebners. EDTA, descalcificador rápido y ácido nítrico acuoso. Otros bloques se amortiguaron en sulfato de sodio 0.5 M. durante toda la noche y se lavaron en agua corriente durante 6 horas antes de la inclusión en parafina. Se realizaron 3 cortes de material proveniente de cada bloque, mismos que se tiñeron con la técnica de Ziehl-Neelsen para luego ser examinados independientemente en el microscopio de luz.

RESULTADOS:

Solamente en los cortes provenientes de material descalcificado con descalcificador rápido no se observaron bacilos, sin embargo, con la tinción de contraste de azul de metilo éstos si se observaron con lo que se demuestra que no se perdió su basofilia.

El ácido clorhídrico es un componente del fijador rápido, en este estudio estaba a una concentración de 4.06 M debido a que la solución de Von Ebner contiene HCl a una concentración de 0.152 M y se observaron mycobacterium en el material tratado con ésta, se continuó el estudio con diferentes concentraciones de HCl en el descalcificante rápido durante 4 horas a una concentración de 2.5 M o mayor y no se observaron bacilos.

Un corte del grupo control se tiñó con carbol-Fuschina caliente decolorada en descalcificador rápido y luego contrastada con azul de metileno y se encontró que los bacilos se tiñeron lo que demuestra que el descalcificador rápido no altera la naturaleza de los bacilos después de que éstos se han teñido con carbol-fuschina.

CONCLUSIONES:

El Mycobacterium tuberculosis es alterado irreversiblemente por el tratamiento con la solución de HCl 2.5 M o mayor y posteriormente estos no se observan con Ziehl Neelsen.

Se recomienda que los tejidos de pacientes sospechosos de tuberculosis no deben ser preparados para el estudio histológico con descalcificador rápido.

TECNICA No. 3

VARIANTE DE DESCALCIFICACION DE BASSOLATI

A. BADINI AND ET AL., (1981)

Para demostrar la efectividad de esta técnica se prepararon 16 biopsias osteo-medulares, el uso de aparatos en procedimientos de descalcificación tiene por objeto preservar la organización celular que frecuentemente se altera cuando se utilizan ácidos fuertes como agentes desmineralizantes, éstos impiden también una coloración adecuada de las preparaciones histológicas de tal forma que la interpretación de las mismas es incierta al encubrirse la apariencia de las lesiones. En el presente trabajo se trataron de reconocer los elementos presentes en la médula hematopoyética de los tejidos seleccionados.

En el método de descalcificación propuesto por Bassolati el calcio de la matriz ósea será extraído por el efecto del ácido pícrico y ascético que están presentes en una solución de Bouin, bajo condiciones de intercambio iónico, el líquido se hace circular mediante una bomba peristáltica.

Este procedimiento da buenos resultados y es además menos costoso que el de inclusión de la biopsia ósteo-medular en metacrilato.

RESULTADOS:

Después de haber descalcificado con este aparato las biopsias de tejido ósteo-medular con tiempos variables entre 24 y 48 horas se observaron resultados comparables. La dificultad de mantener la solución de Bouin a una temperatura constante de 38° C se resolvió al sumergir el vaso de precipitado en un baño de flotación una de las características de particular importancia que se debe tener en cuenta es el espesor de la biopsia o material por descalcificar.

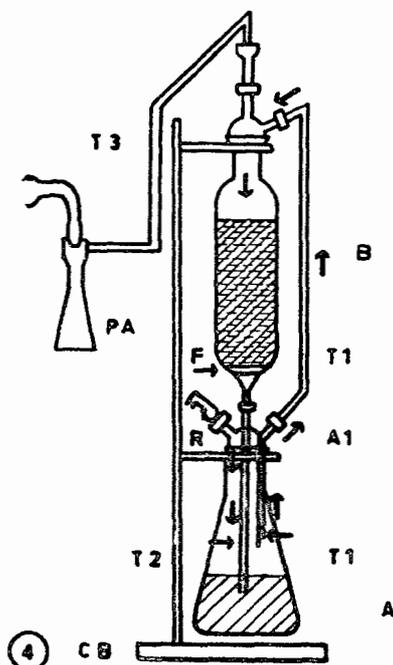
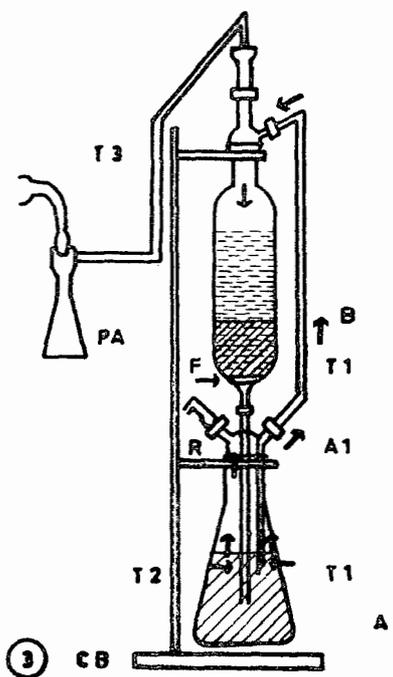
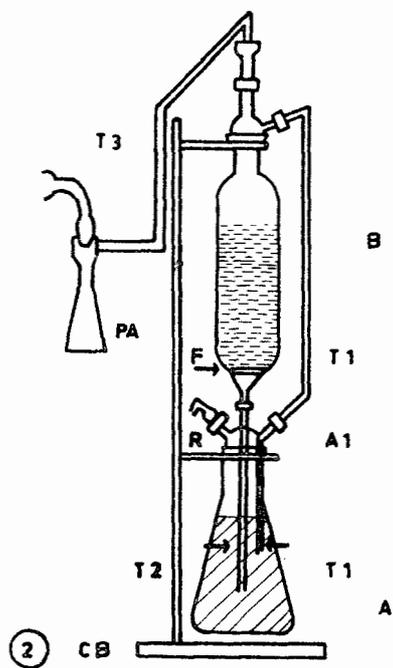
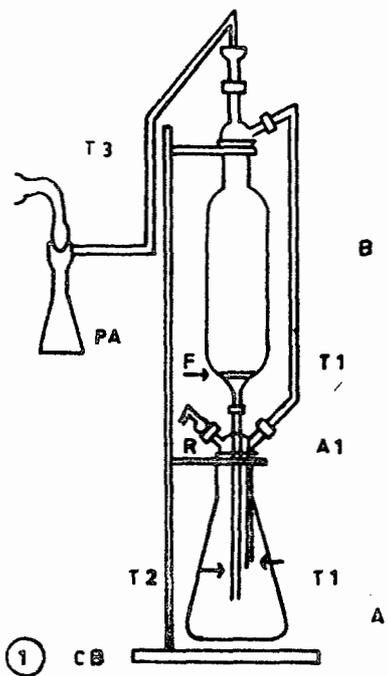
DESCRIPCION DEL EQUIPO:

El equipo se compone de dos bases de vidrio A y B, éstas están sobrepuestas en el mismo eje, y entre ella comunicadas por dos entubaciones T_1 y T_2 , sostenidas con soportes metálicos y una base (CB), y unidas por T_3 a una bomba de agua para vacío (Fig. # 1), "A" de capacidad de 400 cc, - el cual contiene líquido de Bouin débil (según la fórmula de Bassolati, el nivel está indicado en la Fig. #2 introducidos los tejidos óseos a - descalcificarse, a través del tapón de vidrio esmerilado (A_1): El vaso A comunica al exterior por el tubito R por lo tanto el líquido se encuentra a presión atmosférica.

El vaso B con capacidad de 600 cc contiene resina iónica Amberlite 120, (el nivel está indicado en la figura # 2). Un filtro poroso (F) de material plástico impide la caída de la resina en A.

FORMA DE OPERACION:

- 1.- El líquido sale de A, donde tenemos presión atmosférica, a B por el efecto del vacío producido por la bomba de agua (PA) del tipo Karttel - 1935 conectada a la entubación T_3 (Fig. # 3).
- 2.- La afluencia en B se verifica inicialmente por los tubos T_1 y T_2 , - colocados a diferentes profundidades en A (Fig. # 3).
- 3.- A la que el desflujo de A en B hace descender el nivel del líquido al de abajo del tubo T_1 de éste viene aspirado el aire y por lo tanto - se restablece la presión atmosférica en B (Fig. # 4).
- 4.- Desflujo del líquido de A en B a través de T_2 .
- 5.- Aumento del nivel en A sobre el tubo de T_1 .
- 6.- Nueva formación de vacío en B.



TECNICA No. 4

EFECTO DE VARIOS AGENTES DESCALCIFICANTES SOBRE LOS PROTEOGLUCANOS PRESENTES EN CARTILAGO.

E. IPPOLITO, SHIRLEY LA VELLE AND V. PEDRINI (1981).

Para realizar el presente trabajo se utilizaron epífisis femorales de hu manos recién nacidos sin anomalías del esqueleto, éstas se obtuvieron mediante autopsia que se realizó 5 horas después de la muerte.

Se adquirieron septum nasales de bovinos inmediatamente después del sacrificio de estos animales. Las epífisis distales se cortaron en dos mitades en planos sagitales a nivel del corte intercondilar, cada una de las mitades contenía metáfisis del hueso, placa de crecimiento distal, cartílago epifisiario, y centro secundario de osificación de la epífisis distal. Cada muestra pesó 2.5 grs. y midió 7 X 18 X 23 mm. aproximadamente.

El septum nasal se cortó en piezas de 5 X 15 X 2 mm. y pesó de 2 g. Las muestras se fijaron durante 46 horas en formaldehído al 10% amortiguado en fosfatos 0.1 M pH 7.4 y se lavaron durante toda la noche en agua corriente. Las soluciones descalcificantes empleadas se describen en la tabla No. 1, todos los agentes químicos fueron de grado analítico.

Las muestras se envolvieron en gasas y la descalcificación se realizó a temperatura ambiente bajo agitación constante en 250 ml. de solución, éstas se cambiaron cada 24 horas.

Se tomó una placa radiográfica de la epífisis distal antes de comenzar la descalcificación y posteriormente cada 24 horas una vez iniciado el proceso hasta completarlo.

Las soluciones descalcificantes que estuvieron en contacto con el tejido óseo fueron recolectadas y congeladas a 20° C. Las muestras de cada solución se dializaron en grandes volúmenes de agua destilada durante 48 - horas a 4° C para eliminar ácidos y sales de calcio.

El contenido de hexuronato de las soluciones dializadas se determinó de acuerdo con el método de Bitger y Murr (1962). Las muestras de tejidos descalcificados se lavaron durante la noche en agua corriente, se deshidrataron en series crecientes de etanol para luego ser aclaradas en cloroformo y embebidas en parafina.

