



UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO
FACULTAD DE MEDICINA
TECNOLOGIA MÉDICA



COMPARACIÓN DE MÉTODOS DESMINERALIZADORES TRADICIONALES Y CON MICROONDAS A TRAVÉS DE ESTUDIOS INMUNOHISTOQUÍMICOS EN DIENTES CADUCOS

**Seminario de Grado
presentado en conformidad a los requisitos para obtener
el Grado Académico de
“Licenciado en Tecnología Médica con mención en Morfofisiopatología y
Citodiagnóstico”**

Martina Asenjo Sotelo
Isabel Gómez Silva
Maritza Valenzuela Apablaza

Profesor Guía: Prof. Asist. T.M. María Eugenia Franco Martínez
Profesores co-guías: Prof. Asist. Dra. Ana Verónica Ortega Pinto
Prof. T.M. Jimena LeRoy Barría

2007

*¿Qué les queda por probar a los jóvenes en este mundo de paciencia y asco?
 ¿Sólo grafiti? ¿rock? ¿escepticismo?
 también les queda no decir amén
 no dejar que les maten el amor
 recuperar el habla y la utopía
 ser jóvenes sin prisa y con memoria
 situarse en una historia que es la suya
 no convertirse en viejos prematuros
 ¿qué les queda por probar a los jóvenes
 en este mundo de rutina y ruina?
 ¿cocaína? ¿cerveza? ¿barras bravas?
 les queda respirar/ abrir los ojos
 descubrir las raíces del horror
 inventar paz así sea a ponchazos
 entenderse con la naturaleza
 y con la lluvia y los relámpagos
 y con el sentimiento y con la muerte
 esa loca de atar y desatar
 ¿qué les queda por probar a los jóvenes
 en este mundo de consumo y humo?
 ¿vértigo? ¿asaltos? ¿discotecas?
 también les queda discutir con dios
 tanto si existe como si no existe
 tender manos que ayudan/ abrir puertas
 entre el corazón propio y el ajeno
 sobre todo les queda hacer futuro
 a pesar de los ruines del pasado
 y los sabios granujas del presente.*

“¿QUÉ LES QUEDA A LOS JÓVENES?”

MARIO BENEDETTI

AGRADECIMIENTOS

La vida nos ofrece diversos desafíos, unos más fáciles de cumplir, otros más complejos. Algunos senderos conducen hacia un final feliz, otros dejan un recuerdo amargo; sin embargo, todos nos permiten crecer, porque en este largo recorrer, hay mucho que aprender: toda experiencia merece ser vivida.

Al llegar al final de este desafío, el de la vida universitaria, no podemos sino mirar atrás y sonreír. Aunque la vida nos presentara obstáculos, siempre hubo alguien que nos dio su apoyo, que nos recordó que cuando se cae es una oportunidad para aprender a levantarse, que las metas no son lo más importante, sino que lo más significativo, lo que permite avanzar, es cómo recorramos nuestro camino. En fin, a todas aquellas personas que siempre estuvieron, les queremos agradecer, por su dedicación, por su cariño, por motivarnos a continuar y por sentirse orgullosos de nosotras:

Querida profe MEF, nunca nos imaginamos que en ese lugar existiría alguien que pudiese entregar tanto, sin esperar retribución alguna. Siempre fue comprensiva, cariñosa, tolerante y paciente. Usted se ha convertido en el pilar de este proceso, sin el cual hubiésemos sucumbido ante la adversidad. Estuvo ahí con la palabra precisa, para sacarnos una sonrisa y alentarnos a continuar. Gracias por acogernos y hacernos sentir queridas, en una ciudad que no era la nuestra, donde no pertenecíamos, pero que, con su ayuda, se convirtió en nuestro amistoso lar. La queremos mucho.

Profesora Dra. Ani, hemos podido reconocer en usted a una gran persona, a quien nos regaló su apoyo, tiempo y conocimientos para llevar a cabo este gran desafío. Gracias por acompañarnos, guiarnos y, en definitiva, confiar en nosotras, nunca la olvidaremos.

¡Cómo olvidar nuestra llegada a la mención! Fue un lunes por la mañana, mientras esperábamos nuestra primera clase, y ahí apareció usted, no la conocíamos, sin embargo, recibimos una cálida

bienvenida. Con el pasar del tiempo, se convirtió en nuestra guía del conocimiento, gurú del saber, siempre con el Kiernan y otros caballeros más antiguos resolvió nuestras dudas. Gracias por enseñarnos a amar nuestra carrera y demostrarnos que la vocación sí existe, vivo ejemplo es usted. La queremos mucho, profe Jimena LeRoy.

Querido profe Andresito, llegamos a sus clases como cachorritos asustados, viéndolo como a un hombre serio y de pocas palabras. Hoy, podemos decir que estábamos equivocadas, ya que se ha convertido en un apoyo fundamental. Un gran profesor, esencial en nuestro desarrollo como Tecnólogos Médicos. Muchas gracias por apostar por nosotras, no lo defraudaremos.

Agradecemos también a la tía Eva, por esas largas noches de compañía y enseñanzas, por ser nuestra asesora lingüística, y por compartir...junto a nosotras.

Muchas gracias Milán, por ayudarnos y apoyarnos como amiga y profesional. Te desean mucho éxito tus futuras colegas.

Nuestro reconocimiento y agradecimiento:

Al Laboratorio de Anatomía Patológica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, en especial, al Dr. Nelson Lobos, por confiar en nosotras y permitir desarrollarnos como profesionales.

A la Dra. Luisa Araneda, por su disposición para reunir las muestras para nuestro estudio.

A Rosarito y Julito, por tan buena disposición con nosotras. Muchos cariños.

A Makarena González Q., por su disposición en tiempos apremiantes.

A todos ustedes, muchas gracias, por cada granito de arena, y por hacerse partícipe de este reto; reto que con orgullo podemos declarar: hemos cumplido....

DEDICATORIA

*A mi madre, la heroína de vida, mi mejor amiga, te amo.
 A mi padre, por darme alegría y enseñarme
 A seguir siendo una niña.
 A mi hermana, por amarme incondicionalmente.
 A mi taty y tata por apostar por mi.
 Ustedes son mi pilar de vida, mi motor;
 Me inspiran a seguir de pie cada día.
 M.S.V.A.*

*A mi familia:
 A mi madre, quien me enseñó el valor del esfuerzo,
 la responsabilidad y el trabajo.
 A mi padre, quien me enseñó que a pesar de las responsabilidades
 Es posible construir castillos en el aire.
 A mis hermanos, por tener fe en mí.
 A Gerardo, por su amor y apoyo incondicional.
 A todos ustedes los amo
 I.M.G.S.*

*A mi familia:
 A mi madre, mi mejor amiga.
 A mi padre quién me enseñó a escuchar la música de la vida.
 A mis hermanos, por darme el cariño que necesito.
 Los amo.
 A Ro, por tu paciencia y amor incondicional.
 Gracias por recorrer este camino junto a mi.
 M.P.A.S.*

RESUMEN

Los dientes son tejidos altamente mineralizados que poseen sales de calcio en forma de Hidroxiapatita. Los estudios inmunohistoquímicos revelan una constante problemática producida por el agresivo tratamiento que estas muestras reciben al extraer el calcio de sus matrices extracelulares. No obstante, EDTA es una solución descalcificadora quelante que produce menor distorsión de la morfología tisular que otros desmineralizadores, pero su tiempo de acción es muy prolongado, lo que restringe su uso para casos que requieran de pronto resultados. Esto motivó la presente investigación, en la que se buscó acelerar su acción a través del uso de microondas y, además, conservar sitios activos inmunológicos para los anticuerpos Ki-67 y NSE.

En este estudio científico experimental, se recolectaron 55 piezas dentales temporales humanas. Éstas se clasificaron según el método de descalcificación empleado en: EDTA, Ana Morse (ambas a temperatura ambiente) y EDTA a 36°C, logrado con el uso de microondas. Luego de su desmineralización y corte, se efectuaron las tinciones de Hematoxilina y Eosina (H-E), Tricrómico de Masson (TCM), e inmunotinciones con Ki-67 y NSE. Los cortes ya teñidos fueron revisados por las observadoras a través de un estudio doble ciego para que los resultados se analizaran con mayor objetividad.

En términos generales, se obtuvo que el tiempo de acción de EDTA y microondas fue menor que EDTA a temperatura ambiente y mayor que Ana Morse. También se observó que EDTA y microondas otorgó menos artefactos de corte en comparación a los otros métodos empleados. Respecto a las inmunotinciones, el mayor porcentaje de positividad correspondió a Ana Morse, en el caso de NSE; luego, EDTA y microondas y, finalmente, EDTA a temperatura ambiente. En el caso de Ki-67, se obtuvo sólo resultados negativos para todos los desmineralizadores.

En conclusión, EDTA y microondas demostró que es un descalcificador rápido en comparación con EDTA a temperatura ambiente y similar en su tiempo de acción a Ana Morse. Sin embargo, no mostró positividad para la inmuno-reacción de Ki-67; sólo se constataron algunos resultados positivos para NSE. Sí presentó significativos resultados morfológicos y de tinción con H-E y TCM. Además, produjo menos artefactos de corte que las otras soluciones desmineralizadoras. Por lo anterior, se sugiere su uso como agente descalcificador para procesamiento de rutina de tejidos calcificados y tejidos blandos con calcificaciones patológicas, que no requieran de estudios inmunohistoquímicos posteriores.

Palabras clave: Desmineralización, EDTA, Ana Morse, Microondas, Epítope, Inmunohistoquímica, Ki-67, NSE

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | |
|---|---------|
| CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN | Pág. 1 |
| 1.1. TEJIDOS CALCIFICADOS | Pág. 2 |
| 1.2. ESTRUCTURA DEL DIENTE | Pág. 4 |
| 1.2.1. Pulpa | Pág. 7 |
| 1.2.2. Dentina | Pág. 9 |
| 1.2.3. Esmalte | Pág. 10 |
| 1.2.4. Cemento | Pág. 12 |
| 1.2.5. Tejidos Periodontales | Pág. 12 |
| <i>1.2.5.1. Ligamento Periodontal</i> | Pág. 12 |
| <i>1.2.5.2. Hueso Alveolar</i> | Pág. 13 |
| <i>1.2.5.3. Encía</i> | Pág. 14 |
| 1.3. DESMINERALIZACIÓN | Pág.14 |
| 1.3.1. Descalcificación química | Pág.15 |
| <i>1.3.1.1. Descalcificación ácida</i> | Pág.15 |
| <i>1.3.1.1.1. Ana Morse</i> | Pág.16 |
| <i>1.3.1.2. Descalcificación por agentes quelantes</i> | Pág.17 |
| <i>1.3.1.2.1. Ácido Etilendiaminotetracético (EDTA)</i> | Pág.18 |
| 1.3.2. Métodos evaluadores de la descalcificación | Pág.20 |
| 1.4. HORNO MICROONDAS | Pág.21 |
| 1.4.1. Consideraciones generales | Pág.21 |
| 1.4.2. Concepto de microondas | Pág.22 |
| 1.4.3. Consideraciones técnicas | Pág.23 |
| 1.4.4. Aplicación del horno microondas en el laboratorio de Histopatología ...Pág.25 | |

| | |
|--|--------|
| 1.5. INMUNOHISTOQUÍMICA | Pág.25 |
| 1.5.1. Generalidades | Pág.25 |
| 1.5.2. Recuperación Antigénica | Pág.27 |
| 1.5.3. Inmunotinción Complejo Avidina Biotina (ABC) | Pág.29 |
| 1.5.4. Ki-67 | Pág.30 |
| 1.5.5. Enolasa Neuro Específica (NSE) | Pág.31 |
| | |
| CAPÍTULO 2: OBJETIVOS | Pág.33 |
| 2.1. OBJETIVO GENERAL | Pág.33 |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | Pág.33 |
| | |
| CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS | Pág.34 |
| 3.1. MATERIALES | Pág.34 |
| 3.2. MÉTODOS | Pág.37 |
| 3.2.1. Inmunotinción experimental | Pág.40 |
| | |
| CAPÍTULO 4: RESULTADOS | Pág.42 |
| 4.1. DISTRIBUCIÓN | Pág.42 |
| 4.2. TEMPERATURA | Pág.43 |
| 4.3. PH | Pág.45 |
| 4.4. TIEMPO DE DESMINERALIZACIÓN | Pág.47 |
| 4.5. MORFOLOGÍA Y TÉCNICA HISTOLÓGICA | Pág.49 |
| 4.6. TINCIÓN DE RUTINA Y TRICROMICA | Pág.52 |
| 4.7. TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA | Pág.60 |
| | |
| CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN | Pág.67 |

| | |
|--|--------|
| CONCLUSIÓN | Pág.72 |
| BIBLIOGRAFÍA | Pág.76 |
| APÉNDICES | Pág.84 |
| APÉNDICE A: TINCION HEMATOXILINA – EOSINA | Pág.84 |
| APÉNDICE B: TINCIÓN TRICRÓMICA DE MASSON | Pág.85 |
| APÉNDICE C: TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA CONVENCIONAL | Pág.87 |
| APÉNDICE D: TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA MODIFICADA | Pág.89 |
| ANEXOS | Pág.91 |
| ANEXO 1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO | Pág.91 |