Cortes de 7 μ m. de espesor se tiñeron con hematoxilina-eosina y 0.14 de azul de alciano en amortiguador de acetatos de 0.01 M a pH de 5.8 en presencia de $MgCl_2$ 0.2 M para teñir compuestos sulfatados selectivamente.- Para la tinción nuclear se utilizó hematoxilina de Harris.

RESULTADOS:

Tiempo de descalcificación: Las epífisis femorales distales tratadas con ácido fórmico al 5% estaban completamente descalcificadas después de 3 días mientras que el DECAL, ácido nítrico al 5% y ácido sulfosalicílico al 6% se realizó la descalcificación en 4 días. Los especímenes tratados con EDTA al 5% estaban completamente descalcificados en 10 días -- mientras que la descalcificación en EDTA neutro al 15% requirió de 28 - días.

Resultados Histológicos: Los cortes teñidos con hematoxilina y eosina no mostraron ninguna diferencia entre los agentes descalcificantes, los tejidos estaban bien preservados y no se observaron artificios.

Resultados Histoquímicos: Una positividad fuerte y uniforme del azul de alciano se observó en los cortes de la placa de crecimiento femoral distal descalcificada en ácido fórmico al 5%. Se observó una ligera disminución en la alcianofilia de la zona calcificada de la placa de crecimiento descalcificada en EDTA neutral al 15% los cortes de la placa de crecimiento descalcificada con ácido nítrico al 5% y ácido sulfosalicílico al 6% tuvieron la misma disminución moderada de la alcianofilia que fue particularmente evidente en la zona de proliferación.

Solamente una muy débil alcianofilia permaneció en los cortes de las placas de crecimiento descalcificadas en DECAL o en EDTA al 15%.

La positividad al azul de alciano fue muy uniforme en los cortes del septum nasal de bovinos cuando se trataron con ácido fórmico al 5% o EDTA neutral al 15%. Tanto el ácido sulfosalicílico al 6% y ácido nítrico al 5% causaron una ligera disminución en la afinidad al azul de alciano en la matriz extraterritorial mientras que se observó una considerable y - uniforme disminución en la alcianofilia en los cortes tratados con EDTA o DECAL al 15%.

Resultados Bioquímicos: La descalcificación con ácido fórmico al 5% resultó en la extracción de solamente cantidades mínimas de moléculas que contenían hexuronatos de la epífisis distal humana.

El tratamiento con EDTA al 15% extrajo cantidades mayores pero todavía - aceptables de hexuronatos de la epífisis femoral distal con EDTA al 15% neutral.

Cuando los tejidos fueron descalcificados en ácido nítrico al 5% o ácido sulfúrico al 6% aumentaron los proteoglucanos perdidos. Las cantidades mayores de hexuronato se extrajeron por DECAL y por EDTA no amortiguado al 15%.

CONCLUSIONES:

El ácido fórmico al 5% es el más rápido y seguro de los agentes descalcificantes que se probaron.

Al analizar la relación que existe entre la determinación de hexuronatos solubilizados y la pérdida de alcianofilia en los cortes de tejidos descalcificados se comprueba que el ácido fórmico produce una pérdida mínima de proteoglucanos de las preparaciones.

TABLA No. 1

COMPOSICION Y pH DE LAS SOLUCIONES DESCALCIFICANTES.

SOLUCION		pH
Acido fórmico	5 %	2.0
EDTA Neutral *	15 %	7.0
Acido nítrico	5 %	1.4
Acido sulfosalicílico	6 %	1.0
EDTA (Buffer) *	15 %	10.8
DECAL **		0.4

* Sal tetrasodium de ácido ethilenediaminotetracético.

** Omega Chemical Corporation, Cold Spring, NY. Su composición es:
Acido hidroclicórico, max. 9.5% por peso en agua; agente chela--
ting ión de calcio catalítico.

TABLA No. 2

GLUCOSAMINOGLUCANOS EXTRAIDO POR SOLUCIONES DESCALCIFICANTES.

SOLUCION		EPIFISIS DISTAL FEMORAL HUMANA *	SEPTUM NASAL BOVINO
Acido fórmico	5%	0.036	-
EDTA neutral	15%	0.732	-
Acido nítrico	5%	1.230	3.600
Ac.sulfocalicílico	6%	1.970	4.962
EDTA	15%	6.101	10.174
DECAL		7.160	14.461

* Los valores expresados equivalen a miligramos de hexuronato por gramo de tejido húmedo, obtenidos de dos especímenes comparados debido a la presencia de hueso y cartilago calcificado en la - epífisis distal femoral humana.

DISCUSION

Este capítulo nos indica que en huesos fijados con cloruro cianúrico la matriz osteoide se diferencia claramente de la matriz mineralizada por su eosinofilia intensa, este aumento en la matriz osteoide parece ser debido a la reacción del componente colágeno no mineralizado con el cloruro cianúrico durante la fijación.

No deben usarse agentes descalcificantes que contengan ácidos fuertes, en la preparación de tejidos de pacientes sospechosos de tuberculosis, en los cuales se trate de diagnosticar dicha enfermedad.

Las modificaciones realizadas por A. Badini y colaboradores al descalcificador de Bassolati son aceptables ya que se redujeron los costos con resultados semejantes a la técnica original.

En los proteoglucanos, las cadenas glucosaminoglucan están covalentemente unidas al núcleo de proteínas, portadoras de un gran número de cargas negativas que se unen fuertemente al colorante catiónico Azul de Alciano, éste comúnmente se usa para la demostración histoquímica de estas moléculas, por lo tanto dicho tinte es el indicado para la identificación de los proteoglucanos.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- A. BADINI, L. FAZZUOLI, M. TRUINI, A. VITALI (1981).-
Su una variante del Decalcificatore di Bussolati.
Pathologica 73, 281-285
- 2.- BUSSOLATI G.:(1978)
A fixation-decalcification procedure for bone -
biopsies Histopathology 2:329-334
- 3.- CHARMAN, J. AND REID L. (1972)
The effect of decalcifying fluids on the staining
of epithelial mucins by Alcian Blue. Stain - -
Technol 47:173-178.
- 4.- CULLING, C.F.A. (1974).
Handbook of histopathological and histochemical
techniques, 3rd. edition. Butterworth, London.
- 5.- E. IPPOLITO, SHIRLEY LA VELLE AND V. PEDRINI. (1981)
The effect of various Decalcifying Agents on Car-
tilage Proteoglycans.
Stain Technology 56, 6,367-372.
- 6.- G. ANDERSON AND A.J. COUP. (1975).
Effect of Decalcified Bone
Stain Technology 48, 5, 233-237
- 7.- HERRING, G.M., ASHTON, B.A. AND CHIPPERFIELD, A.R. (1974).
The isolation of soluble proteins, glycoproteins
and proteoglycans from bone. Prep. Biochem.
4: 179-200.

- 8.- LOHMANDER, S. (1975).
Proteoglycans of guinea pig costal cartilage. Fractio
nation and characterization. Eur. J. Biochem. 57:549-559
- 9.- MAYER, P.C. (1956).
The histological identification of osteoid tissue. J.
Path., 71: 325-333.
- 10.- NAVONE R., ROSSI M.:
La biopsia ossea nella diagnóstica clínica ematológica.
Accademia di Medicina di Torino, 14. 12. 79.
- 11.- NAVONE R., (1980).
Nuova técnica di decalcificazione del tassello osseo
per l' esame del midollo. Atti del II Congresso Nazional
e S. A.P.O.I., Bergamo.
- 12.- PUCHTLER, H., MELOAN, S.N., AND TERRY, M.S. (1969).
On the history and mechanism of alizarin and alizarin
red S stains for calcium. J. Histochem. Cytochem., -
17: 110-124.
- 13.- SUDA, T., DE LUCA, H.F., AND TANAKA, Y. (1970).
The biological activity of 25-hydroxyergocalciferol.
J. Nutr. 100: 1049-1052.
- 14.- SCHAJOWICZ, F. AND CABRINI, R.G. (1955).
The effect of acids (decalcifyng solutions) and enzymes
on the histochemical behavior of bone and cartilage. J.
Histochem. Cytochem. 3: 122- 129.
- 15.- SCOTT, J.E. AND DORLING, G.J. (1965).
Differential staining of acidic glycosaminoglycans (mu-
copolysaccharides) by Alcian Blue in salt solution. His
tochemie 5: 221-133.

16.- S. YOSHIKI. (1973).

A simple histological method for identification of osteoid matrix in decalcified bone.

Stain technology 48, 5, 233-237.

17.- TRIPP. E.J., AND MACKAY, E.H. (1972).

Silver staining of bone prior to decalcification for quantitative determination of osteoid sections.

Stain Technol., 47: 129-136.

C A P I T U L O I I

I N T R O D U C C I O N:

La necrosis del hueso es una importante entidad clínica que se presenta en muchas situaciones patológicas. Un osteocito muerto parece ser sinónimo - de un hueso muerto, de lo que puede deducirse que la examinación histológica del material de biopsia podría ser definitiva.

La actividad del lactato dishidrogenasa (LDH) ha sido cuantificada post- - mortem para delinear un miocardio normal y diferenciarlo de un necrótico - después de un infarto al miocardio. Este capítulo describe una técnica pa - ra la demostración de la viabilidad de osteocitos por medio de la identifi - cación histoquímica de la actividad del LDH en cortes frescos de huesos y descalcificados.

Los efectos de la descalcificación en la inmunoactividad de tejidos fija-- dos con formalina han recibido poca atención aunque los componentes fijati - vos contienen ácido acético parecen ser efectivos en preservar antígenos - de tejidos en forma detectable sin tratamiento de enzimas, mencionamos un estudio para determinar la influencia del ácido fórmico y el ácido acético dos agentes descalcificantes usados comúnmente, sobre la inmunoreactividad de tejidos incluidos en parafina y previamente fijados en formalina.

TECNICA No. 5

ESTUDIO DE LA VIABILIDAD DEL HUESO MEDIANTE LA DETERMINACION HISTOQUIMICA DE LA ACTIVIDAD DE DESHIDROGENASA LACTICA EN CORTES FRESCOS DE OSTEOCITOS DE HUESO HUMANO CALCIFICADOS Y DESCALCIFICADOS.

STANLEY AND ET AL (1982).

Se utilizaron cabezas femorales de pacientes con artritis ósea en la cadera, los huesos se mantuvieron en solución salina fisiológica a 4° C hasta el momento de ser aserrados, el proceso duró 3 días y no se observó una pérdida aparente de la actividad enzimática. Se estudiaron cortes y material molido, así como fragmentos trabeculares.

a) Cortes aserrados y molidos.

Con un microrebanador se obtuvieron cortes verticales de las cabezas femorales de 200 μ m. de espesor utilizando para esto una navaja de diamante y una velocidad de 150 rpm. Algunos cortes se molieron a 75 μ m en un plato molidor de vidrio. Para otros estudios adicionales se obtuvieron elementos de la médula ósea mediante un limpiador a presión con solución salina.

b) Fragmentos trabeculares.