ÍNDICE DE FIGURAS E IMÁGENES

| | |
|--|--------|
| Figura 1.1. <i>Forma que poseen los dientes caducos dentro de la cavidad oral</i> | Pág.5 |
| Figura 1.2. <i>Principales estructuras de un diente sano</i> | Pág.6 |
| Figura 1.3. <i>Molécula del quelante Etilendiamina</i> | Pág.17 |
| Figura 1.4. <i>Molécula de EDTA unida al ión metálico Calcio</i> | Pág.19 |
| Figura 1.5. <i>Espectro Electromagnético</i> | Pág.22 |
| Figura 1.6. <i>Esquema de un Magnetron</i> | Pág.24 |
| Imagen 3.1. <i>Examen físico</i> | Pág.38 |
| Imagen 3.2. <i>Examen radiográfico (a)</i> | Pág.38 |
| Imagen 3.3. <i>Examen radiográfico (b)</i> | Pág.39 |
| Imagen 4.1. <i>Diente descalcificado EDTA microondas (a)</i> | Pág.56 |
| Imagen 4.2. <i>Diente descalcificado EDTA microondas (b)</i> | Pág.56 |
| Imagen 4.3. <i>Diente descalcificado EDTA temperatura ambiente (a)</i> | Pág.57 |
| Imagen 4.4. <i>Diente descalcificado EDTA temperatura ambiente (b)</i> | Pág.57 |
| Imagen 4.5. <i>Diente descalcificado Ana Morse (a)</i> | Pág.57 |
| Imagen 4.6. <i>Diente descalcificado Ana Morse (b)</i> | Pág.57 |
| Imagen 4.7. <i>Unión Pulpo-dentinaria</i> | Pág.58 |
| Imagen 4.8. <i>Dentina</i> | Pág.58 |
| Imagen 4.9. <i>Diente con absceso pulpar (a)</i> | Pág.58 |
| Imagen 4.10. <i>Diente con absceso pulpar (b)</i> | Pág.59 |
| Imagen 4.11. <i>Pulpa necrótica (a)</i> | Pág.59 |
| Imagen 4.12. <i>Pulpa necrótica (b)</i> | Pág.59 |

| | |
|--|--------|
| Imagen 4.13. <i>Control positivo NSE (a)</i> | Pág.62 |
| Imagen 4.14. <i>Control positivo NSE (b)</i> | Pág.62 |
| Imagen 4.15. <i>Epitelio gingival</i> | Pág.62 |
| Imagen 4.16. <i>Inmunotinción anticuerpo NSE negativo (a)</i> | Pág.63 |
| Imagen 4.17. <i>Inmunotinción anticuerpo NSE negativo (b)</i> | Pág.63 |
| Imagen 4.18. <i>Inmunotinción NSE (a)</i> | Pág.63 |
| Imagen 4.19. <i>Inmunotinción NSE (b)</i> | Pág.64 |
| Imagen 4.20. <i>Inmunotinción NSE (c)</i> | Pág.64 |
| Imagen 4.21. <i>Inmunotinción NSE (d)</i> | Pág.64 |
| Imagen 4.22. <i>Control positivo Ki-67 (a)</i> | Pág.65 |
| Imagen 4.23. <i>Control positivo Ki-67 (b)</i> | Pág.65 |
| Imagen 4.24. <i>Epitelio- cemento-dentina</i> | Pág.65 |
| Imagen 4.25. <i>Epitelio-cemento</i> | Pág.65 |

ÍNDICE DE GRÁFICOS

| | |
|--|--------|
| Gráfico 4.1. <i>Comparación de las de temperatura de los descalcificadores</i> | Pág.44 |
| Gráfico 4.2. <i>Temperaturas de la descalcificación con EDTA microondas</i> | Pág.45 |
| Gráfico 4.3. <i>Comparación de pH de los descalcificadores</i> | Pág.46 |
| Gráfico 4.4. <i>Valores de pH EDTA microondas</i> | Pág.47 |
| Gráfico 4.5. <i>Tiempos de descalcificación EDTA microondas</i> | Pág.48 |
| Gráfico 4.6. <i>Falla de descalcificación</i> | Pág.50 |
| Gráfico 4.7. <i>Tipos de fallas en corte con Ana Morse</i> | Pág.50 |
| Gráfico 4.8. <i>Tipos de fallas en corte con EDTA a T. A</i> | Pág.51 |
| Gráfico 4.9. <i>Tipos de fallas en corte con EDTA microondas</i> | Pág.52 |
| Gráfico 4.10. <i>Comparación de intensidad de la tinción nuclear (H-E)</i> | Pág.53 |
| Gráfico 4.11. <i>Comparación de intensidad de la tinción citoplasmática (H-E)</i> | Pág.53 |
| Gráfico 4.12. <i>Comparación intensidad tinción nuclear (TCM)</i> | Pág.54 |
| Gráfico 4.13. <i>Comparación intensidad tinción citoplasmática (TCM)</i> | Pág.55 |
| Gráfico 4.14. <i>Comparación intensidad tinción de fibras (TCM)</i> | Pág.55 |
| Gráfico 4.15. <i>Distribución porcentual dientes positivos y negativos para NSE</i> | Pág.61 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|---------|
| Tabla 3.1. <i>Equipamiento del laboratorio</i> | Pág.35 |
| Tabla 3.2. <i>Reactivos y soluciones utilizados en la investigación</i> | Pág.36 |
| Tabla 3.3. <i>Anticuerpos primarios utilizados en inmunotinción experimental</i> | Pág.40 |
| Tabla 4.1. <i>Distribución de dientes según tipo de desmineralización</i> | Pág.43 |
| Tabla 4.2. <i>Comparación temperaturas desmineralizadores</i> | Pág.44 |
| Tabla 4.3. <i>Comparación de pH de las soluciones descalcificadoras</i> | Pág.44 |
| Tabla 4.4. <i>Presencia de tejido periodontal según desmineralizador</i> | Pág. 49 |
| Tabla 4.5. <i>Muestras descartadas por anticuerpo</i> | Pág.60 |
| Tabla 4.6. <i>Positividad de reacción con NSE por descalcificador empleado</i> | Pág.61 |

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

Al realizar estudios inmunohistoquímicos en piezas mineralizadas, aplicados en especial a estructuras como hueso o dientes, revelan una constante problemática producida por el agresivo tratamiento que estas muestras reciben para extraer el calcio de sus matrices extracelulares. Lo anterior afecta la inmuno-reactividad de los tejidos, especialmente, a nivel nuclear [1], [2], [3], lo que lleva a resultados falsos negativos, impidiendo el correcto diagnóstico de patologías y disminuyendo la posibilidad de investigación [4].

Cabe destacar que el periodo de desmineralización puede demorar desde algunos días a varios meses [2], dependiendo del grado de calcificación, del tamaño de las muestras y del tipo de agente desmineralizador empleado en el estudio. Los agentes desmineralizadores más eficaces son más enérgicos e injurian en mayor medida las muestras. En tanto, aquellos que conservan mejor las estructuras y la inmunoreactividad requieren largos períodos de acción, que se pueden prolongar por meses, en el caso de muestras altamente calcificadas como los dientes, en comparación con muestras de tejidos blandos, que sólo requieren algunos días para su procesamiento de rutina. Tal lentitud es una desventaja, ya que obstaculiza un resultado eficaz y rápido.

Al comparar los distintos agentes desmineralizadores, sus concentraciones, tiempos de descalcificación y temperaturas, será posible determinar un protocolo para cada uno de ellos. Gracias a lo anterior, sería posible optimizar y disminuir los tiempos de acción, además de investigar su efectividad ante el uso de técnicas inmunohistoquímicas que se dirijan al núcleo celular, el cual es mucho más sensible a los procesos de descalcificación y pierde fácilmente su inmuno-reactividad.

En esta investigación, se determinarán los efectos de la descalcificación con Ácido etilendiaminotetracético (EDTA), acelerado con el uso de microondas, sobre la inmuno-

reactividad de los núcleos celulares de dientes caducos humanos en un corto período de tiempo, buscando conservar la inmuno-reactividad de antígenos, especialmente nucleares. De igual forma, se intentará determinar el tiempo en su acción descalcificadora y se realizará una comparación con métodos de Ana Morse y EDTA, ambos a temperatura ambiente

Las bases teóricas que sustentan el presente estudio han permitido comprender los procedimientos necesarios para su realización. De esta manera, a continuación se abordarán los principales temas que fundamentan nuestra investigación. A saber, se explicará cuáles son los tejidos calcificados y su constitución; luego, se expondrá cómo está formado el diente, a nivel anatómico e histológico; posteriormente, se precisará el proceso de desmineralización y su acción sobre los tejidos calcificados, así como la naturaleza de los tejidos calcificados.

1.1. TEJIDOS CALCIFICADOS

Es sabido que el calcio es un elemento muy importante para nuestro organismo; ocupa el 2% del peso corporal, se deposita en huesos y tejidos dentarios, proporcionándoles dureza y resistencia [5]. Lo señalado sucede en forma de finos cristales del mineral hidroxilapatita ($\text{Ca}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) [6], también llamado hidroxiapatita, compuesto principalmente por fosfato de calcio. Cabe destacar que también se encuentran presentes en la matriz mineralizada las sales carbonatadas de calcio, cuyos compuestos son sodio, magnesio y carbonato, entre otros.

En los organismos vertebrados, se encuentran variadas estructuras tisulares de consistencia muy dura y resistente, que suelen proteger y soportar otros tejidos u órganos más delicados. A estos tejidos se los llama calcificados debido a que su mayor componente inorgánico es el calcio. En el ser humano, y mamíferos en general, son tejidos calcificados: los huesos, que componen el sistema esquelético óseo y los dientes, que son los órganos más calcificados

del cuerpo humano [5]. También podemos encontrar depósitos patológicos de calcio que se alojan en órganos que, normalmente, no los poseen.

En la matriz extracelular (MEC), de tejidos normalmente calcificados, se hallan elementos orgánicos e inorgánicos. Los componentes orgánicos que constituyen la MEC son principalmente glicosaminoglicanos (GAGs), como condroitinsulfato y ácido hialurónico; la proteína estructural de mayor concentración es el colágeno tipo I. Su importancia radica en que le confiere resistencia y flexibilidad al tejido; también se observan fibras colágenas de otros tipos, pero en muy baja proporción, y proteínas no colágenas que parecieran tener relación con la mineralización de estos tejidos [5].

En cuanto al componente inorgánico de los tejidos óseos, su principal elemento es el calcio, en forma de sales de calcio, como el fosfato de calcio o hidroxiapatita. Estas sales, se observan al microscopio de luz como finos depósitos cristalinos. Los cristales de hidroxiapatita miden 3 nm de espesor y hasta 60 nm de largo [7].

Para que huesos y dientes puedan calcificarse, existen procesos de mineralización primaria y secundaria. Este tipo de calcificación es independiente de energía, a diferencia de las calcificaciones patológicas, que en su mayoría se producen por una descompensación metabólica dependiente del sistema energético que provee la mitocondria. Sin embargo, el proceso de mineralización todavía no es conocido a cabalidad, por lo que no se ha unificado un concepto de la misma [5, [8].

En todo caso, es sabido que en huesos existe un depósito de calcio y fosfato amorfo inicial a lo largo de las fibras de colágeno. Éstos aumentan progresivamente en la estructura, formando los cristales de hidroxiapatita. [5], [8]. En tanto, para el caso de los dientes, la mineralización está asociada directamente con el colágeno que se ubica en la dentina. En los tejidos óseos, los osteoblastos producen la enzima fosfatasa alcalina que insolubiliza el

fosfato de calcio y le ayuda a depositarse en la matriz colagenosa. Lo anterior ocurre con la ayuda de ciertas proteínas no colágenas de la matriz que le permiten fijarse al colágeno [9].

1.2. ESTRUCTURA DEL DIENTE

Las principales funciones de los dientes en seres humanos son la masticación, la pronunciación durante el habla y, actualmente, la estética. En mamíferos, los dientes se unen a los huesos maxilares a través de tejido conectivo fibroso, lo que le da flexibilidad para soportar las fuerzas masticatorias. En el ser humano, las piezas dentarias constituyen el 20% del área de la boca [10].

Los individuos, a lo largo de su vida, desarrollan dos denticiones:

- Dentición temporal o primaria [5], desarrollada por los niños; consta de 20 dientes caducos, deciduos o “de leche” y se disponen en ambos maxilares. Se pueden distinguir dentro de esta dentición 8 incisivos, 4 caninos y 8 molares. Estos dientes se disponen en un espacio que aumenta de tamaño con el avance de los años, por lo que son exfoliados para dar paso a una nueva dentición [11]. Véase figura 1.1.
- Dentición permanente o secundaria [5]; corresponde a los dientes definitivos, desarrollada luego de la exfoliación del diente caduco; consta de 32 piezas, entre los que se encuentran: 8 incisivos, 4 caninos, 8 premolares y 12 molares [11].

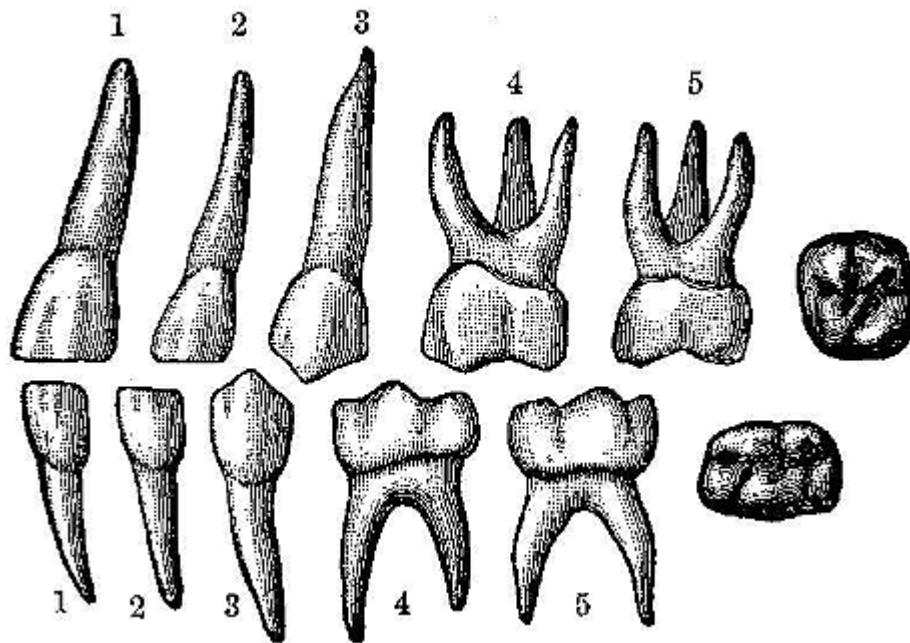


Figura 1.1. Forma que poseen los dientes caducos dentro de la cavidad oral. **1** Incisivo. **2** Canino. **3** Premolar. **4 y 5** Molares. [12]

Los dientes primarios y secundarios se disponen en fila, formando una curvatura acorde a los maxilares inferior y superior, denominadas arcadas dentarias [11]. Ambas denticiones poseen características anatómicas e histológicas similares; entre estas se distinguen [5], [10], Véase Figura 1.2.:

- Corona dentaria
- Raíz dentaria
- Cuello
- Cavidad dentaria o cámara pulpar
- Pulpa dentaria

- Dentina
- Esmalte
- Cemento
- Tejidos Periodontales

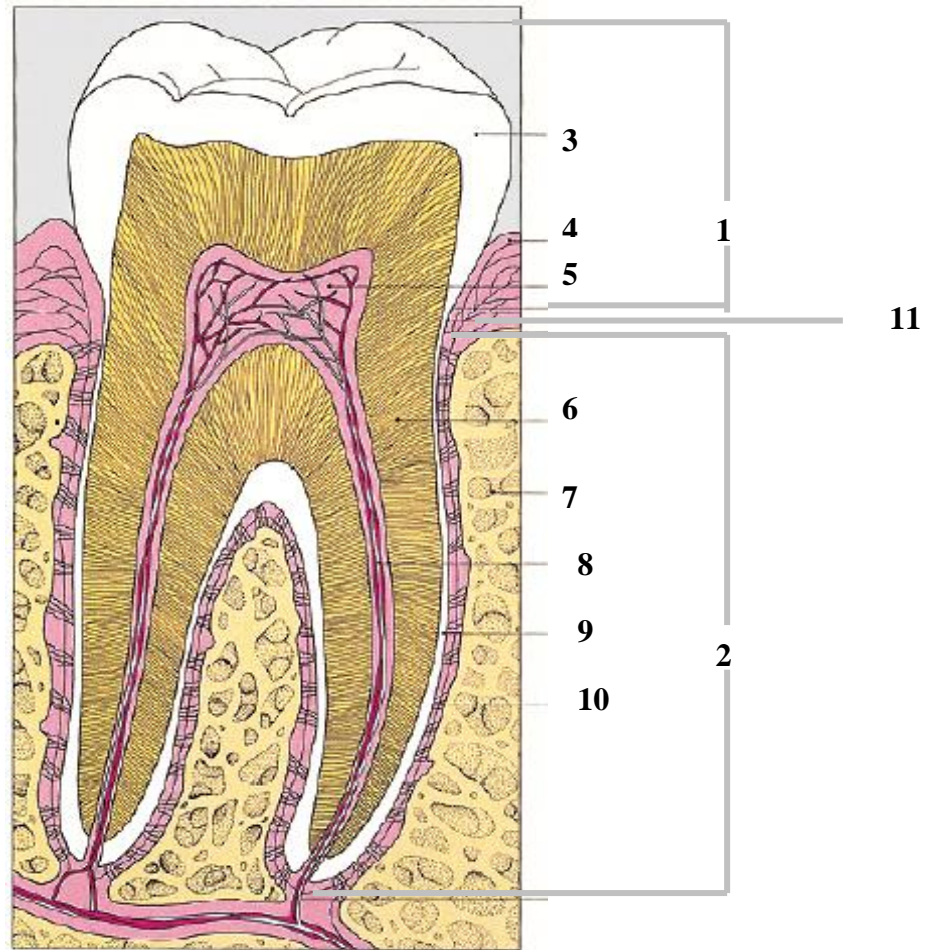


Figura 1.2. Principales estructuras de un diente sano. Tomado y modificado de [13]. **1** Corona. **2** Raíz. **3** Esmalte. **4** Encía. **5** Cámara pulpar. **6** Dentina. **7** Hueso Alveolar. **8** Canal Radicular. **9** Cemento. **10** Ligamento Periodontal. **11** Cuello.

Existen pequeñas, pero importantes diferencias entre ambas denticiones. Con respecto a la dureza, se admite que la del esmalte y de la dentina de los dientes caducos es levemente inferior a la de los dientes permanentes. Esto puede explicarse porque los dientes primarios se encuentran menos calcificados que los secundarios debido al menor tiempo disponible para su mineralización [11]. En consecuencia, se señala que el esmalte de los dientes caducos es de menor espesor que aquel existente en los dientes permanentes, lo cual se aprovecha para el intercambio iónico del esmalte (calcio por flúor), formándose, así, la fluorapatita. Esta última es una molécula que otorga resistencia a la estructura, haciendo más difícil la acción descalcificadora de los ácidos. Se indica que la sustitución es óptima cuando el flúor reemplaza uno de cada 40 iones hidroxilos (OH⁻) [11].

Cada órgano dentario posee una estructura denominada corona, parte visible del mismo, ya que ésta sobresale de la arcada dentaria; su forma depende del tipo de diente. La raíz dentaria se encuentra por dentro del hueso alveolar y es la estructura que logra sujetar el diente; la cantidad y la forma de ésta también dependen del tipo de diente. El cuello es el punto donde podemos distinguir la unión entre la corona y raíz dentaria [11]. Además, podemos distinguir estructuras histológicas visibles a través de un corte sagital del diente. Éstas se describen desde un plano interior a uno exterior:

1.2.1. Pulpa

Dentro de la cavidad dentaria, se encuentra un tejido conectivo laxo, denominado pulpa, que constituye el tejido más profundo del diente y de origen embrionario ectomesenquimático, caracterizado histológicamente por su abundante composición de glicosaminoglicanos, y cuyo grupo celular predominante es el de fibroblastos [5]. Anatómicamente, la pulpa se encuentra rodeada por dentina y es práctico distinguirlas entre ellas, ya que la dentina es un tejido duro, mientras que la pulpa es blanda [10].

Las células predominantes de la pulpa, especialmente en la corona, son los fibroblastos, los cuales sintetizan colágeno, reticulina, elastina y fibras de Oxitalán (fibras elásticas inmaduras de función desconocida) a la matriz amorfa de la pulpa. En la periferia de la pulpa coronaria y radicular, podemos encontrar los odontoblastos, células que sintetizan y secretan la dentina, además de otros componentes celulares menores [14].

Otro grupo celular de importancia son las denominadas células ectomesenquimáticas o células madre de la pulpa, las cuales tienen la capacidad de diferenciarse en odontoblastos o fibroblastos ante un estímulo específico. Dichas células constituyen la población de células de reserva que participan en los mecanismos de autodefensa de la pulpa [11].

La pulpa posee vascularización arterial, venosa y linfática. Los nervios dentro de la pulpa siguen exactamente el mismo recorrido que la vascularización; además, emiten fibras hacia la dentina [5], [15]. El tejido nervioso posee fibras nerviosas mielínicas y amielínicas. Las neuronas aferentes son las encargadas de conducir el impulso sensitivo, como el ocurrido en los cambios de temperatura, deformación mecánica, entre otros; y las fibras autonómicas regulan la dentinogénesis y la modulación neurogénica de la microcirculación. Éstas pueden clasificarse según su función, diámetros y velocidad de conducción, por lo que en la pulpa se hallan las fibras A o mielínicas, y las fibras C o amielínicas [14].

Así, podemos señalar que las funciones de la pulpa son [10], [14]:

- A. **Formativa:** Produce dentina durante la vida, compensando la pérdida de esmalte y dentina por acción mecánica o patología.
- B. **Nutritiva:** Nutre a la dentina avascular, mediante su vascularización.
- C. **Protectora:** Lleva nervios, otorgando sensibilidad a la dentina
- D. **Reparativa:** Es capaz de producir dentina nueva cuando se requiera, de forma parcial.

1.2.2. Dentina

La mayor parte del diente está compuesto por dentina, que soporta al esmalte y rodea a la pulpa. La dentina es dura, elástica, blanquecina amarillenta y, a diferencia de la pulpa, su tejido es avascular; ésta rodea a la cámara pulpar central y su propiedad de elasticidad le permite proteger al esmalte ante las fracturas [11]. En su etapa madura, está constituida aproximadamente en un 65% por cristales de hidroxiapatita; 20% de colágeno tipo I y V [11], [14]; un 2% de condroitín sulfato, proteínas no colágenas, lactato, lípidos; y, finalmente, se compone de un 13% de agua [16]. Estos componentes son secretados por una célula especializada: el odontoblasto.

Los odontoblastos son células cilíndricas de núcleos basales, cuyo origen es mesenquimático; en su inicio, éstos se disponen en la parte interna del esmalte. Al secretar dentina, los odontoblastos se retraen de manera centrípeta formando los túbulos dentinarios o *fibrillas de Tomes*; a la primera dentina no mineralizada se le denomina predentina [17], cuyos componentes macromoleculares son colágeno tipo I y II [14]. Al formarse y mineralizarse, en la dentina se crean unos segmentos, cuya separación es de 4 a 8 μm , visibles al microscopio de luz como líneas: las *líneas de Owen* [11].