Del hueso sobrante de la cabeza femoral se cortaron fragmentos de 2-4 mm. de espesor, se molieron a 50 μ m., los cortes molidos se descalcificaron mediante inmersión en EDTA frío al 10% durante la noche disuelto en amortiguador frío 0.1 M pH 7.0.

COLORACION:

Se utilizó la reacción de reducción de Tetrazolio-formazan para la demostración de la actividad de deshidrogenasa, los mejores resultados se obtuvieron con azul nitro-tetrazolium. El pH se ajustó a 7.2 con hidróxido de sodio 0.1 mol/l. Las muestras de hueso se incubaron en un medio recién preparado a 37° C por 4 horas, posteriormente se fijaron mediante inmersión en formol al 10% amortiguado en solución salina por 10 min. y se deshidrataron en series crecientes de etanol para finalmente montarse en un medio a base de etileno.

Variaciones de la técnica:

- 1.- Uso de cortes calcificados (se omitió la etapa de descalcificación).
- 2.- Sustratos:
Sodio-1. Malato para malato deshidrogenasa Succinato de sodio - deshidrogenasa succinica.
Isocitrato trisódico - Isocitrato deshidrogenasa.
Estos fueron substituidos por lactato de litio.
Se usaron partes de los 4 sustratos en todas sus posibles combinaciones para determinar la importancia de la actividad de una sola enzima sobre el desarrollo de color en la reacción.
- 3.- Se emplearon sales de tetrazolium a diferentes concentraciones.
- 4.- Período de incubación, además del estandar de 4 h. se usaron otros períodos de 1/2, 1, 2, 8 y 16 horas.
- 5.- Adición de metasulfato de fenazina para facilitar el transporte de electrones entre NADH y sales de tetrazolium.
- 6.- Prefijación con acetona. Mediante inmersión durante 20 min. a 3° C antes de la tinción, de esta forma se evita que se produzca una falsa coloración al reconocer las grasas que reaccionan con formazan.
- 7.- Se usó polivinilpirrolidona (79) ya que debido a su alto peso molecular (11000) reduce la difusión de enzimas y productos de reacción.
- 8.- Dimetilsulfoxido - actúa aumentando la permeabilidad celular a nivel de membrana plasmática y de organelos.
- 9.- Sustitución del amortiguador frio en lugar del amortiguador de fosfatos.

Validación:

Los cortes se incubaron:

- 1.- Después del calentamiento (80°C por una hora).
- 2.- En medio sin sustrato.
- 3.- En medio sin NAD.

RESULTADOS:

Cortes serrados: El citoplasma de casi todos los osteocitos se tiñó de un color azul brillante.

Los canalículos en los osteocitos se tiñeron ligeramente, la médula ósea - se tiñó intensamente las lagunas óseas solamente se pudieron observar en - contraste de fases. La remoción de la médula ósea facilitó el estudio de los cortes, cuando se tiñeron restos celulares de color azul se oscureció la superficie trabecular.

Fragmentos trabeculares.

Se logró una apariencia semejante a la de cortes serrados. Los osteocitos se mantuvieron intactos. En el material calcificado se tiñeron solamente los osteocitos localizados dentro de los 15 μ m. de la superficie del corte.

Cuando se agregó metosulfonato de finazina al corte calcificado se tiñeron los canalículos de los osteocitos, la adición de esta substancia a mate -- rial descalcificado produjo artificios de coloración en osteocitos.

Los mejores resultados en términos de intensidad de la coloración se consiguieron con el uso de cloruro de ditetrazolio como colorante reactivo y - lactato como sustrato que dio la coloración más intensa. Cuando se modificó la concentración de sustrato o sales de tetrazolio o se usaron sustratos combinados no se mejoró la intensidad de la coloración.

El cloruro de ditetrazolio confirió un color bastante fuerte, sin embargo este fue negro por lo que no resultó adecuado, cuando se utilizó cloruro - de tetrazolio fue necesario incluir sales de cobalto para quitar el formazan y evitar su difusión desde el sitio de la reacción y además se produjo tinción artificial de lípidos con este reactivo.

El citoplasma de los osteocitos se tiñó en cortes descalcificados después de 30 min. de incubación y la intensidad máxima se logró a las 4 horas el tiempo tuvo que prolongarse hasta 10 horas con material calcificado, no hubo alteraciones significativas con la introducción del resto de las variables.

CONCLUSIONES:

- 1.- La mayoría de los osteocitos que se estudiaron fueron viables.
- 2.- Debe usarse tejido fresco para poder evidenciar la reacción ya que el formaldehído suprime las enzimas respiratorias.
- 3.- No es indispensable que se realice la descalcificación, sólo se requiere más tiempo con el material calcificado.
- 4.- La técnica es sencilla y útil para el diagnóstico de patologías donde está afectado el metabolismo óseo mediante biopsia.

TECNICA No. 6

INFLUENCIA DE LA DESCALCIFICACION SOBRE LA TINCION INMUNOHISTOQUIMICA DE TEJIDO FIJADO EN FORMALINA E INCLUIDO EN PARAFINA.

J.B. MATTHEWS (1982).

Con frecuencia sucede que se tienen tejidos fijados y procesados sin haber previamente establecido la necesidad de realizar pruebas de tipo inmunohistoquímico, actualmente se sabe que la formalina y los procedimientos habituales de preparación del tejido pueden encubrir la inmunoreactividad de una amplia variedad de antígenos por haber sucedido digestión del material por proteasas antes de la inmunotinción.

Algunos especímenes que poseen componentes duros deben descalcificarse con soluciones diluidas de ácidos orgánicos o minerales, los efectos de la descalcificación sobre la inmunoreactividad de tejidos fijados con formalina han sido poco estudiados, al parecer el ácido acético parece ser útil para preservar antígenos tisulares sin tratamiento enzimático.

En el presente trabajo se estudió la influencia del ácido fórmico y acético, (dos sustancias comúnmente empleadas como agentes descalcificantes) sobre la inmunoreactividad de tejidos incluidos en parafina y fijados en formalina.

MATERIAL Y METODOS:

Se obtuvieron cortes de 2 a 3 mm. de espesor de amígdala palatina, se fijaron en formalina neutra amortiguada por 18 horas a temperatura ambiente, luego los tejidos se sometieron indistintamente a:

- Deshidratación con etanol (8 horas) y xileno (8 horas) para luego ser incluidos en Ralwax (3 horas).
- Descalcificación con ácido fórmico acuoso al 10% (6-120 horas).
- Descalcificación con ácido acético acuoso al 10% (6-120 horas).
- O bien en soluciones descalcificantes de adquisición comercial. DECAL (18 y 42 horas).

Cal-Ex (18 y 42 horas) a temperatura ambiente con agitación suave. Después del lavado en agua corriente por 6 horas los especímenes tratados se incluyeron en parafina Ralwax.

Se obtuvieron cortes de 3 μ m. de espesor, éstos fueron secados y desparafinizados con xileno (3 x 3 μ m.) y rehidratados en series decrecientes de etanol antes de la inmunotinción, se mantuvieron en amortiguador Trishill 0.05 M con solución salina a un pH de 7.6, este se utilizó para la tripsinización y dilución de reactivos.

Se practicó el método de complejo anticuerpos no marcados peroxidasa-anti-peroxidasa con tejidos intactos y tiempos para cada muestra de antisuero, fueron las siguientes.

IgG, IgA y IgM antihumana de conejo (1:11000).

Lisozima antihumana (1/400) 1h.

Ig. anticonejo de cerdo (1/50) 30 mm.

Complejo peroxidasa-antiperoxidasa (1/50) 30 min.

Ocasionalmente se utilizó Diaminobencida para aumentar la intensidad de la coloración en el último.

Los controles se formaron por la omisión de los estratos primarios y secundarios, reemplazo de antisuero primario por suero normal de conejo y en algunos casos inhibición específica de IgG, IgA, IgM mediante preincubación del antisuero proteico antihumano con antígeno purificado. Para la identificación subjetiva de células positivas en folículos y áreas extrafoliculares además de la preservación de estructuras histológicas se encubrió la identidad del material.

RESULTADOS:

El tejido tratado con ácido fórmico reveló un aumento variable en el número de células positivas cuando se tiñó sin previa tripsinización. Solamente después de la tripsinización se obtuvieron resultados adecuados en tejidos que no se trataron con ácidos.

El material tratado con ácido fórmico requirió períodos más cortos de tripsinización (digestión) para lograr la inmunoreactividad máxima con preservación de la citoarquitectura.

Todos los tejidos después de una digestión adecuada presentaron resultados semejantes en cuanto a:

Número de células positivas

Intensidad de la coloración.

Detección de antígenos extracelulares.

Tinción de fondo de colágena y reticulina.

Y en caso de IgM la tinción aparente de la superficie celular de los linfocitos formadores del "capping" de cada folículo linfoide.

Cuando se utilizó diaminobencidina se consiguió aumentar la intensidad de la coloración sin que aumentara la cantidad de células positivas.

El ácido acético produjo esencialmente cambios semejantes en la inmunoreactividad del tejido, con una menor susceptibilidad a la digestión con tripsina.

Los cortes que no se trataron con tripsina y que se descalcificaron con las soluciones comerciales se tiñeron pobremente. Sin embargo la inmunoreactividad podría desarrollarse de manera similar a la que se consiguió con el ácido fórmico, la desventaja de estos agentes fue la ausencia de tinción azul nuclear con hematoxilina de Mayer.

CONCLUSIONES:

La descalcificación de tejidos con soluciones acuosas al 10% de ácido acético y fórmico durante períodos de 5 días después de la fijación en formalina amortiguada no altera la inmunoreactividad.

DISCUSION:

En los diferentes estudios presentados se mostró la realización de pruebas histoquímicas para el establecimiento de diagnóstico tal como la viabilidad de osteocitos en rebanadas de hueso fresco, así como trabajos encaminados a conocer los métodos de fijación y descalcificación más adecuados para poder realizar inmunohistoquímica, entre las sustancias que demostraron su utilidad se identificó al ácido acético y fórmico, estos pueden actuar en combinación con la formolina como agentes que preservan la actividad enzimática tisular.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- BROZMAN M, BROZMANOVA E. (1966).
Immunocytochemical methods to localise hormones in the human adenohypophysis.
Commun Czechoslov Soc. Histochem Cytochem 1: 25-30.
- 2.- BRODY G.L. BELDING W. A. BELDING, R.M. & FELDMAN, S.A. (1967).
The identification and delineation of myocardial infarcts.
Arch. Pathol. 84, 312-317.
- 3.- CURRAN RC. GREGORY J. (1977).
The unmasking of antigens in paraffin sections of tissue by trypsin. *Experientia* 33: 1400-1
- 4.- DENK H. RADAXZKIEWICZ T. WEIRLICH E. (1977).
Pronase pretreatment of tissue sections enhances sensitivity of the unlabelled antibody enzyme (PAP) technique. *J. Immunol Methods* 15: 163-7.
- 5.- D'AMEROSIA, R.D., SHOKI, R.S. ET AL (1978).
Scintigraphy in the diagnosis of osteonecrosis. *Clin. Orthop* 130: 139-143.
- 6.- FISHER, D.E. & BICKEL, W.H. (1971).
Corticosteroid induced avascular necrosis. A clinical study of seventy-seven patients. *J. Bone Joint Surg. (Am.)* 53A, 859-873.
- 7.- GLIMCHER, M.J. & KENZORA, J.E. (1979).
The biology of osteonecrosis of the human femoral head and its clinical implication: III Discussion of the etiology and genesis of the pathological sequelae: comments on treatment. *Clin. Orthop.* 140, 173-312.

- 8.- HUANG SH. (1975).
Immunohistochemical demonstration of hepatitis B. core and surface antigens in paraffin sections. Lab. Invest. 33: 88-95.
- 9.- J.B. MATTHEWS (1982).
Influence of decalcification on immunohistochemical staining of formalin fixed paraffin embedded tissue.
Technical Method 1392-1394.
- 10.- KENZORA, J.E., STULE, R.E., YOSIPOVITCH, A.H. & CLIMCHER, M.H. (1978).
Experimental osteonecrosis of the femoral head in adult rabbits. Clin. Orthop. 130, 8-46.
- 11.- MEFHAM BL. FRATER W. MITCHELL BS. (1979).
The use of proteolytic enzymes to improve immunoglobulin staining by the PAP technique. Histochem J. 11: 345-57.
- 12.- PEARSE, A.G.E. (1972).
Histochemistry, Theoretical and applied, 3rd. ed., Vol. 2 -
Churchill Livingstone, London, pp. 880-961.
- 13.- PRITCHARD, J.H. (1956).
General anatomy and histology of bone. In the Biochemistry and Physiology of bone, 1st ed, Ed. G.H. Bourne. Academic press. New York, pp. 1-23.
- 14.- STANLEY, Y.P. WONG C.R. DUNSTAN, R.A. EVANS AND E. HILLS (1982).
The determination of bone Viability: A. Histochemical Method for identification of lactate Dehydrogenase activity in osteocytes in fresh calcified and decalcified section of human bone. Pathology 14, 439-442.

CAPITULO III

INTRODUCCION :

Con el objeto de aumentar la capacidad de resolución de los estudios estructurales que se realizan en material óseo y cartilaginoso se recurre al uso de equipo sofisticado tal como el microscopio electrónico de transmisión y barrido, así como espectrofotometro de difracción de rayos X, el microscopio electrónico de barrido permite precisar la ubicación y arreglo tridimensional de los depósitos de Fosfato de Calcio de tal manera que se puede obtener mejor información sobre la ocurrencia de fenómenos fisiológicos, ésto se aplica principalmente para estructuras que sufren modificaciones importantes en relación con la edad de los dientes, entre los materiales presentes en éstos, de mayor interés se encuentra la dentina, glucoproteinas, proteoglicanos, para su estudio se requiere de procedimientos especiales de fijación y tratamiento de las muestras que proporcionan en los tejidos características adecuadas para este tipo de estudios y su inclusión en resinas, condición necesaria para lograr cortes de 50-60 μ m. de espesor en los cuales es posible establecer las relaciones que guardan los componentes tisulares entre sí, por lo anterior descrito se deben considerar condiciones especiales para el uso de agentes descalcificantes, lo cual es motivo de este capítulo.

TECNICA No. 7

FENOMENO DE PRECIPITACION QUE SE ORIGINA DURANTE LA PREPARACION DE CORTES -
DESMINERALIZADOS. EXAMEN CON MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO DE DEPOSI--
TOS SECUNDARIOS DE FOSFATO DE CALCIO.

R.S. DHARIWAL AND ET AL (1976).

Se ha establecido que durante la desmineralización de dientes con ácido fórmico al 10% se produce la precipitación de fosfato de calcio secundario.

El examen de estos depósitos en la dentina reveló que la precipitación se -
presenta en el lumen de los tubulós dentinales, lo anterior no se podía de--
mostrar a pesar del uso de técnicas de difracción de rayos X y microradiogra-
fías razón por la cual se recurrió al uso de microscopia electrónica de ba-
rrido lo cual fue el motivo del presente trabajo.

MATERIALES Y METODOS:

Se examinaron en un microscopio electrónico de barrido cortes de 200 μ m. de espesor obtenidos a partir de dientes que fueron incompletamente desmineralizados en ácido fórmico al 10%, éstos revelaron una endo-opacidad dentinal semejante a una pluma, se encontraron fracturados en una dirección estrictamente paralela a la que siguen los tubos dentinales. Uno de los fragmentos se montó en una rejilla de orificios amplios, mediante evaporación se cubrió - con paladio y oro y se examinó en un microscopio electrónico de transmisión antes y después del grabado por 2 h. con un haz de 40 μ ma. con iones de argon con un promedio de energía de 4 kev.

Se obtuvieron patrones comparativos de difracción de rayos X áreas seleccionadas cercanas al eje de la fractura empleando para ésto un segundo fragmento complementario.

RESULTADOS:

Se resumen en la tabla No. 3 en esta se correlacionan los hallazgos obtenidos con los tres tipos de diferentes técnicas y en la Fig. No. 5 se presenta un diagrama de las diferentes regiones observadas en la microradiografía.

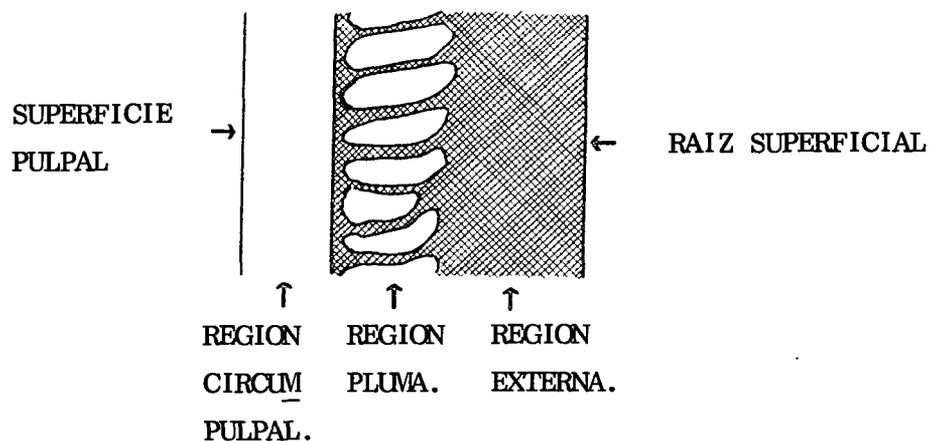
TABLA No. 3: SUMARIO DE LA MICRORADIOGRAFIA, EXAMINADO EN EL MICROSCOPIO ELECTRONICO EXPLORADOR Y RAYOS X. RESULTADOS DE DIFRACCION A LO LARGO DE LA FRACTURA, CORTADO DE SECCIONES DE DIENTES.

REGION DEL DIENTE	MICRORADIOGRAFIA.	EXAMEN EN EL MICROSCOPIO ELECTRONICO.	DIFRACCION DE RAYOS X.
Pared pulpal	Radiopaco	Esferolitis en tubul _o s pulpa _r es vacios.	Hidroxiapatita Brushita.
Circumpulpal	Radiopaco	Tubulos vacios	Hidroxiapatita
Pluma	Radiopaco	Tubulos llenos con material resistente al grabado con agua fuerte.	Brushita, Monenita y algo de Hidroxia _p atita.
Externa	Relativamen _t e radio lu _c ido.	Tubulos vacios.	Hidroxiapatita.

Se examinaron las siguientes áreas en las micrografías: superficie pulpal, región circumpulpar, región con aspecto de pluma, región externa y superficie de la raíz.

FIGURA No. 5:

DIAGRAMA DE LAS DIFERENTES REGIONES EXAMINADAS EN EL MICROSCOPIO ELECTRONICO.



Sobre la superficie pulpal de la dentina en los cortes del fragmento se encontraron depósitos de cristales esferulíticos y parcialmente esferulíticos, la dimensión más pequeña de estos cristales fue generalmente - mucho mayor que el diámetro de los tubulos dentinales. Los tubulos en la región de la dentina circumpulpar estaban notablemente vacios, debido a que en esta región de la dentina la microradiografía estaba radio-opaca y el patrón dominante de difracción de Rayos X corresponden al de hidroxiapatita se concluyó que esta capa está compuesta por tejido no - mineralizado.

Dentro de la dentina, en la región de radiopacidad semejante a una pluma - los túbulos estaban frecuentemente llenos con un depósito aparentemente - sin estructura resistente al grabado ionico que tendió a fracturarse en diferentes planos a partir de la matriz circundante. En esta región en dos de los dientes el patrón de difracción de Rayos X indicó la presencia de - cristales de brunita arregladas en una orientación casi paralela pero tam- bién con una orientación dispersa, también estaba presente hidroxiapatita.

En el otro diente los cristales estaban compuestos de mononita arreglada - casi enteramente al azar. En el área de fractura a través de la región de la pluma se hicieron evidentes túbulos fracturados tanto transversal como longitudinalmente en el mismo campo. En la región más externa por debajo de los depósitos en forma de pluma los túbulos estaban vacíos, microradio- gráficamente la dentina estaba relativamente radiolucida pero todavía con- tenía algunos residuos minerales que estaban distribuidos irregularmente.

Principalmente en la dentina coronal se hicieron evidentes variaciones li- neales en la radio opacidad, paralelas a las líneas de crecimiento incre- mental, mientras que la raiz estaba presente con frecuencia una capa de ra- dio-opacidad aumentada en la dentina externa junto a la unión cementodenti- nal, ésta se identificó como hidroxiapatita.

CONCLUSIONES:

Se comprobó la presencia de depósitos minerales dentro de los túbulos den- tinales y estos eran compuestos de cristales de Fosfato de Calcio secunda- rio. Debido a que no se encontró continuidad estructural entre los depósi- tos esferolíticos pulpaes y los túbulos dentales es posible afirmar que - los contenidos tubulares tienen una tendencia a favorecer la formación de depósitos intraluminares.

El material mineral presente en la dentina es un componente resistente al ácido.

TECNICA No. 8 :

DESCALCIFICACION ELECTROLITICA DE COCLEAS DE CABALLO PARA ESTUDIOS MORFOLOGICOS DE ULTRAESTRUCTURA.

SILVA AND ET AL (1977).

Se utilizaron 20 cocleas de caballos adultos de ambos sexos después de la decapitación, la extirpación se realizó mediante incisión de la piel con exposición de la bulla timpánica y después de la ruptura de ésta.