Entre los varios tipos de dentina descritos, aquella que rodea los túbulos se denomina dentina peritubular; en tanto, aquella que se encuentra entre los túbulos es designada como dentina intertubular [10], [14]. La disposición de la dentina en estos espacios varía de superficial a profundo, por lo que podemos encontrar mayor porcentaje de dentina intertubular en la zona amelodentinaria, mientras que en la cercanía de la pulpa es menor. Lo anterior ocurre por el aumento de tamaño y densidad de los túbulos mientras se acercan a la pulpa [14].

Otra clasificación propone otro tipo de dentina; así, tenemos la dentina superficial y la dentina profunda. La superficial se encuentra cercana al límite amelodentinario o hipomineralizada, constituida por alto porcentaje de colágeno y baja cantidad de agua y túbulos. Por el contrario, la dentina profunda se halla más próxima al tejido pulpar, que posee mayor porcentaje de agua y túbulos y menor cantidad de colágeno [11].

La alta existencia de odontoblastos, el gran contenido orgánico, la presencia de inervación en los túbulos dentinarios y su variable permeabilidad, entre otros factores, hace a la dentina bastante diferente del esmalte. La dentina es un tejido sensitivo y, lo más importante, es capaz de repararse, debido a la capacidad de los odontoblastos de responder ante la estimulación, lo que permite denominarla como dentina terciara, la cual tiene carácter reparativo, reaccional y patológico [10], [11]. En el siguiente apartado se expondrán las propiedades del esmalte, donde se verificarán las diferencias entre ellos.

1.2.3. Esmalte

El esmalte dentario, también denominado “tejido” adamantino o sustancia adamantina, es una estructura de origen ectodérmico. “Es la sustancia más dura del organismo” [5], y de carácter acelular. Está constituido por 96% de material inorgánico, principalmente hidroxiapatita; este material orgánico ésta compuesto por proteínas y polisacáridos, sin participación del colágeno, correspondiente al 1%, y un 3% de agua, por lo cual se ve reducida su capacidad elástica y es proclive a macro y micro fracturas [10], [11]

Histológicamente, se puede distinguir la unidad estructural básica del esmalte: el prisma del esmalte o barras alargadas. Su disposición es oblicua sobre la superficie del diente, entrelazado por una sustancia que también contiene cristales de apatita y cuya dirección es diferente a los prismas [10]. El conjunto de prismas conforman el esmalte prismático,

ubicado casi en la totalidad de éste, mientras que en la periferia de la corona y en la unión amelodentinaria existe el esmalte aprismático, en el cual la adamantina no configura prismas.

El material orgánico, el cual puede ser reconocido inmunohistoquímicamente, posee un sistema de multi-agregados proteicos. Entre éstos se reconocen: Amelogeninas, enamelinas, ameloblastinas o amelinas, tuftelina y parvalbúmina. Además, se pueden distinguir unidades estructurales secundarias: las bandas de *Hunter-Schernger*, bandas de color alternado claro y oscuro, observadas con luz polarizada. Dichas bandas se originan por el entrecruzamiento de los prismas en el borde amelodentinario y se dirigen hacia exterior. Por otro lado, se encuentran las estrías o *líneas de Retzius*, las cuales pueden ser visualizadas como bandas pardas al desgastar el esmalte; éstas evidencian la aposición de las capas del esmalte durante la formación de la corona [11].

Las células responsables de la formación del esmalte son los ameloblastos, cuya forma es cilíndrica alta, de núcleo oval y basal. Al secretar la matriz, los ameloblastos se dirigen en dirección contraria a la unión entre el esmalte y la dentina; por lo tanto, al terminar su secreción, estas células quedan separadas de la dentina por el esmalte. Los ameloblastos luego de completar su función, involucionan, desapareciendo durante la erupción dentaria por el mecanismo de apoptosis. Luego de este proceso, no existe formación nueva de esmalte [10], [11], [15].

Al esmalte maduro no se lo considera un tejido, propiamente tal; al no poseer células que lo compongan, es considerado una sustancia extracelular altamente mineralizada. Es permeable, ya que el intercambio iónico puede ocurrir entre él y el medio de la cavidad oral, en particular, en la saliva. No puede ser reemplazado o regenerado y su muerte o pérdida es debido al desgaste mecánico y químico estrictamente biológico, dadas las funciones del diente [10]. Sin embargo, puede remineralizarse captando iones del medio [11].

1.2.4. Cemento

El cemento es un tejido calcificado que se puede considerar como hueso compacto modificado avascular y sin innervación. Se ubica entre la dentina y el hueso alveolar que sostiene al diente. Es homólogo al esmalte anatómicamente y se encuentra cubriendo la raíz dentinaria. [3]

El cemento se origina una vez que la dentina es producida; cuando las células mesenquimáticas entran en contacto con la dentina, se diferencian en cementoblastos, formando el cemento alrededor de la dentina radicular. Algunos de ellos quedan inmersos en la matriz cementaria, denominándose cementocitos, los cuales forman la parte celular del cemento. Los cementocitos se ubican en la zona apical del cemento, haciéndola más gruesa, mientras que la parte cercana a la corona del cemento es delgada debido a sus escasas células [11], [15]. Esta estructura es reabsorbida junto a la dentina en el proceso de recambio de los dientes deciduos, por un tipo de células designadas odontoclastos, cuya función es análoga a la de los osteoclastos [10].

1.2.5. Tejidos Periodontales

1.2.5.1. Ligamento periodontal

El ligamento periodontal es un tejido conectivo de tipo fibroso denso, ricamente vascularizado, que rodea a la raíz y la une al hueso alveolar, y mide entre 0,1 a 0,38 mm de espesor [11]. Posee fibras de colágeno tipo I, dispuestas de manera tal que resisten los procesos de masticación. Además de las fibras colágenas, se compone de fibras elásticas, reticulares y oxiálicas; estas fibras colágenas se

disponen en 5 grupos distintos que envuelven al diente de cuello a raíz. Así, tenemos: grupo de la cresta alveolar, grupo horizontal, grupo oblícuo, grupo apical y grupo interradicular [11].

El extremo de las fibras colágenas se une al alvéolo del hueso maxilar, siendo denominadas como fibras de *Sharpey*. Además, se adhieren al cemento, a manera de fibras perforantes, retenidas o incluidas, correspondiendo a las fibras extrínsecas del cemento; esto permite que el ligamento una el diente al hueso. Además de la vascularización, posee fibras nerviosas de tipo vegetativas vasomotoras, de dolor y propioceptivas [11], [15].

1.2.5.2. Hueso alveolar

El hueso alveolar es la prolongación del hueso maxilar inferior y superior, que continúa la forma de curvatura, formando diversos compartimentos que albergan y sostienen a cada diente, llamados alvéolos dentinarios. Estos compartimentos óseos presentan tres áreas: hueso compacto externo, en el que se distinguen el de origen perióstico y compacto, de origen medular; hueso esponjoso o trabecular; y hueso compacto, el que también se divide en el de origen periodóntico y compacto de origen medular, denominado también hueso alveolar, propiamente tal. Las placas de hueso compacto son duras y muy resistentes; rodean al hueso esponjoso por ambos extremos (hacia el maxilar y hacia el diente). El área de hueso esponjoso, formado por trabéculas, tiene la particularidad de albergar los sistemas de Havers, los cuales permiten su irrigación e inervación. La placa de hueso compacto de origen periodóntico une el diente al hueso, ya que en ella se sostiene el ligamento periodontal, el cual, a su vez, está unido al cemento [11].

1.2.5.3. Encía

La encía forma parte de la mucosa oral masticatoria, de color rosado pálido, de consistencia firme, dura, no deslizable y resistente. Compuesta por epitelio plano pluriestratificado, parcialmente queratinizado o paraqueratótico, llamado también epitelio gingival; posee tejido conectivo denso con fibras de colágeno tipo I, grupos parecidos a los que componen el ligamento periodontal. Las encías constituyen lo que se denomina periodoncio de protección debido a que su función es recubrir el hueso y el cuello dental [10], [11], [15].

1.3. DESMINERALIZACIÓN

Una de las propiedades que les confiere dureza a los tejidos calcificados es su concentración de cristales de hidroxapatita en su matriz extracelular. Sin embargo, dicha característica impide que puedan ser cortados con métodos convencionales; por tal razón, estas muestras deben ser tratadas luego de la fijación para remover o quitar todos aquellos componentes responsables de la dureza del tejido. Este método facilita su posterior procesamiento y permite, de esta manera, su visualización microscópica [6].

La descalcificación es el proceso de remoción de las sales de calcio insolubles que se encuentran en los tejidos mineralizados. Ésta, puede realizarse a través de diversos procedimientos, entre los cuales se encuentran los métodos físicos, como ultrasonido y electrolítico, cuya acción no será analizada en este estudio, y métodos químicos, tales como la descalcificación ácida y la descalcificación producida por un agente quelante [6].

1.3.1. Descalcificación química

1.3.1.1. Descalcificación ácida

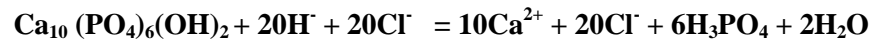
La descalcificación con agentes ácidos permite la extracción de las sales de calcio a través de la ruptura de dichas moléculas, dejando libre el calcio en la solución descalcificadora y logrando, así, su desmineralización. La ruptura de la molécula genera, además, la remoción de los iones hidroxilos (OH^-) hacia el medio acuoso del descalcificador. En solución de descalcificante ácido, de tipo acuosa, podemos encontrarla de dos formas: disociada o como una molécula neutra insoluble. Dicha solución contiene muy bajas concentraciones de fosfato de calcio, e iones hidroxilo como se observa a continuación:



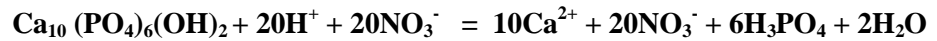
Cualquier ácido fuerte puede servir como recurso de iones hidrógeno para contrarrestar la salida de los iones hidroxilos hacia el medio. Esta capacidad de los ácidos para disociarse permite la reacción de los protones (H^+) con los iones hidroxilos liberados al romper la molécula de hidroxiapatita, formando agua.

El ácido clorhídrico, nítrico y fórmico son algunos de los más utilizados, sus reacciones con la hidroxiapatita se observan a continuación [6]:

Ácido Clorhídrico:



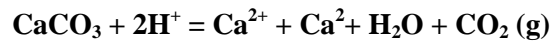
Ácido Nítrico:



Ácido Fórmico:



El tejido mineralizado contiene, también, un pequeño porcentaje de carbonato de calcio que es disuelto por los ácidos, como queda expresado en la siguiente ecuación:



Las soluciones ácidas dañan el tejido en cuestión, porque puede resultar la hidrólisis de los ácidos nucleicos. [3], [6]. En tanto, el calor, según [18], [19], [20], acelera la descalcificación. Si ésta, además, es realizada con un desmineralizador ácido, se aumenta la acción destructiva de él, por lo que este método no es recomendable con agentes de esta categoría. [21]

1.3.1.1.1. Ana Morse

Ana Morse es la mezcla descalcificadora descrita por su autora en el año 1945 [22] y está compuesta por ácido fórmico 45% y citrato de sodio 20% en partes iguales. Es una de las técnicas más utilizadas debido a su rapidez y capacidad de conservar mejor la

inmuno-reactividad en tejidos, en comparación con la descalcificación ácida por sí sola. A pesar de no ser totalmente conocida su acción, es sabido que ésta se basa en las propiedades conjuntas de sus dos componentes.

Es así como el ácido fórmico destruye la molécula de hidroxiapatita, reaccionando con los grupos hidroxilos, mientras que el citrato de sodio toma el ión calcio y lo atrapa por quelación. Este proceso permite una descalcificación acelerada y menos agresiva del tejido mineralizado [18].

1.3.1.2. Descalcificación por agentes quelantes

Un agente quelante es una solución orgánica que posee iones disponibles para combinarse con un ion metal, formando un compuesto conocido como metal-quelato. En él, el átomo de metal está covalentemente unido a 5 ó 6 anillos, como se observa en el siguiente ejemplo:

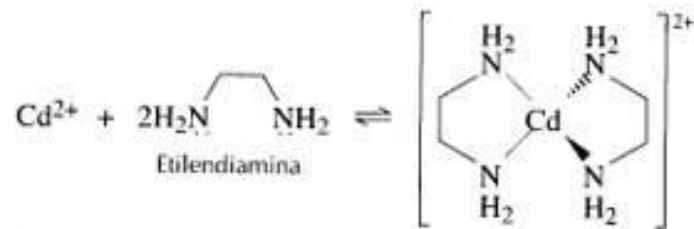


Figura 1.3. Molécula del quelante Etilendiamina [23].