El procedimiento de decapitación con guillotina facilitó el estudio ya que las piezas se encontraban desangradas, en promedio tres minutos después de haber sacrificado al animal el material estaba listo para su procesamiento histológico.

Para el estudio inicial con microscopia de luz mediante inclusión del material en parafina las cocleas se lavaron con solución salina fisiológica al 5%, se fijaron con Buin durante 12 horas y en seguida se sometieron al proceso de descalcificación, después de esto las cocleas se sumergieron en alcohol al 20% por un día y luego se deshidrataron en series crecientes de etanol hasta la inclusión en parafina. Se obtuvieron cortes de 7 μ m. que luego se tiñeron con feulgen, hematoxilina-eosina, fulgen y galocianina.

Para realizar estudios con microscopia electrónica se fijó el material con glutaraldehído al 2% amortiguado en fosfatos 0.02 M pH 7.2 Debido a que las cocleas no pueden procesarse enteras por su tamaño, se seleccionó la región del modiolo o ganglio espiral de Corti. Este se obtuvo después de retirar el envoltorio externo de la coclea y de separar la primera, segunda y tercera de las capas y dejar el modiolo con tres espirales.

Después de la fijación por 2 horas e glutaraldehído a temperatura ambiente el proceso continuó con la posfijación en tetraxido de osmio al 1% amortiguado en fosfatos con la adición de 126 mg/ml. de sacarosa, una vez terminada esta posfijación el material se lavó en solución glucosada para luego practicar la descalcificación.

Las fuerzas osmóticas de las soluciones que se utilizaron fue la siguiente:

Solución salina glucosada 333 Mosm/l

Glutaraldehído 358 Mosm/l

Uranil 312 Mosm/l

Solución de ácido tricloroacético 175 Mosm/l

Después de la descalcificación el procedimiento de preparación del material para microscopia electrónica consistió en lavar las cocleas en solución salina al 9% con la adición de sacarosa, éstas se contrastaron con solución acuosa de acetato de uranilo al 0.5% con 126 mg. de sacarosa/ml. de solución. La deshidratación se realizó mediante el paso a través de series crecientes de etanol y éter de propileno para luego incluir el material en Araldita. El material fue estudiado tanto a nivel de microscopia de luz como microscopia electrónica y en el primer caso el modiólo se orientó paralelo al plano de corte con la coclea completa, para ultraestructura se incluyó por separado el modiólo.

La descalcificación se realizó durante 2, 3, 24, 48 y 72 horas utilizando para ésto un descalcificador electrolítico, se modificó la técnica inicial (Goncalvez y Cols) al utilizar un agitador magnético que permite el movimiento constante de las soluciones sin tener que reemplazarlas, con esto se evita también la saturación del medio por el material removido de las piezas.

Se usó un voltaje de 25 V. y 50 mA con solución de ácido tricloroacético 0.1 M y un volumen proporcional al peso de la pieza con relación 3:1.

RESULTADOS:

Con los diferentes tiempos empleados se obtuvieron grandes variaciones en el proceso de descalcificación, ésto se hizo notable al verificar la resistencia del material óseo. Desde las dos horas ya era posible procesar las piezas para estudio a nivel de microscopia de luz, para microscopia electrónica se obtuvieron los mayores resultados después de 4 horas de descalcificación.

No se produjeron variaciones en la composición de la solución descalcificadora, tampoco se observaron agitaciones bruscas.

Los estudios se realizaron a temperatura ambiente entre 21 y 27° C.

En las micrografías electrónicas se observaron algunas mitocondrias edematizadas probablemente debido al contacto previo con medio hipotónico durante el proceso.

CONCLUSIONES:

Con la metodología utilizada fue posible el estudio de cocleas bajo condiciones óptimas de preservación estructural ya que se consiguió reducir el tiempo de descalcificación y por lo tanto la producción de artificios.

El uso del descalcificador electrolítico no requirió de aparatos complicados.

Para esto el efecto osmótico observado se debe ajustar la solución descalcificadora a 330 Mosm/l para esto se agregan 2.75 de glucosa/l.

El método aquí utilizado puede aplicarse a otras estructuras del sistema nervioso que poseen áreas de calcificación, principalmente para valorar efectos de fármacos desde un punto de vista estructural.

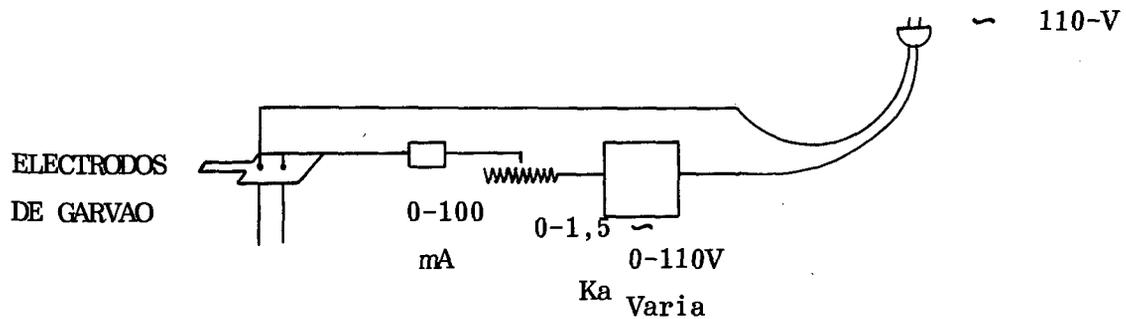


FIG. No. 6 Esquema del montaje del descalcificador con resistencia colocada en serie para voltaje de 25 V cuando la corriente era de 50 mA usando dos electrodos de garvao en solución.

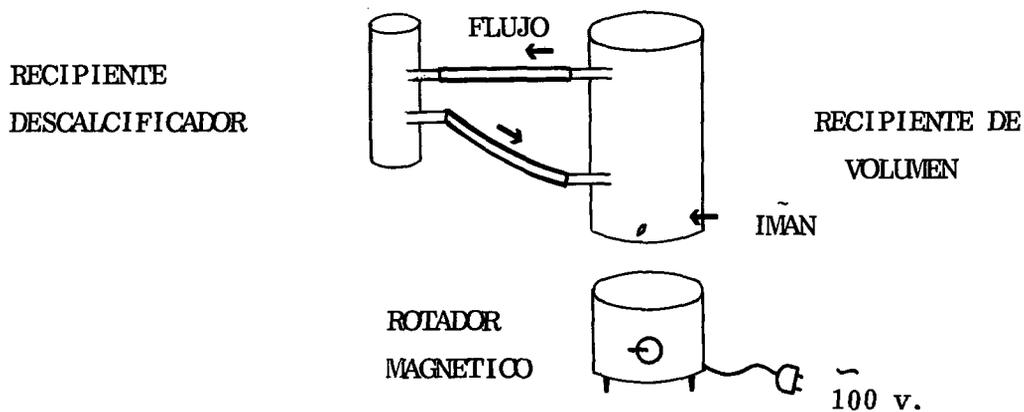


FIG. No. 7 Montaje del recipiente de volumen, acoplado con el recipiente descalcificador por medio de 2 tubos de Gorracha, teniendo el recipiente de volumen un agitador magnético en su interior que permite debido a la circulación de agua que fueron hechos, cambiar el volumen al recipiente descalcificador cada 5 minutos de acuerdo con el sentido indicado por las flechas, no siendo necesario mudar de recipiente la solución descalcificadora no interrumpiendo el proceso.

DOS METODOS DE DESMINERALIZACION Y SUS EFECTOS EN LA PRESERVACION DE GLUCO-
PROTEINAS Y PROTEOGLUCANOS EN LA DENTINA INTERCANALICULAR Y PERICANALICULAR
EN EL CABALLO.

M. GOLDBERG. AND ET AL (1980).

Con el uso de soluciones ácidas como el EDTA se consigue desmineralizar tejidos calcificados con un grado aceptable de preservación estructural en el material cortado y examinado, aparecen también componentes matriciales como la colágena, sin embargo desaparecen las glucoproteínas casi en su totalidad, al igual que los proteoglucanos lo que imposibilita el estudio histológico de estas sustancias. La asociación simultánea del fijado, la solución desmineralizante y los colorantes catiónicos aumenta la retención de los compuestos señalados aunque no completamente.

Por lo anterior se han propuesto recientemente dos métodos de desmineralización que permiten una mayor preservación del material orgánico labil. Estos se basan en el uso de material de inclusión (resinas Epon 812) antes de la desmineralización del material con ácido fórmico, EDTA y sal de alquilamonio.

Se emplearon dientes en los cuales regularmente se observan dos tipos de dentinas: Intercanalicular y Pericanalicular, esta última desaparece regularmente después del proceso de desmineralización, bajo condiciones de preparación rutinaria se observó en esta región una rama orgánica de apariencia labil, por esta razón este tipo de tejido permitió evaluar la efectividad de los métodos de descalcificación, motivo del presente trabajo.

MATERIAL Y METODO:

De cadáveres frescos se obtuvieron 20 molares e incisivos que fueron cortados con discos de diamante a nivel de la corona y fracturados con pinzas, - los fragmentos se deshidrataron en series crecientes de etanol y se evaporaron con una capa de oro-paladio de 300Å de espesor, se hicieron las observaciones en un microscopio electrónico Jeol a 20 Kv.

Se observaron otras muestras de 2 a 3 µm. de espesor que se fijaron en una solución de glutaraldehido formaldehido amortiguada en cacodilato de sodio 0.1 M pH 7.2 y postfijadas en OsO₄ al 2% durante 30 min. a temperatura ambiente.

Se establecieron tres procedimientos:

- Inclusión en resina Epon y cortes sin desmineralización.
- Inclusión de Epon cápsulas para luego eliminar el exceso de la resina que cubre el tejido y desmineralizar durante 24 hrs. en una mezcla de ácido fórmico al 2% en solución de Paraformaldehido al 4%.
- Desmineralización de cilindros de dentina en una solución de EDTA y solución etanolítica de sal de alquilamonio e inclusión en Epon.

De cada uno de los grupos se obtuvieron cortes ultra-finos para el análisis bajo las siguientes condiciones:

- 1.- Contraste con acetato de uranilo en solución alcohólica saturada por 10 min.
- 2.- Coloración con azul de alciano al 1% en ácido acético al 3%.
- 3.- Después de flotar en solución de agua oxigenada a 10 volúmenes durante 20 min. para eliminar el osmio, los cortes se trataron con una mezcla de ácido fosfotungstico al 1% en ácido crómico al 10%. Estas preparaciones también se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión de la misma marca.

RESULTADOS:

En el microscopio electrónico de barrido se hicieron evidentes los anillos de dentina pericanalicular con un aspecto denso y homogéneo que contrasta con la dentina intercanalicular con apariencia más fibrosa e irregular. - En la dentina pericanalicular se observaron numerosos canales secundarios transversos.