Los quelatos son compuestos estables y no se descomponen con rapidez, para liberar iones metálicos [6]. Consecuentemente, la reacción de un ion metálico

con un agente quelante, aunque reversible, procede casi por completo si el agente está presente en exceso.

Los agentes quelantes pueden ser de tipo ligantes bidentados y ligantes polidentados. Esta clasificación se obtiene a partir del número de átomos donadores, presentes en la molécula o ión. Ejemplos de agentes quelantes son: Etilendiamina, ión acetilacetato, ion Oxalato, ion etilendiaminatetracetato (EDTA) e ion tripolifosfato [24].

Las sustancias quelantes son utilizadas, además, para tratar a pacientes afectados por envenenamiento con metales pesados, como plomo o mercurio. Este método se usa con el fin de eliminar esos iones de la sangre por la capacidad que poseen dichos compuestos para formar quelatos [24].

1.3.1.2.1. Ácido Etilendiaminotetracético (EDTA)

El EDTA, también denominado Verseno o Tritriplex, es una solución ampliamente manejada en el área de la salud. Sus funciones van desde constituir un anticoagulante muy utilizado, y ablandador de agua. Incluso, hasta se puede aplicar como tratamiento en casos de envenenamiento, como ya se mencionó [18], [24].

En el área de Odontología, el EDTA se utiliza en tratamientos endodónticos a una concentración del 17%, para eliminar los detritos que se acumulan en la superficie de los túbulos dentinales, denominado barrillo dentinario. Esta solución remueve la dentina

reblandecida y facilita la expulsión de las obstrucciones calcificadas [14]. En los laboratorios de histopatología, EDTA es utilizado como descalcificador de tejidos mineralizados, e incluso, como recuperador antigénico en inmunohistoquímica. A continuación, nos referiremos a sus características como descalcificador.

El EDTA es un agente quelante, de tipo ligante polidentado; Contiene 6 átomos donadores de electrones: 2 de nitrógeno y 4 de oxígeno. De ellos, sólo los átomos de oxígeno están disponibles para formar el metal-quelato. Estos átomos se encuentran formando parte de los grupos -COO- (Carboxilo) de la molécula, permitiendo la formación de complejos con iones de metales alcalinos, como hierro, calcio, plomo, entre otros, cambiando su configuración [24]. En la figura 1.4 se aprecia su composición.

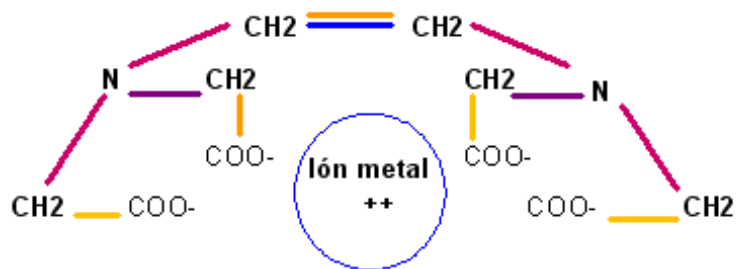


Figura 1.4. Molécula de EDTA unida al ion metálico Calcio.
Tomado y traducido de [25].

La descalcificación con EDTA difiere de la descalcificación ácida, en que el ion hidrógeno no juega un rol en la reacción. El agente quelante es usado a pH 7.4 (neutralidad), por lo que no produce

efectos deletéreos sobre las sustancias lábiles, como los ácidos nucleicos del tejido y las enzimas. Si sumergimos una pieza de tejido calcificado en una solución que contiene aniones EDTA, el calcio libre será removido de la solución por quelación.

La mayor desventaja del EDTA es su lenta acción, que puede demorar, incluso, meses para obtener una pieza desmineralizada [24]. A pesar de lo anterior, los investigadores [19], [20], proponen que la descalcificación con un agente quelante, como el EDTA, puede ser acelerada a través de microondas. Ello aporta energía directamente al espécimen; mientras, se pueda realizar un control de la temperatura de la solución para no causar un efecto deletéreo sobre la muestra.

Actualmente, diversos autores [1], [4], [19], [20], [27] indican la utilización de EDTA sobre estructuras óseas, sean huesos o dientes, ya que constituye el mejor método descalcificador. En consecuencia, aporta seguridad al procedimiento sin generar daños antigénicos, como los descritos para los ácidos.

1.3.2. Métodos evaluadores de la descalcificación

La presencia de calcio en las soluciones descalcificadoras, como EDTA y Ana Morse, y en los tejidos procesados, puede ser determinada a través de diversos métodos. El más fácil y rápido de realizar es el examen físico de la muestra en estudio; esto se puede observar al ejercer presión sobre la muestra con los dedos u otro implemento, como pinzas, lápiz, regla, etc., o mediante el corte directo con un bisturí o navaja. Este

procedimiento es útil para determinar si la muestra posee remanentes de dureza; en el caso de que se encuentre descalcificada completamente, revelaría una consistencia renitente. [18], [26].

Otro método de verificación de descalcificación de una pieza lo constituye la toma de una radiografía o rayos X. En suma, la radiolucidez de la pieza en cuestión proporciona un resultado favorable para su estudio [28], [18].

También es posible determinar el nivel de descalcificación a través de un test químico. Depende del resultado de la interacción entre la solución descalcificadora y el reactivo utilizado, si la pieza se encuentra desmineralizada o no [22].

1.4. HORNO MICROONDAS

1.4.1. Consideraciones generales

El horno de microondas es un electrodoméstico que ha logrado amplia popularidad en los países desarrollados en las últimas décadas. Gracias a su rápido mecanismo de generación de energía térmica, útil sobretodo en el área de la gastronomía, ha logrado convertirse en uno de los elementos favoritos de aquellos que, debido a su exigente ritmo de vida, constantemente deben optimizar el tiempo de sus actividades.

Puede decirse que el nacimiento del Horno de Microondas se debe a un mero accidente; de hecho, durante los estudios de prueba de un mecanismo de radar, basado en el funcionamiento de un dispositivo llamado magnetrón, capaz de generar microondas, se observó cómo ciertos alimentos que se encontraban cerca del lugar de

experimentación, se derretían, o adquirirían temperaturas elevadas [29]. Esta observación fue realizada por el Dr. Percy L. Spencer, científico de la empresa Raytheon Corporation, en el año 1946, quien un año más tarde creó el Horno de Microondas, el cual ha ido evolucionando con el paso del tiempo hasta convertirse en un artefacto que se encuentra ocupando un pequeño espacio en gran parte de los hogares del mundo [29]. Su aplicación ha llegado, incluso, a en laboratorios de histopatología, para el procesamiento de biopsias, como lo señalan Mayers (1970), Login (1978), Brinn (1983), Leong (1988) y Boon y Kok (1989) [30].

1.4.2. Concepto de microondas

Las microondas son conocidas como ondas electromagnéticas, es decir, que pueden propagarse a través del vacío, y cuya longitud de onda es pequeña (del griego *mikros*). Estas ondas poseen alta frecuencia, la que varía entre los 300 MHz y los 300 GHz, y son capaces de viajar a la velocidad de la luz; su longitud de onda se encuentra entre 30 cm a 0.3 cm. Cabe destacar que la frecuencia es inversamente proporcional a la longitud de la onda. Las ondas las podemos ubicar en el espectro electromagnético entre las ondas de radio convencionales y los rayos infrarrojos, como se visualiza en la Fig. 1.5.

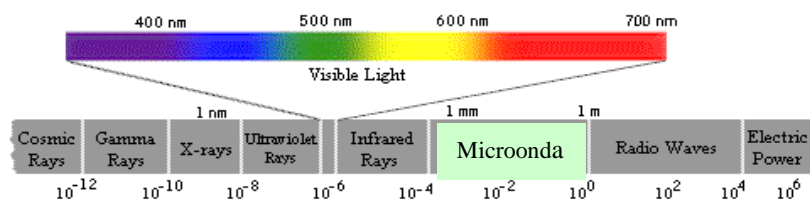


Figura 1.5. Espectro electromagnético. Las ondas son clasificadas de forma continua y creciente según su longitud, forman un espectro que va desde las ondas más cortas (millonésimas de milímetro) a las más largas (de kilómetros de longitud) [31].

Las microondas pueden ser generadas a través de diversos medios, entre los cuales se hallan los dispositivos sólidos y los dispositivos tipo tubo de vacío. Los sólidos se basan en semiconductores de silicio o galio (diversos tipos de transistores y diodos) [32]. Los tipos tubo de vacío funcionan según el movimiento balístico de un electrón en el vacío, bajo la influencia de campos eléctricos y/o magnéticos, entre estos, el más conocido es el magnetrón. [29].

Las microondas generan radiación no ionizante, por lo tanto, no producen cambios en la estructura molecular de la materia; la forma como son capaces de originar calor es por medio de la excitación de la moléculas de agua de los elementos. Dicho proceso ocurre mediante la estimulación de la cinética molecular, con lo que las moléculas vibran o rotan, llegando a aumentar la temperatura de los elementos capaces de absorber la energía generada. En contraste, existen materiales que no atraen la energía, dejándola pasar a través de ellos sin aumentar su temperatura, como sucede con el vidrio, la cerámica, el papel, algunos plásticos, entre otros [30].

1.4.3. Consideraciones técnicas

El horno microondas es un dispositivo capaz de generar ondas electromagnéticas. Cuenta con una estructura de paredes metálicas capaces, de reflejar las ondas emitidas por un magnetrón. Este es un sistema de alto voltaje que produce ondas de frecuencia de 2,45 GHz. y longitud de 12,2 cm. El magnetrón es un dispositivo tipo tubo de vacío, el cual es capaz de transformar la energía eléctrica en energía electromagnética. Está conformado por diversos elementos, tales como un ánodo, un cátodo o filamento, una antena y un juego de imanes (magnetos), como se observa en la figura 1.6.:

- **Ánodo:** Es un cilindro hueco de hierro, el cual envuelve a un filamento. El espacio entre las paredes del cilindro y el filamento está conformado por cavidades. Estas cavidades están destinadas a contener la nube electrónica que se forma por la estimulación eléctrica.
- **Cátodo:** Está compuesto por filamentos, los cuales están conectados a una fuente de voltaje, como lo es la corriente eléctrica. El cátodo se calienta y libera electrones.
- **Imanes:** Son los encargados de evitar que los electrones viajen de forma radial, gracias a la formación de un campo magnético que los obliga a girar alrededor del filamento en forma de espiral para alcanzar el polo positivo de alto voltaje.
- **Antena:** Círculo conectado al ánodo que se extiende dentro de una de las cavidades resonantes, uniéndose a la guía de ondas por la que se transmite la energía.

Al viajar en forma de espiral, los electrones producen una onda electromagnética perpendicular, al desplazamiento de los mismos, la cual es expulsada a través de un orificio de la cavidad [33].

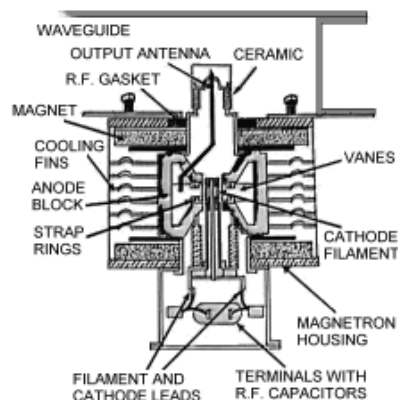


Figura 1.6. Esquema de un magnetrón. Extraído de [33].

1.4.4. Aplicación del horno microondas en el laboratorio de Histopatología

Hoy en día, es común observar el uso del horno de microondas en muchos laboratorios de histopatología; esto se debe a que en la mayoría de ellos se practican técnicas estandarizadas y adaptadas para su utilización. Entre éstas, destaca el uso del horno microondas para realizar técnicas que, convencionalmente, requieren de largos períodos de tiempo; también es útil para la implementación de recuperación antigénica inmunohistoquímica de forma más rápida. Inclusive, algunos autores ha indicado [19] que es posible acelerar la descalcificación de tejidos mineralizados a través de la exposición a la microonda, logrando resultados exitosos para técnicas posteriores, tales como inmunohistoquímica y moleculares.