Aspecto de la dentina con el microscopio electrónico de transmisión.- En las preparaciones no desmineralizadas la dentina pericanalicular apareció densa y se observaron sub-unidades globulares de 30 μm . La dentina intercanalicular mostró finos cristales en forma de haces y dispuestos a lo largo de las estructuras fibrosas subyacentes, el espesor de estos cristales varió de 3 a 4 μm . con una longitud superior a 60 μm . (Figura No. 8).

Con la mezcla PTA_{CR} se contrastó una red de fibras de colágena en la dentina intercanalicular así como algunos restos de material orgánico en el lumen de los canalículos. La red parece estar formada por material amorfo repartido de forma homogénea al parecer sin relación con las fibras de colágena.

Con la tinción de azul de Alciano aparece una red fibrosa con algunos granulos, en la dentina intercanalicular el colorante catiónico contrastó estructuras granulares de 10 a 20 μm . de diámetro.

Después de la desmineralización de bloques previamente incluidos las preparaciones contrastadas con acetato de uranilo mostraron algunos cristales residuales en la dentina intercanalicular en esta apareció una red densa bastante homogénea a manera de una malla rodeando los espacios de 22 a 33 μm . de diámetro. (Fig. No. 9).

Con el azul de alciano se contrastaron claramente granulos de 12 a 20 mm. presentes en la dentina intercanalicular y asociados a las fibras de colágeno, se observó una red orgánica bien disimulada en la dentina pericanalicular, esta estaba formada por estructuras fibrosas finas asociadas a granulos y formando una malla.

La mezcla PTA-CR contrastó en la dentina pericanalicular un material orgánico con distribución similar a la anteriormente descrita. En la dentina intercanalicular resaltaron claramente las fibras de colágena. (Fig.No.10).

Después de la desmineralización con una solución alcohólica de EDTA las zonas totalmente desmineralizadas colindaban con otras que todavía contenían material inorgánico, por lo menos en los tiempos en que se realizó el estudio a las 24, 48 y 72 hrs. No se observó una transmisión entre los dos estados, contrariamente a lo que se observó con el método anterior.

En cortes donde se produjo una desmineralización completa se observó el material labil sin alteraciones aunque la preservación fue de menor calidad a la que se alcanzó con el método anterior.

En la dentina intercanalicular aparecieron granulos residuales la substancia interfibrosa se observó muy bien contrastada a nivel pericanalicular - se apreció una red fina contrastada parcialmente con azul de alciano como con ácido fosfotúngstico.

CONCLUSIONES:

- 1.- Los métodos empleados en este estudio para mejorar la preservación de proteoglucanos y glucoproteinas demostraron ser de utilidad, ambos se basaron en la inclusión del material en resinas Epon 8 hrs. antes de la desmineralización.
- 2.- Al preservar el material orgánico fue posible identificar claramente el arreglo y la organización del material orgánico y estructuras mineralizadas.

3.- El uso de solución de ácido fórmico al 2% permitió una adecuada preservación de elementos lábiles que regularmente se deforman o desaparecen por efecto de otros tratamientos.

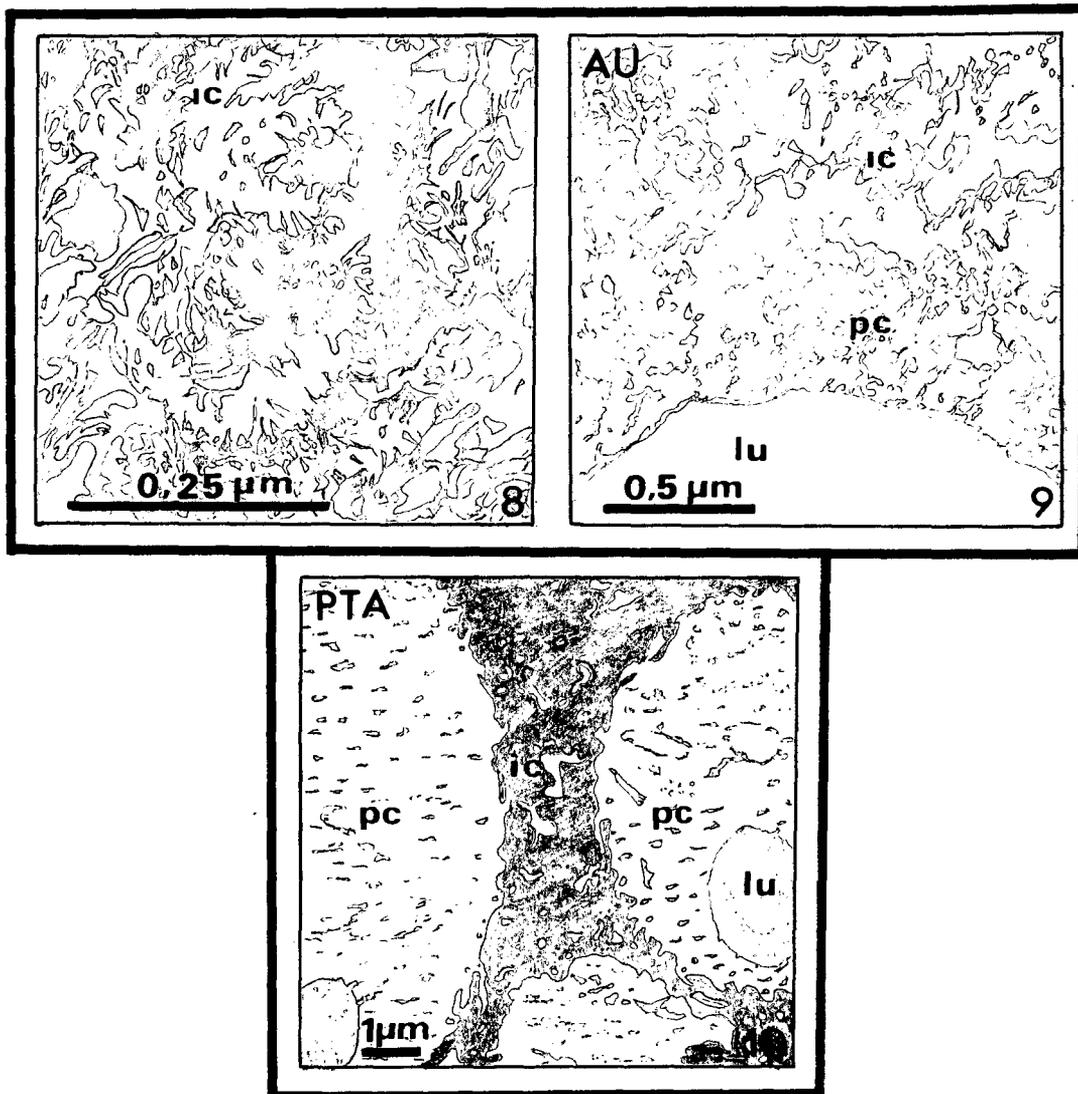


FIG. # 8: Aspecto de los cristales de la dentina intercanalicular, agrupados en ~~vezes~~ a lo largo de las fibras colagenas o dispuestos en pares en los espacios situados entre fibras. Preparación no desmineralizada y no contrastada X 120 000.

FIG. # 9: Al mayor aumento se nota la persistencia de algunas estructuras de tipo mineral en la dentina intercanalicular (IC). En la dentina pericanalicular (PC) se observa un fino material en-

... tre los espacios vacios de aproximadamente 30 mm. Acetato de uranio.
X 45000.

FIG. No. 10 Corte de material no desmineralizado, tratado con la mezcla fosfotúngstica crónica (PTA).

La dentina intercanalicular (IC) presenta fibras de colágeno bien contrastadas. La luz (Lu) contiene un material amorfo. En la dentina pericanalicular (PC) se observa un material cuyo aspecto de bandas resulta de la vibración en el momento del corte. Sin embargo, se nota la densidad de este material más o menos fibroso y granular. X 9000.

DISCUSION:

En este capítulo (#III) en la primer técnica mencionada se observaron las diferencias en, tamaño de cristal y composición química, se consideró para tales un promedio diferencial. Además, ciertas estructuras parecen ser más resistentes que otras; en particular esto se nota en la dentina cerrada a la unión cemento dentina y relacionado a las líneas de incremento de la corona del diente.

Mientras tanto, en la segunda técnica observamos como Johnson discute la necesidad de estudios a nivel de microscopía electrónica para certificar al respecto la delicada morfología y clasificación de las arterias "Radiata y Sealavestibuli" pues teniendo células musculares lisas, regularizan el flujo sanguíneo, no sólo de "Strias vasculares" como también del ligamento espiral.

La técnica de extracción del modiollo interno no presentó alteración en cuanto a la parte orgánica se refiere la técnica de Johnson que deja una base de cartílago sobre la vuelta basal como soporte del oído interno, durante la disección.

Después de la discusión se concluye en que es necesaria esta base de cartílago para retirar la coclea de caballo.

En la última técnica vemos que los dos métodos de desmineralización propuestos, tienden a una mayor preservación del material lábil, por lo tanto las técnicas propuestas mejoran la retención de la fracción orgánica desmineralizándola después de haber sumergido los bloques en alguna resina (Araldita o Epon), con la ayuda de una solución de ácido fórmico asociado o no a paraformaldehido 2 y se observa que se puede limitar la propiedad de compuestos hidrosolubles utilizando una solución orgánica de EDTA sal de Alquimonio.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- BONUCCI E. AND GHERALDI B.- (1975).
Histochemical and electron microscope investigations on medullary bone.
Cell Tiss. Res., 163; 81-97.
- 2.- BONUCCI E. AND REURINK.- (1978).
The fine structure of decalcified cartilage and bone: a comparison between decalcification procedures performed before and after embedding. Calcif. Tiss. Res., 25; 179-190.
- 3.- BRADFORD E.W.- (1951).
The interpretation of ground sections of dentine. Brit. - Dent. J., 90: 303-308.
- 4.- BROWNE R.M. AND ROWLES S.L. (1975).
A reprecipitation phenomena arising during the preparation of demineralised sections.
I. Histological and X-ray diffraction observations.
Stain Technol. 50: 179-185.
- 5.- BIUGAN, O.; LEITAO, F.B.P.; MINITI, A.; ADISSY, L.; ASSUNCAO, M.T.; PAIVA, L.J. (1975).
Entude experimental de l'influence du de hidrobenzoperidola l'electrocochleografie chez cobaye.
- 6.- CHARIWAL R.S., FITHC R.K., LAVELLE, C.L.B. AND JOHNSON G.A. (1976).
Artefacts observed on dental tissues during ion etching in a scanning electron microscope Journal of Anatomy, In press.
- 7.- DI MUZIO M.T. AND WEIS A. (1978).
Phosphophoryns-major non collagenous phosphoproties from bo vine dentin. Calcif. Tiss. Ress., 25: 169-178.