En el mercado, es posible encontrar una variada oferta de hornos microondas para laboratorio, con un alto costo comercial, por lo que muchas veces resultan inaccesibles para quienes trabajan con bajos presupuestos. Debido a esto, dichos dispositivos han sido descartados en los presupuestos de los laboratorios, por lo tanto, es necesario estandarizar las técnicas anteriormente mencionadas, de manera que puedan aplicarse con la ayuda de hornos microondas convencionales de uso doméstico [26].

1.5. INMUNOHISTOQUÍMICA

1.5.1. Generalidades

La inmunohistoquímica permite la identificación y estudio de algunas sustancias celulares llamadas antígenos. Estos están conformados por proteínas, hidratos de

carbono u otros componentes tisulares que provocan reactividad inmunológica. El antígeno consiste en unidades moleculares que, unidas entre sí, poseen características especiales y únicas para su reconocimiento.

Su contraparte, los anticuerpos, son glicoproteínas que detectan determinados segmentos del antígeno, llamados epítopes. Un antígeno puede poseer varios y distintos epítopes, para los cuales existe un anticuerpo capaz de detectarlo. El epítope es una secuencia de aminoácidos específica y muy peculiar, a la cual se unen los anticuerpos. Esta unión o reacción antígeno-anticuerpo puede ser evidenciada mediante sustratos-colorantes especiales, técnica llamada inmunohistoquímica [34], [35].

Existen diversos patrones de unión del anticuerpo, dependiendo de dónde se encuentre localizado el antígeno. Por ejemplo, si el antígeno es citoplasmático, la reacción se verá evidenciada sólo en el citoplasma celular, si la técnica es adecuadamente realizada. Además, existen patrones de membrana, de organelos específicos y nucleares; estos últimos, junto a un anticuerpo citoplasmático, son los patrones de interés en esta investigación.

Dado a que en el núcleo se encuentra el material genético, es posible evidenciar proteínas que están totalmente ligadas a la regulación de los procesos nucleares y a la citofisiología. Existen anticuerpos que reaccionan con distintos antígenos nucleares que nos indicarán variados procesos celulares; de ellos en esta investigación utilizaremos Ki-67. Para corroborar que la técnica de descalcificación no arruina la muestra en estudio, y tampoco los epítopes de los anticuerpos celulares, se usó enolasa neuro específica (NSE), un anticuerpo citoplasmático que probablemente se encuentra en la muestra del estudio.

Para obtener óptimos resultados en el reconocimiento de los antígenos previamente mencionados, es necesario realizar una serie de procedimientos metódicos que forman parte de la inmunotinción. Estos serán revisados a continuación.

1.5.2. Recuperación Antigénica

El proceso de fijación, necesario para la preservación morfológica de las muestras, realizado, generalmente, con formalina, enmascara los epítopes. Esto ocurre debido a que la formalina forma puentes de metileno con algunos aminoácidos, de forma reversible y con otros de forma irreversible, cuyo resultado final es la pérdida parcial o completa de la inmuno-reactividad. Sin embargo, existen algunos epítopes que permanecen inalterados (resistentes a la formalina) [36].

Por lo anteriormente explicado, es necesario efectuar técnicas específicas y complementarias que permitan descubrir los epítopes sensibles para dar una reacción inmunohistoquímica sin falsos negativos por enmascaramiento. Existen dos métodos que re-exponen estos determinantes antigénicos:

A. Digestión Enzimática: Existen enzimas proteolíticas capaces, de escindir los enlaces provocados por la acción de los fijadores no coagulantes, exponiendo los determinantes ocultos. Algunas enzimas utilizadas para estos fines son la bromelaina, quimiotripsina, ficina, pepsina, pronasa, proteinasa K, entre otras. La elección de cada una de ellas, depende del antígeno enmascarado, debido a que, por su naturaleza química, reaccionan de distinta forma. Además, cada enzima necesita de distintas condiciones de pH, temperatura y concentración, ya que poseen rangos óptimos de acción ante estas variables.

Es muy importante considerar que la digestión enzimática es un procedimiento de uso exclusivo para tejidos fijados con formalina, no en mezclas fijadoras de otra naturaleza, como por ejemplo: Bouin, Dubosq-Brasil, Formol sublimado, entre otros. Es relevante, en el uso de estas técnicas, considerar el control del tiempo, pues si se utilizan en un período muy corto no se producirá el efecto deseado; mientras que un período largo puede llevar a la destrucción del sitio antigénico [35], [36].

B.- Calor: Busca recuperar los epítopes por medio de la exposición de los mismos al calor. Esto se logra a través del uso de temperaturas cerca del punto de ebullición del agua, donde influye la ubicación del lugar de trabajo, esto sucede porque, existen distintas condiciones de presión atmosférica que afectan su ebullición. Por lo anterior, es importante estandarizar las metodologías según la ubicación del laboratorio. Sin embargo, no se ha establecido una temperatura óptima.

Para lograr la recuperación a través del uso de calor, se utiliza una solución buffer que permite mantener el pH de la muestra estable. El más utilizado es el buffer Citrato a pH 6.0, el cual revela muchos sitios antigénicos de difícil obtención. La inducción de calor puede efectuarse mediante horno microondas, olla a presión, autoclave, vaporera y baño de María. Mediante la inducción de calor, el tiempo no es una variable exacta, porque, incluso, permite intervalos que oscilan entre 10 a 60 minutos. El mejor tiempo de recuperación se determinará dependiendo de la fijación preliminar. Luego de realizar la recuperación, se necesitan tiempos de reposo prolongados.

Si bien se han realizado investigaciones, más bien empíricas, sobre recuperación de sitios antigénicos, esta área continúa siendo desconocida, como lo hemos indicado con anterioridad. Por lo mismo, cualquier estudio que se emprenda, al respecto, dependerá de un número considerable de variables. En este sentido, algunos profesionales han procedido uniendo las propiedades de las técnicas por digestión enzimática y por calor para aplicarlas a una muestra, con el fin de disminuir los

tiempos de acción y para mejorar los resultados de tinción inmunohistoquímica [35], [36].

1.5.3. Inmunotinción Complejo Avidina Biotina (ABC)

El complejo avidina-biotina-peroxidasa, que le da el nombre a la técnica de inmunotinción ABC, se basa en la afinidad natural que posee la avidina o streptavidina por la biotina. La avidina es una glicoproteína de la clara de huevo y la streptavidina proviene de la bacteria *Streptomyces Avidinii*; la biotina, en cambio, es una vitamina del complejo B. Cada avidina (o streptavidina, si corresponde) posee cuatro sitios de unión para la biotina. A causa de la orientación de éstas sobre la avidina, se unirán menos de cuatro biotinas de forma irreversible.

Para visualizar la reacción antígeno-anticuerpo primario, se utiliza un anticuerpo secundario biotinilado. Esto quiere decir que el anticuerpo secundario posee moléculas de biotina unidas covalentemente a nivel del fragmento Fe. Esta molécula secundaria se dirige contra el anticuerpo primario, para que luego, pueda ser unida al complejo avidina-biotina-peroxidasa. El complejo se encuentra conformado por moléculas de avidina, saturadas parcialmente con moléculas de peroxidasa biotiniladas, quedando siempre un sitio activo en la avidina para que pueda ser unido al anticuerpo secundario.

Actualmente, se utiliza con mayor frecuencia la streptavidina que la avidina, debido a que, esta última, posee un punto isoeléctrico (p_i) de 10, por lo que, a pH 7,0-7,2 (neutralidad) la molécula se encuentra cargada positivamente, dejándola propensa a uniones con lectinas y componentes aniónicos del tejido. Lo anterior, genera fondo inespecífico o *background* en las muestras, obstaculizando un diagnóstico preciso.

La reacción finaliza con la adición de un sustrato cromógeno que dependerá de la enzima unida al complejo, logrando revelar la interacción antígeno-anticuerpo, anteriormente detallada, de un color específico. En el caso de la enzima peroxidasa, encontramos sustratos como 3'3'-Diaminobenzidina (DAB), 3-Amino-9-etilcarbazol (AEC), 4-Chloro-1-Naftol (CN), etc. Al ser oxidados por la enzima, tomarán color marrón, rojizo y azul, respectivamente. En otros casos, la enzima fosfatasa alcalina, unida al complejo ABC, reemplaza a la peroxidasa. La fosfatasa alcalina necesita sustratos cromógenos diferentes que permitan el revelado de la reacción. Es así que para esta enzima se utilizan Naftol AS-MX fosfato, fucsina nueva, entre otros [35], [36].

Dado que, ciertos tejidos poseen tanto peroxidasa como fosfatasa alcalina, es decir, endógenas, es necesario realizar el bloqueo de ellas, previo a la inmunotinción con el fin de disminuir el *background*. Esto ocurre a través de la exposición del corte a peróxido de hidrógeno (H_2O_2), en el caso de la peroxidasa, y un ácido débil o levamisol, en el caso de la fosfatasa alcalina [35].

1.5.4. Ki-67

Ki-67 es una proteína no histónica nuclear humana, presente en células proliferativas (que se encuentran en las etapas G1, S, G2 y M) y ausente en aquellas quiescentes o en G0 y en células en reparación del DNA. El anticuerpo monoclonal contra al Ki-67, también llamado MIB-1, es capaz de reconocer el antígeno Ki-67 en cortes de parafina, determinando la fracción proliferativa de aquellas poblaciones celulares neoplásicas y normales [36], [37], [38].

Numerosos estudios de la década pasada demostraron la validez de la fracción de crecimiento y positividad de Ki-67 con los parámetros clínico-patológicos. De hecho, es así como los patólogos logran determinar un índice de crecimiento y, por lo tanto, obtener un valor pronóstico al realizar una correlación histológica de las muestras positivas [38].

1.5.5. Enolasa Neuro Específica (NSE)

La Enolasa Neuro Específica es un isómero de la enzima glicolítica 2-fosfoglicerato hidrolasa. En mamíferos, es un dímero que puede encontrarse compuesto por la unión de dos de tres subunidades diferentes, α , β y γ . Las enolasas $\gamma\gamma$ y $\alpha\gamma$ se encuentran, en especial, en el tejido nervioso y en células neuroendocrinas, por lo que los anticuerpos anti-enolasa se dirigen a estas subunidades, al igual que en algunas patologías asociadas a tejido nervioso. De esta manera podemos visualizar neuronas y células neuroendocrinas centrales y periféricas. Por lo anterior, NSE es principalmente conocido como marcador de células neuroendocrinas. Estudios recientes han demostrado que la NSE policlonal posee escasa especificidad con respecto al monoclonal, el cual es mucho más específico [37], [39].

Debido a lo expuesto anteriormente, es fundamental disminuir el tiempo de procesamiento de muestras de tejido calcificado, sin alterar de forma excesiva su composición. Con ello se permitiría la evaluación del tejido con distintas reacciones inmunohistoquímicas, obteniendo un procedimiento de calidad y eficaz para el diagnóstico en piezas dentales temporales y tejidos calcificados en general. Por estas razones, formulamos las siguientes hipótesis, en busca de una solución a esta problemática:

H1: El tiempo de descalcificación en piezas dentales temporales con EDTA disminuye al ser acelerada con microondas y la inmuno-reactividad de las muestras, expuestas a dicho tratamiento, se ve conservada.

H0: El tiempo de descalcificación con EDTA acelerada por microondas es indeterminable y no logra conservar la inmuno-reactividad de las muestras en estudio.

CAPÍTULO 2: OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar si el uso de microondas permite acelerar el proceso de desmineralización con EDTA y permite conservar sitios inmuno-reactivos en piezas dentarias temporales.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar si se obtienen resultados positivos para la inmuno-reacciones con Ki-67 y NSE en dientes caducos descalcificados previamente con EDTA y microondas.

Determinar si la desmineralización con EDTA y microondas es más rápida que la desmineralización con EDTA a temperatura ambiente.

Comparar los resultados tanto morfológicos como de inmunotinción entre aquellas muestras tratadas con el método de descalcificación a través de EDTA con microondas, EDTA a temperatura ambiente y Ana Morse.

Confecionar un protocolo inmunohistoquímico para las piezas dentales temporales que pueda ser extrapolado para otras muestras mineralizadas.

CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS

Para lograr el propósito de esta investigación, se contó con los elementos que permitieron su desarrollo experimental, proceso avalado por los postulados sostenidos por otros investigadores. Por consiguiente, en este capítulo se detallarán, en primer lugar, los recursos materiales y condiciones ambientales y espaciales que permitieron la consecución de los experimentos. En segundo lugar, se expondrán los procedimientos empleados para lograr cada uno de los trabajos experimentales en esta investigación.

3.1. MATERIALES

Este estudio contó con un tamaño muestral de 55 ($n=55$), correspondiente a piezas dentales temporales humanas de niños entre 4 y 10 años, con ausencia y presencia de patologías dentarias. De dicha muestra, 34 dientes fueron recolectados durante el primer semestre del presente año, 3 de ellas obtenidas por exfoliación natural y 31 por exodoncia. Esta muestra estuvo constituida por dientes incisivos, caninos, premolares y molares, por lo que el tamaño de las piezas en estudio fue variable. Además, se revisaron 21 dientes deciduos fijados y descalcificados, incluidos con anterioridad en el Laboratorio de Histopatología de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile, según el protocolo adaptado por la Tecnóloga Médico María Eugenia Franco M. en el año 2001. De estos últimos, 10 se desmineralizaron con la solución de Ana Morse a temperatura ambiente, durante el año 2001; y 1, con EDTA 4% pH 7.4 a temperatura ambiente, en el transcurso del año 2004. Cabe destacar que dichos procedimientos no se realizaron en la presente investigación, por lo tanto, su recolección se efectuó sólo con fines comparativos.

Para llevar a cabo esta investigación, fue necesario contar con equipamiento, materiales, soluciones y reactivos específicos, descritos en la tabla 3.1. y 3.2, que se observan a continuación.

Tabla 3.1. *Equipamiento de laboratorio.*

| Equipo | Marca | Modelo |
|----------------------------------|------------------|---------------------------|
| Procesador Automático de Tejidos | Shanton Elliot | Duplex Processer |
| Micrótopo | E. Leitz Wetzlar | TYP 1212 |
| Navajas tejido duro | Feather | R-35 |
| Baño de estirado | Lab -Line | Tissue Float Bath Lo- Boy |
| Estufa | Memmert | --- |
| Microondas | Sindelen | MD 2500 |
| Vaporera | Oster | 5711-052 |
| pHmetro digital | Oystem | pH/MV/TEMP |
| Refrigerador | Sindelen | Cimet |
| Bomba de aspiración de vacío | Bio-G | ASP-IHQ |

Tabla 3.2. *Reactivos y soluciones utilizados en la investigación.*

| Reactivos y Soluciones | Marca | Otros |
|---|--------------------------------------|--|
| Formalina Buffer 10% pH 7.4 | Variable | Fijador |
| EDTA 10% pH 7.4 | Hänel | Desmineralizador |
| Solución Ana Morse (Ácido Fórmico 40% y Citrato de Sodio 20%) | Merck | Desmineralizador |
| Acetato de Butilo | Merck | Aclarante |
| Parafina P.F. 58°C | Merck | Histowax |
| Portaobjetos silanizados (silane) | Polyscience | 3-aminopropilensilane |
| Citrato de Sodio pH 6.0 10mM | Merck | Recuperador Antigénico |
| Proteinasa K | Visionbiosystems Novocastra™ | NCL-PK Recuperador Antigénico |
| RTU-NSE 2 | Visionbiosystems Novocastra™ | Anticuerpo Primario Monoclonal |
| RTU-Ki67-MM1 | Visionbiosystems Novocastra™ | Anticuerpo Primario Monoclonal |
| Buffer Fosfato Salino (PBS) | Powdered Phosphate Buffer Hemagen | Lavado |
| Complejo ABC Streptavidina/Peroxidasa NCL-RTU-Qu | Vector, USA | Suero N Horse, Anticuerpo secundario policlonal y complejo ABC |
| Kit de revelado DAB | Zymed, USA | Sustrato/Cromógeno |
| Batería de Tinción Hematoxilina y eosina (H-E) | --- | Véase apéndice A |
| Batería de Tinción Tricrómico de Masson (TCM) | --- | Véase apéndice B |
| Medio de Montaje Hidrófobo | Lerner Laboratories | Flo-Texx® Rev. 1,6/96 |

3.2. MÉTODOS

El diseño de este estudio corresponde a una investigación científica experimental [40], [41]. La visualización microscópica de las muestras sometidas a tinción de rutina, TCM e inmunotinción, se realizó a través de un estudio doble ciego, con el propósito de que las evaluadoras no fuesen influenciadas por otras opiniones y, de esta manera, que los resultados se analizaran con mayor objetividad.

Se manipuló la variable descalcificador para observar sus efectos sobre la morfología de las muestras y su inmunotinción. Además, luego de varios intentos, se eliminó del protocolo la variable recuperación antigénica para observar si se presentaba o no inmunotinción celular. Por otro lado, se observó la relación entre el tiempo de desmineralización y volumen de cada diente. [42]. Para corroborar la correcta implementación de las técnicas inmunohistoquímicas de Ki-67 y NSE, se emplearon tanto controles positivos como negativos de muestras de tejido blando sin descalcificar.

Teniendo en cuenta lo anterior, las piezas dentales fueron procesadas, independientemente del tipo de extracción, es decir, ya fuera por exodoncia o por exfoliación. De esta manera, en primer lugar, se fijaron en formalina buffer 10%, al menos por 48 horas. Luego, fueron lavadas en agua corriente, al menos por 30 minutos, para proceder a su descalcificación.

La descalcificación se llevó a cabo con las soluciones de EDTA y Ana Morse. De las piezas dentales recolectadas, 30 se sumergieron en solución de EDTA 10%, a 36°C en horno microondas con sonda de temperatura, por un período prolongado de tiempo, el que varió en determinadas muestras, hasta que fuera completada su descalcificación. El horno microondas se utilizó por 8 horas diarias, de lunes a viernes, mientras que en el tiempo restante la solución se mantuvo a temperatura ambiente. El EDTA se renovó cada 2 días, midiendo en estos cambios su temperatura y pH. Asimismo, se procesaron 4 dientes en Ana

Morse a temperatura ambiente, ininterrumpidamente, hasta su descalcificación. Los controles de temperatura y pH se realizaron con termómetro p.a. y con pH metro digital.

Para determinar el grado de descalcificación de las muestras, se realizó, primeramente, un examen físico (véase imagen 3.1.). En algunos casos, este método fue complementado con imagen radiológica, específicamente, cuando su desmineralización ofrecía dudas. Si la muestra evidenciaba áreas calcificadas, la desmineralización fue continuada (véase imagen 3.2. y 3.3.)



Imagen 3.1. Examen físico.
Dientes en proceso de desmineralización EDTA y microondas.

Imagen 3.2. Examen radiográfico (a). Muestras es proceso de desmineralización EDTA y microondas. Se observa radiolucidez de todas las piezas.





Imagen. 3.3. Imagen radiológica (b). Dientes en proceso de descalcificación. Se observa, en el centro de las muestras, una zona radiopaca correspondiente a tejido aún mineralizado.

Una vez descalcificadas las piezas dentales, se deshidrataron en procesador automático de tejidos y se incluyeron en parafina con punto de fusión 58°, formando los moldes de inclusión con los dientes en posición de corte sagital. Los moldes fueron guardados en el congelador de refrigerador a -4°C, por lo menos, 24 horas antes de ser cortados.

Se procedió a realizar 5 cortes de 4 μm con la utilización de micrótomo y navajas desechables para tejidos duros. En los casos de cortes para tinción de rutina (H-E) y TCM, fueron estirados en baño a 40°C y secados en estufa a 60°C por 30 minutos. Para los de tinción inmunohistoquímica, los cortes fueron recogidos con portaobjetos previamente silanizados y secados 30 minutos en estufa a 60°C, y luego en estufa a 37°C por toda una noche [17].

Para cada diente se efectuó tinción de H-E (Véase protocolo en Apéndice A), tinción TCM (Véase protocolo en Apéndice B) y, finalmente, inmunotinción con los anticuerpos Ki67 y

NSE (Véase protocolo en Apéndice D). A continuación, se presentará el procesamiento experimental inmunohistoquímico, llevado a cabo en este estudio.

3.2.1. Inmunotinción experimental

Luego del procesamiento anteriormente descrito y de las tinciones de rutina y tricrómico, se realizaron las tinciones inmunohistoquímicas experimentales, hasta llegar al protocolo final utilizado para el tipo de muestras estudiadas. Los dientes ya cortados fueron desparafinados e hidratados mediante batería de desparafinación consistente en xiloles y alcoholes descendentes, hasta llegar a un último baño de agua destilada. Una vez terminado este procedimiento, los cortes se sometieron a lavados con PBS. Luego, se adicionó Suero N Horse, el cual fue posteriormente descartado, y se le aplicó el anticuerpo primario monoclonal correspondiente para cada caso (Véase Tabla 3.3.). Éstos actuaron sobre la muestra durante al menos 12 horas a 4°C en refrigeración, bajo el paso determinado por los protocolos, como *overnight* [6], [34].

Tabla 3.3. *Anticuerpos primarios utilizados en la inmunotinción experimental.*

| Tipo de Anticuerpo | CLON | Patrón de tinción |
|---------------------------|--------------|--------------------------|
| Ki-67 | RTU-Ki67-MM1 | Nuclear |
| NSE | RTU-NSE2 | Citoplasmático |

Posterior al anticuerpo primario, se realizaron lavados en PBS para luego realizar bloqueo de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3% (H₂O₂), a temperatura ambiente. Una vez bloqueada la enzima, se lavó nuevamente con PBS y los cortes se incubaron con anticuerpo secundario policlonal a 37°C. Seguida a la

incubación, se lavaron con PBS y se les aplicó el complejo avidina-biotina-peroxidasa a 37°C. Se continuó con un nuevo lavado en PBS y la revelación de la reacción con el sustrato cromógeno DAB a temperatura ambiente. Se finalizó con contraste nuclear con hematoxilina de Harris, deshidratación, aclaración y montaje en medio hidrófobo (Véase protocolo Apéndice D).

CAPÍTULO 4: RESULTADOS

Se presentarán los resultados de la presente investigación; de esta manera se dará cuenta de las comparaciones realizadas entre los diferentes desmineralizadores. Éstos se expondrán mediante gráficos y tablas, ordenados según distribución, temperatura, pH, tiempo de desmineralización, morfología y técnica histológica, tinción de rutina y tricrómico, y, finalmente, tinción inmunohistoquímica.

4.1. DISTRIBUCIÓN

Se procesaron 55 dientes temporales extraídos por dolor en postas de urgencia infantiles de la ciudad de Santiago, cuya distribución se describe a continuación.

La muestra se distribuyó en 4 grupos, clasificados por el tipo de descalcificación, temperatura y período de tiempo en el que fueron desmineralizados. De esta forma, se tuvo dientes descalcificados con EDTA a temperatura ambiente, realizados en estudio del año 2004; con EDTA y microondas, efectuados el presente año; con Ana Morse a temperatura ambiente, procesados el año 2001; y finalmente, con desmineralización por Ana Morse a temperatura ambiente, realizados en el presente año. Su distribución dentro de la muestra se exhibe en la Tabla 4.1

Tabla 4.1. *Distribución de dientes según tipo de desmineralización.*

| Tipo de desmineralización | Cantidad dientes | Distribución Porcentual % |
|----------------------------------|-------------------------|----------------------------------|
| EDTA Microondas | 30 | 54.55 |
| EDTA T. Ambiente | 11 | 20 |
| Ana Morse Anterior | 10 | 18.18 |

En la tabla 4.1, se observa la distribución de los dientes en porcentajes (%), por cada desmineralizador. La mayor cantidad de muestras se constató descalcificada con EDTA y microondas, con un 55% del total de la muestra. Le siguió con EDTA T.A., descalcificados el año 2004, con un 20%; luego, con Ana Morse, descalcificados el año 2001, con un 18%. Finalmente, con Ana Morse actual, un 7% del total de la muestra. Para efectos estadísticos, los dientes desmineralizados en Ana Morse, tanto del año 2001 como los actuales, se tomaron como un mismo grupo dentro de la muestra.