- 8.- DE CASTRO & MUNDELEER, P. (1962).
Dehidrobenzoperidol e pnentanyl. Deux anesthesiques nouveaux que apportant de nouvelles possibilites a la neuroleptanage sis. Ier. Congres Europeen d'Anesthesiologia Vienne.
- 9.- HAWKINS Jr., J.E. & JOHANSSON, L.G. (1968).
Light microscopie observation of the inner ear in man and - monkey.
Ann. Otol., 77: 608.
- 10.- M. GOLDBERG: M. MOLON NOBLOT ET D. SEPTIER (1980).
Effets de deux Méthodes de demineralisation sur la préserva tion des glycoproteines et des protéoglycanes dans les den tines intercanaliculaires et pericanaliculaires chez le che val. Jour biol. Buccale, Vol. 8 pp. 315-330.
- 11.- R.S. DHRIWAL AND ET AL (1976).
Reprecipitation phenomena arising during the preparation of Demineralised section III. Scanning electron microscopie - examination of secondary Calcium phosphate Deposits. Stain technology 51 (6) 293-299.
- 12.- ROWLES S.L. AND BROWNE R.M. (1975).b.
Reprecipitation phenomena arising durin the preparation of demineralised sections II. Experimental observations. Stain Technol. 50: 186-195.
- 13.- SILVA, A.F. DA E COL (1977).
Decalcificação electrolítica de cócleas de cobaio para estu dos morfológicos e ultra estruturais.
Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo. 32(2): 107-110.

CAPITULO IV

INTRODUCCION :

En la preparación de material calificado se provocan alteraciones de los componentes presentes por lo que para obtener trabajos de mayor calidad y disminuir el porcentaje de error producto de los artificios metodológicos deben realizarse técnicas que faciliten el manejo y preservación estructural, esto es particularmente difícil cuando se procesan varias muestras simultáneamente.

Por otra parte, en el establecimiento de diagnósticos en determinadas patologías que provocan solamente escasas alteraciones morfológicas debe definirse con precisión el punto óptimo de descalcificación en que se encuentra la muestra para así evitar el contacto innecesario entre la muestra y el líquido descalcificante, esto puede conseguirse con el auxilio de exámenes espectrofotométricos y químicos a los cuales nos referimos en el presente capítulo.

TECNICA No. 10

PORCENTAJE DE EXTRACCION DE CALCIO DURANTE LA DESCALCIFICACION DE REBANADAS DE HUESO CON EDTA, DETERMINACION CON ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCION ATOMICA.

I.KIVIRANTA AND ET AL (1980).

Se sabe que ácidos minerales y orgánicos fuertes y débiles al igual que -- amortiguadores ácidos con descalcificantes rápidos entre más fuerte es el -- ácido es más vigorosa la desmineralización, los agentes quelantes como el EDTA provocan una remoción lenta del calcio.

Los desmineralizadores ácidos distorsionan las fibras de colágena y dificultan la tinción, esto no sucede con el EDTA que parece ser de los mejores -- agentes descalcificantes razón por la cual se emplea en trabajos de investigación tanto a nivel de luz como en ultraestructura.

Por lo anterior el presente trabajo tuvo por objeto registrar la velocidad de extracción del calcio en rebanadas de hueso de 300 μ m a 2 μ m de espesor con la ayuda de un espectrofotómetro de absorción atómica, se probaron diferentes variables como:

- A).- Concentración del agente descalcificante.
- B).- Temperatura.
- C).- Espesor de las rebanadas.
- D).- pH.
- E).- Agitación y volumen de la solución descalcificante.

MATERIAL Y METODOS:

Se emplearon huesos femorales, tibia y humero de conejo Nueva Zelanda de 2 a 3 meses de edad.

Se anestesiaron los conejos y se les sacrificó por introducción de 30-50 ml. de aire en el sistema venoso, se diseccionaron los huesos y se cortaron rebanadas de un microtomo. Los cortes se fijaron en formaldehído al 4% amortiguado en fosfatos 0.1 M durante 48 hrs. o en glutaraldehído al 2% en cacodilato de sodio 0.1 M pH 7.4 durante 20 a 74 horas los huesos fijados en formaldehído permanecieron de 7 a 14 días antes del corte.

Agentes descalcificantes:

El EDTA se usó como sal disódica disuelta en amortiguadores ácidos a pH 3.15 estos fueron formiato y ácido fórmico, se usó también una mezcla de lactato y ácido láctico a pH 3.70

EXPERIMENTO:

Las condiciones experimentales se muestran en la tabla No. 4 los cortes se colocaron en el medio descalcificador en una rejilla de plástico, los medios descalcificadores con EDTA o los amortiguadores ácidos se cambiaron a las 12 horas, 24 horas, 3, 5 y 7 días el compuesto nuevo "DECAL" se cambia a los 15, 30 y 60 min. 2, 4 hrs.

Al finalizar el tratamiento los cortes se lavaron en acetona en dos cambios de 10 min. se secaron a 110° C de temperatura y se disolvieron en 0.5 ml. de H₂SO₄ al 50% luego se agregó gota a gota agua oxigenada al 30% hasta obtener una solución clara. El calcio presente en el líquido descalcificador, restos de hueso y los lavados con acetona se determinaron en el espectrofotómetro de absorción atómica, no se encontró calcio en la acetona.

RESULTADOS:

La concentración de EDTA en el medio desmineralizado se relaciona directamente con la velocidad de extracción del Ca. de los tejidos, la extracción es rápida al principio, a las 12 hrs. se determinó un 58, 75 y 85% de Ca de las soluciones al 4.8 y 15% de EDTA la descalcificación se completó en 5 días con un 4% en 3 días con un 8% y en 2 días con EDTA al 15%.

La elevación de la temperatura aumentó la velocidad de extracción y ésta fue de 37° C y 60° C con lo que se removió un 95 y 100% respectivamente en 24 hrs. en comparación con la cantidad que se obtuvo a 20° C y 4° C en ambos casos el Ca estaba completamente extraído al tercer día.

Para la descalcificación de cortes gruesos se requirió un tiempo mayor por el contrario los cortes más delgados quedaron desprovistos de Ca en 24 hrs. (300 ~~µm.~~), los de 0.5 mm en 2 días, 2 días para los de 1 mm y 5 días para los de 2 mm.

A un pH de 7.4 el promedio de descalcificación fue más lento que a pH de 5.0 y 8.5, la velocidad de extracción no mejoró; por la agitación del medio descalcificador a 20° C tampoco tuvo un efecto significativo el volumen del medio.

La relación molar entre la cantidad de EDTA disódico y Ca en las primeras 12 horas de permanencia en el medio extractor se presenta en la tabla No.5, no se consiguió aumentar la velocidad de extracción del Ca con el uso de altas concentraciones de EDTA, el efecto fue semejante al que se observó con concentraciones habituales.

Los amortiguadores ácidos extrajeron Ca más vigorosamente que el EDTA.

CONCLUSIONES:

Mediante espectrofotometría de absorción atómica es posible determinar la velocidad de descalcificación de fragmentos de hueso.

	EDTA	TEMPERATURA	PH	REBANADAS GRUESAS	VOL
Concentración	4, 8, 15%	4° C	7.4 ^a	500 μ m	15 ml.
Temperatura	8%	4° C 20° C			
		37° C, 60° C	7.4 ^a	1 mm	30 ml.
Agitación ^b	8%	20° C	7.4 ^a	1 mm	30 ml.
pH	8%	20° C	5.0 ^c 7.4		
			8.5	1 mm	15 ml.
Rebanadas gruesas de hueso	8%	4° C	7.4	300 μ m 500 μ m 1.2 mm	30 ml.
Volumen del medio descalcificador	8%	20° C	7.4	1 mm	5, 15, 50, 100 ml
K Formato/Acido fórmico		20° C	3,15,30		
			30	1 mm	15 ml.
Na Lactato/Acido Láctico		20° C	3.70,		
			3.90	1 mm	15 ml.
Nuevo Decalc		20° C	0.9	1 mm	15 ml.

TABLA No. 4 Esquema general del experimento de desmineralización.

- a.- La unidad del valor final del pH de cada período de tratamiento fue 7.7
- b.- En un disco giratorio modelo TC-4, New Brunswick Scientific Co. New Brunswick NJ. USA
- c.- El valor final de pH en cada tratamiento fue 5.3, 7.7 y 8.75 respectivamente.

TABLA No. 5: Valor de disociación EDTA/Ca de la relación molar durante las primeras doce horas de descalcificación.

VOLUMEN	EDTA/Ca
5 ml	2.2
15 ml	4.7
50 ml	21.8
100 ml	68.7
(8% EDTA)	
GROSOR	
300 μ m	19.5
500 μ m	19.5
1 mm	11.9
2 mm	15.4
(8% EDTA VOL. 30 ml)	
TEMPERATURA	
4° C	11.9
20° C	10.0
37° C	6.6
60° C	6.4
(8% EDTA VOL. 30 ml)	
CONCENTRACION	
4 %	5.3
8 %	9.0
15 %	27.5
(VOL. 15 ml).	

TECNICA No. 11

EXAMEN QUIMICO PARA DETERMINACION DEL PUNTO FINAL DE DESCALCIFICACION CON EDTA.

D.J. SEILLY (1972).

El EDTA se introdujo como un agente descalcificante para histopatología desde hace 30 años, con la disminución del pH por la adición de hidróxido de sodio se obtuvieron resultados superiores a los de descalcificantes convencionales, esto evitó la hidrólisis tisular, los efectos de este agente se valoraron mediante rayos X, las pruebas químicas se basan en la presencia de iones de Ca libres en solución, existe un procedimiento con el uso de oxalato de amonio para determinar el punto final de descalcificación con EDTA, esta técnica consiste en la disminución del pH de la solución de prueba por debajo de 5.0 con el uso de un amortiguador, bajo estas condiciones del Ca, al agregar un exceso de oxalato.

El principio de esta técnica consiste en desplazar al Ca. del complejo por la adición de iones férricos presentes en el amortiguador, la turbidez que resulta por el exceso de oxalato indica la cantidad de Ca presente.

Sol.- No. 1.- EDTA neutral: (0.48 mol/l).

Este agente se prepara con EDTA (Sol. disódica) o alternativamente EDTA (ácido). A) EDTA (Sol. disódica 161 g. disueltos en 800 ml. de agua destilada. La solución se examina dentro de un rango estrecho de pH y se ajusta a $\text{pH } 7.0 \pm 0.5$, por la adición de Hidróxido de sodio. B).- EDTA (ácido) - 140 g. Hidróxido de Sodio 38 g.

El método de preparación es el mismo antes mencionado excepto que el hidróxido de sodio es primero disuelto en 800 ml. de agua destilada y el EDTA es disuelto y añadido.

Puede usarse cualquier concentración de EDTA con molaridad conocida.

Sol.- No. 2.- Cloruro Férrico: (0.48 mol/l). Cloruro Férrico (Anhidro) - 7.8 g. es disuelto en agua destilada 100 ml.

La solución de Cloruro Férrico acuoso preparado puede ser de la misma molaridad que la de EDTA.

Col.- No. 3.- Control positivo; Cloruro de Ca (0.005 mol/g) en EDTA neutral: Cloruro de calcio (Anhidro) 0.1 g. es disuelto en la solución No. 1 en 200 ml.

Sol.- No. 4.- Oxalato de amonio acuoso saturado.

Todas las soluciones (excepto la de oxalato de amonio) deben filtrarse para la preparación. Aunque la solución de cloruro férrico es inestable, debe ser filtrada antes de usarse, esta tiene una vida media de por lo menos 3 meses.

PROCEDIMIENTO DEL EXAMEN.

- 1) Tomar 2 ml. del líquido descalcificante para ser examinado en un tubo de ensayo.
- 2) El pH debe ser de 7.0 ± 0.5 , si es necesario ajustar ácido clorhídrico o hidróxido de sodio.
- 3) Añadir 2 ml. de solución de cloruro férrico y mezclarlo.
- 4) Añadir 6 ml. de oxalato de amonio acuoso saturado, mezclar bien y dejar en reposo.
- 5) Examinar el tubo después de 20 min.

Si el punto final de la descalcificación ha sido alcanzado la solución volverá clara.

La presencia de alguna turbiedad en la solución muestra que la descalcificación es incompleta. Los controles positivos y negativos pueden acompañar a cada serie de exámenes: estos se preparan por sustitución de 2 ml. de solución No. 1 y solución No. 3 para el líquido descalcificante usado precedente en el paso 1.

El calcio en la solución de control positivo será suficiente para formar una turbidez o precipitación detectable.

Estudios experimentales indican lo siguiente:

(A) El examen es confiable para detectar calcio en EDTA neutral bajo concentración de 0.005 mol/G (B) La sensibilidad del examen no está afectada por la concentración de EDTA usado en la descalcificación puesto que la solución de cloruro férrico usada es de igual molaridad.

EVALUACION PRACTICA.

Después de haber realizado la prueba se puede comprobar la efectividad de la misma mediante el estudio histopatológico, así mismo puede establecerse una correlación mediante el uso de rayos X.

CONCLUSION:

La prueba química para determinar el punto final de descalcificación con oxalato de amonio permite asegurarse fácilmente que se ha alcanzado el punto final de descalcificación en diversos tejidos.

TECNICA No. 12

DETERMINACION DEL PUNTO FINAL EN LA DESCALCIFICACION CON EDTA USANDO OXALATO DE AMONIO.

ALLEN D. ROSEN (1981).

En este experimento se utilizaron muestras de hueso trabecular o cortical - los cuales para ser descalcificados deben ser cortados cerca de 1 X 1 X 0.5 cm. ordenados y fijados en formalina al 10%, amortiguados en fosfato, pH - 7.0, por 24 horas. La muestra se coloca en un frasco con 5 ml. de EDTA al 10%, pH 7.0 con NaOH. Después de 24 horas 0.5 ml. de solución de EDTA descalcificante debe retirarse del frasco para examinarla y colocarla en un tubo de ensayo; después se añade 1.0 ml. de amortiguador fosfato citrato -- (0.20 ácido cítrico, 0.16 M Fosfato Potásico Dibásico, pH 3.2 - 3.6) y 2.5 ml. de Oxalato de amonio acuoso saturado en el tubo de ensayo.

Si el Ca está presente en el tubo de ensayo, se formará un precipitado blanco turbio. (Un examen positivo para calcio, un examen negativo para el punto final). Una solución clara después de 20 min. indica la ausencia de calcio detectable en el líquido descalcificante.

Si el examen de la muestra es positivo para Ca, el hueso debe ser lavado - con agua destilada y la solución en el frasco debe ser reemplazada con solución de EDTA fresca. Después de 24 horas otros 0.5 ml. del líquido del -- frasco deben retirarse y examinarse como se indica arriba. Este procedimiento debe ser repetido diariamente. Si se obtienen un resultado negativo para Ca, el hueso no debe lavarse y el líquido del frasco no debe ser cambiado, este debe ser examinado al día siguiente. Dos exámenes negativos sucesivos para Ca, son considerados un examen positivo para el punto final.

El efecto que ejerce el EDTA durante el proceso de descalcificación es me--diante quelación, es necesario asegurarse de que se ha completado la descalcificación, para esto se ha utilizado el análisis con rayos X así como por la determinación de la dureza al tacto.

Una prueba sencilla que permite definir el punto final de descalcificación se realiza con el uso de Oxalato de Amonio, el procedimiento es de valor - por su simplicidad y precisión.

CONCLUSION:

El oxalato de amonio precipita iones de Ca libres en la solución para así poder provocar la reacción.

TECNICA No. 13:

TECNICA PARA EL MANEJO DE TEJIDOS DURANTE LA DESCALCIFICACION.

CHRISTOPHER JAMES PIRIE AND GLENN FRANCIS VALLINT (1978).

La descalcificación puede tomar días o semanas de acuerdo a la naturaleza de la muestra o el líquido usado. Esto implica frecuentes cambios de los líquidos descalcificantes y la radiografía regular o el examen para determinar el punto final de descalcificación. cuando se procesa un gran número de muestras se emplea mucho tiempo en las labores rutinarias y si las muestras son de una naturaleza similar, el peligro de mala identificación aumenta.

Se buscó una manera para reducir el tiempo de manejo y asegurar la identificación durante la descalcificación, las muestras se ordenaron y una carta identifica la etiqueta encerada preparada para cada una. Una venda tubular hospitalaria Tubinette tamaño 01, anudada en un extremo, y un tubo de polietileno rígido de 3 cm. de diámetro interno son utilizados en esta técnica. La primera muestra, con su etiqueta, es puesta en el vendaje - usando el tubo como alimentador. Aunque básicamente rígido el tubo pudo ser comprimido para permitir el paso de muestras considerablemente grandes. El tubo fue retirado de la venda y sellado cerca de la muestra con otro nudo. Otras muestras fueron puestas dentro del vendaje hasta un número conveniente (18-20), formando un cordón manejable.

La identificación de la etiqueta, corresponde a un registro escrito que fue agregado al cordón. Existe la venda radio-lucida que permite radiografías. 18 Muestras pueden ser manejadas como una con la consecuente seguridad en el manejo. Como cada muestra es encerrada con su etiqueta, la confusión de identificación durante la descalcificación es nula.

La venda puede ser partida y la muestra pasar a otro proceso. Frecuentemente, cuando las muestras son similares (Ejem. 18 rótulas de conejo), se descalcifican virtualmente al mismo tiempo.

Todos los cordones pueden ser procesados, los tejidos solamente se removieron para fijarse. A la venda se le ha encontrado también utilidad para almacenar pequeñas muestras que necesitan ser mantenidas en secuencia.

D I S C U S I O N

A través de los diferentes artículos se pudo establecer que el tiempo necesario para la descalcificación de huesos depende de varios factores como el: Tamaño en el fragmento de tejido, este influye sobre la velocidad de difusión de las sustancias descalcificantes que al inicio es rápido y posteriormente se vuelve más lento al final de la desmineralización. Estos datos fueron confirmados mediante el uso de técnicas de rayos X y determinación química de los niveles de Ca, así como mediante estudios de alta resolución como la espectrofotometría de absorción atómica.

Asimismo se demostró que la mayoría de las técnicas que se reportan en este estudio fueron de utilidad para establecer la velocidad y punto final de descalcificación que aseguran la preservación más adecuadas de las estructuras.

Por otra parte, se comunican procedimientos sencillos que facilitan el manejo simultáneo de muestras diferentes que evitan confusiones. Entre las sustancias que resultaron ser de mayor utilidad se puede identificar al EDTA - que a pesar de que actúa lentamente produce los mayores resultados cuando se le compara con los descalcificadores ácidos, entre las variables principales que influyen para modificar la velocidad de descalcificación está el espesor del material por lo que se debe trabajar con cortes muy delgados, - las otras circunstancias importantes son el pH y la temperatura que revelará los mejores resultados a concentraciones de 7.2 y 4° C respectivamente.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- ALLEN D. ROSEN. (1981)
End Point Determination in EDTA Decalcification Using Ammonium Oxalate. Stain Technology 56 (1) 48-49.
- 2.- BAIR IL. WINBORN WB, BOCKMAN DE (1967).
A technique of decalcification suited to electron microscopy - of tissues closely associated with bone. Anat Rec 159:281-290.
- 3.- BELANGER LF. BELANGER C. SEMBA T (1967).
Technical approaches leading to the concept of osteocytic osteolysis. Clin Orthop Relat Res 54: 187-196.
- 4.- BELANGER LF. COPP DH, MORTON MA (1965).
Demineralization in histologic technique. J. Histochem Cytochem 22: 434-441.
- 5.- BONUCCI E. REURINK J (1978).
The fine structure of decalcified cartilage and bone: a comparison between decalcification procedures performed before and after embedding. Calcif Tissue Res 25: 179-190.
- 6.- BRAIN EB (1966).
The preparation of decalcified sections, Charles C. Thomas, - Springfield, Il, USA pp 54-132.
- 7.- CHARVAN J. REID L (1972).
The effect of decalcifying fluids on the staining of epithelial mucins by alcian blue. Stain Technol 47: 173-178.
- 8.- CLARK PG (1954).
A comparison of decalcifying methods Am J Clin Pathol 24;1113-1116.

- 9.- COOK, S.F. AND EZRA - COHN, H.E. (1962).
A comparison of methods for decalcifying bone. J. Histochem Cytochem 10: 560-563.
- 10.- CHRISTOPHER JAMES PIRIE AND GLENN FRANCIS VALLINT (1978).
A technique for handling tissues during decalcification Medical Laboratory Sciences 35, 305-306.
- 11.- DRURY, R.A.B. & WALLINGTON, E.A. (1967).
Carletons Histological Technique 4th Edn. p. 142, London: Oxford University Press.
- 12.- D.J. SEILLY (1982).
A chemical test to determine the end point of EDTA decalcification.
- 13.- HILLEMAN, H.H. & LEE, C.H. (1953).
Organic chelating agents for decalcification of bone and teeth. Stain Technol, 19, 285.
- 14.- KIVIRANTA AND ET AL. (1980).
The rate of Calcium Extraction During EDTA decalcification from thin Bone Slices 25 Assessed with atomic absorption Spectrophotometry.
Histochemistry 68. 119-127.
- 15.- ROSEN, A.D. (1981).
End point determination in EDTA decalcification using ammonium oxalate. Stain Technol, 56, 48-9.
- 16.- SCHWARZENBACH, G. (1969).
Complexometric Titrations, 2nd. Edition H. Flaschka, London pp. 15-16.

17.- SREEBNY, L.M. & NIKIFORUK, G. (1951).

Demineralsation of hard tissues by organic chelatin agents.
Science, 113-560.