4.2. TEMPERATURA

Las temperaturas mostradas en la Tabla 4.2 y Gráfico 4.1 señalan los cambios entre las soluciones descalcificadoras sometidas a temperatura a través de las microondas, y a temperatura ambiente. Cabe destacar que pesar de encontrarse en la misma área de trabajo, las soluciones a temperatura ambiente de EDTA y Ana Morse mostraron una diferencia aproximada de 5°C en sus promedios de temperatura. Por otro lado, EDTA, sometido a calor controlado, se mantuvo con poca variabilidad, con una diferencia de 7°C entre su mayor y menor temperatura (véase línea de temperatura en Gráfico 4.2).

Las mediciones de temperatura ejecutadas sobre la solución de EDTA temperatura ambiente se realizaron tomando como referencia las muestras mineralizadas del servicio en proceso de desmineralización y sólo con fines comparativos.

Tabla 4.2. *Comparación temperaturas desmineralizadores*

| Tipo de Desmineralización | Menor Temperatura °C | Mayor Temperatura °C | Promedio de Temperatura °C |
|---------------------------|----------------------|----------------------|----------------------------|
| EDTA Microondas | 32.0 | 39.4 | 35.76 |
| EDTA T. Ambiente | 16.0 | 19.0 | 17.17 |
| Ana Morse | 20.0 | 26.0 | 22.71 |

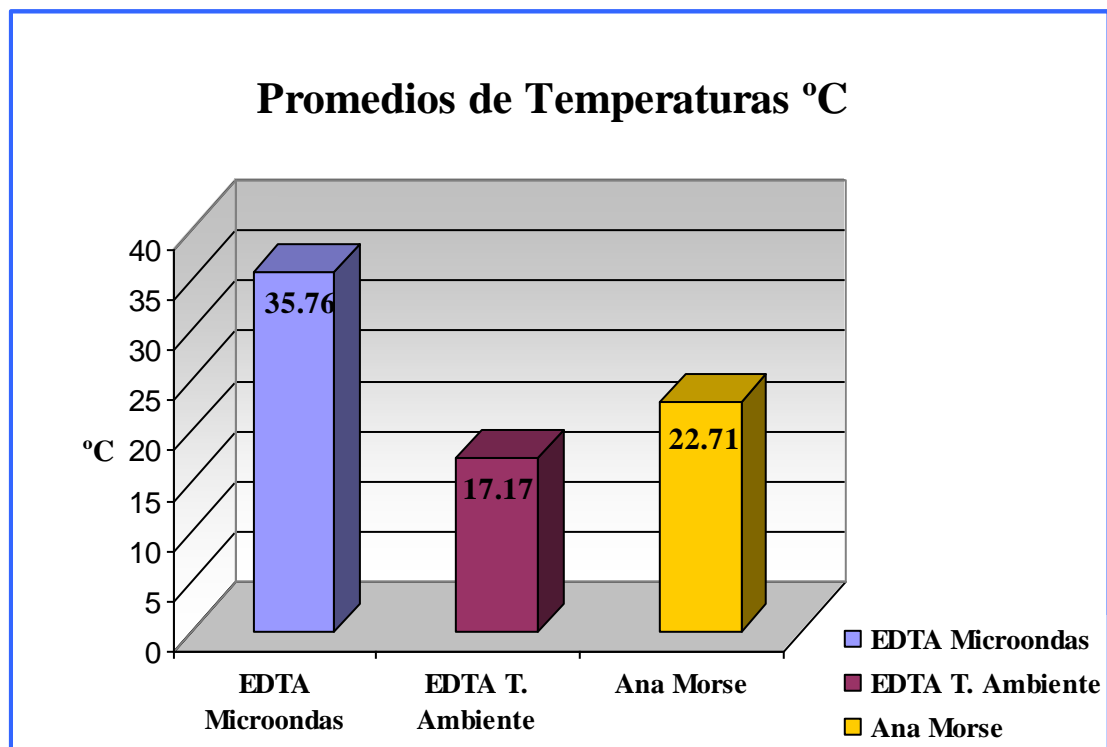


Gráfico 4.1. *Comparación de temperaturas de los descalcificadores.*

En el Gráfico 4.1, se destaca la temperatura obtenida con EDTA y microondas, con un valor de 35,76°C en promedio, a diferencia de las soluciones de EDTA y Ana Morse, las cuales

estuvieron a temperatura ambiente y cuyos valores promedio fueron de 17,17°C y 22,71°C, respectivamente.

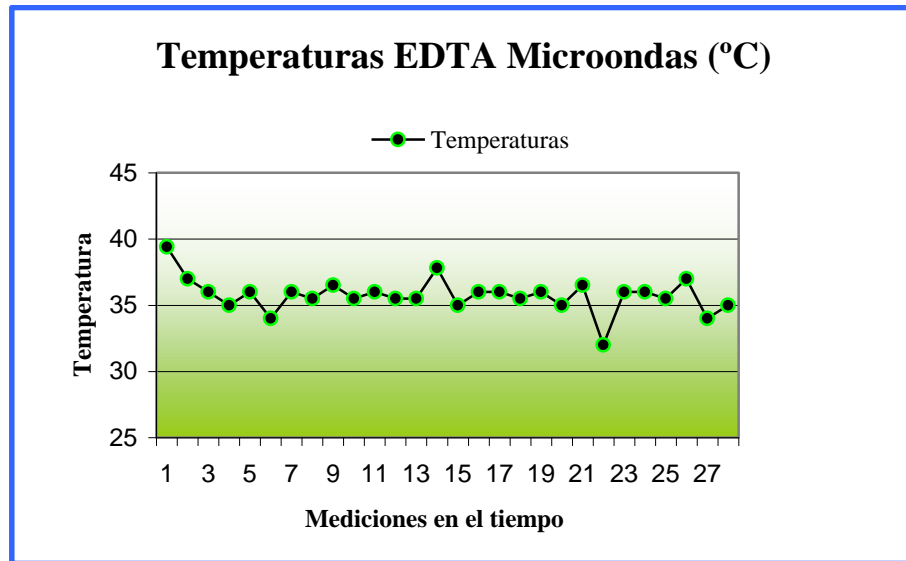


Gráfico 4.2. *Temperaturas de la descalcificación con EDTA microondas.*

El Gráfico 4.2 muestra las oscilaciones de temperaturas (°C) durante las mediciones en el período de desmineralización de las piezas dentales caducas, en donde se observan los dos puntos principales de variación: el menor en 32°C y el mayor en 39,4°C.

4.3. PH

Las mediciones de pH en esta investigación arrojaron diferencias significativas entre las soluciones ácidas y quelantes, independientes de la temperatura a las cuales fueron sometidas. Por su parte, entre soluciones EDTA T.A. y EDTA microondas no existieron diferencias significativas (véase Tabla 4.3, Gráfico 4.3 y 4.4).

Las mediciones de pH ejecutadas sobre la solución de EDTA temperatura ambiente se realizaron tomando como referencia las muestras mineralizadas del servicio en proceso de desmineralización y sólo con fines comparativos.

Tabla 4.3. Comparación de pH de las soluciones descalcificadoras.

| Desmineralizador | Valor menor pH | Valor mayor pH | Promedio pH |
|------------------|----------------|----------------|-------------|
| EDTA Microondas | 5.86 | 7.29 | 6.8 |
| EDTA T. Ambiente | 7.17 | 7.34 | 7.27 |
| Ana Morse | 1.25 | 1.61 | 1.42 |

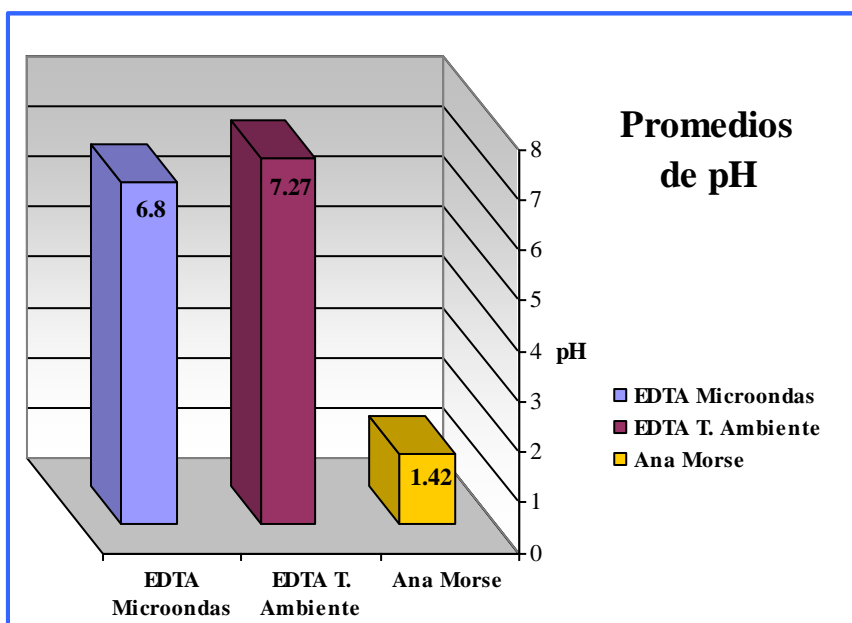


Gráfico 4.3. Comparación de pH de los descalcificadores.

En el Gráfico 4.3 se muestran las diferencias de pH entre los desmineralizadores, en donde el promedio más alto fue EDTA T.A., con un valor de 7.27. En tanto, el promedio menor lo arrojó Ana Morse, con un pH de 1.42. El valor medio entre las dos soluciones a temperatura ambiente lo obtuvo EDTA microondas, con pH de 6.8.

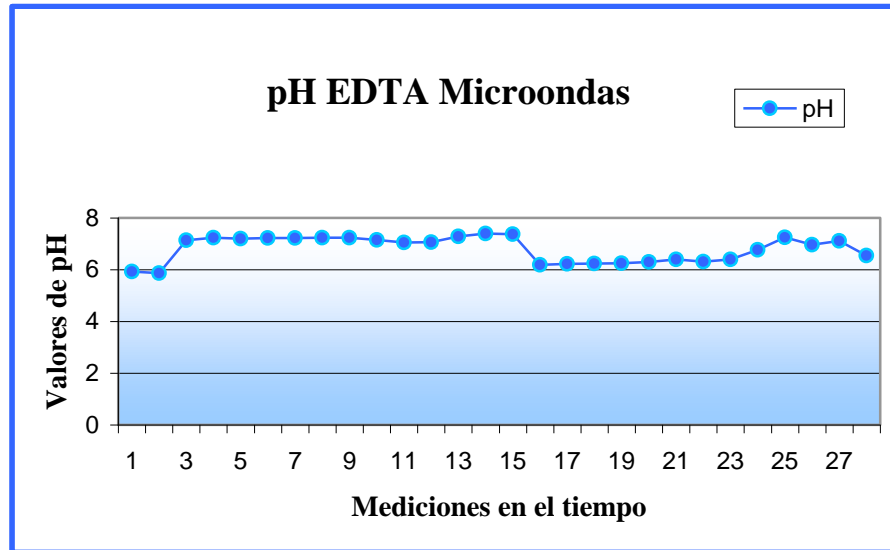


Gráfico 4.4. *Valores de pH EDTA Microondas.*

Los valores de pH de EDTA y microondas obtenidos a través del tiempo pueden ser observados en el Gráfico 4.4. Allí se muestra que las mayores variaciones arrojaron un valor de pH menor de 5.86 y uno mayor de 7,29.

4.4. TIEMPO DE DESMINERALIZACIÓN

La solución de EDTA a temperatura ambiente, según [19], demora aproximadamente entre 4 a 7 meses. Por su parte, la descalcificación realizada con Ana Morse otorgó un resultado eficaz al desmineralizar las 4 piezas dentales en 51 días. En cambio, las piezas dentales

sometidas a descalcificación con EDTA microondas mostraron un promedio 68 días para su total desmineralización, con un tiempo menor de 29 días, y otro mayor de 104 días. Al aproximar estas cifras, es posible afirmar que los dientes caducos humanos tardan en descalcificarse entre 3 y 6 semanas, con un promedio de 5 semanas en solución de EDTA pH 7.4 con microondas a temperatura 36°C. Para detalles de cada diente, ver Gráfico 4.5.

La probabilidad de disminuir el tiempo de descalcificación, relacionado con el tamaño de las muestras, y la presencia o ausencia de caries, no fue estadísticamente significativo. Las estadísticas de estos procedimientos se llevaron a cabo mediante las pruebas de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney, respectivamente (véase Anexo 1).

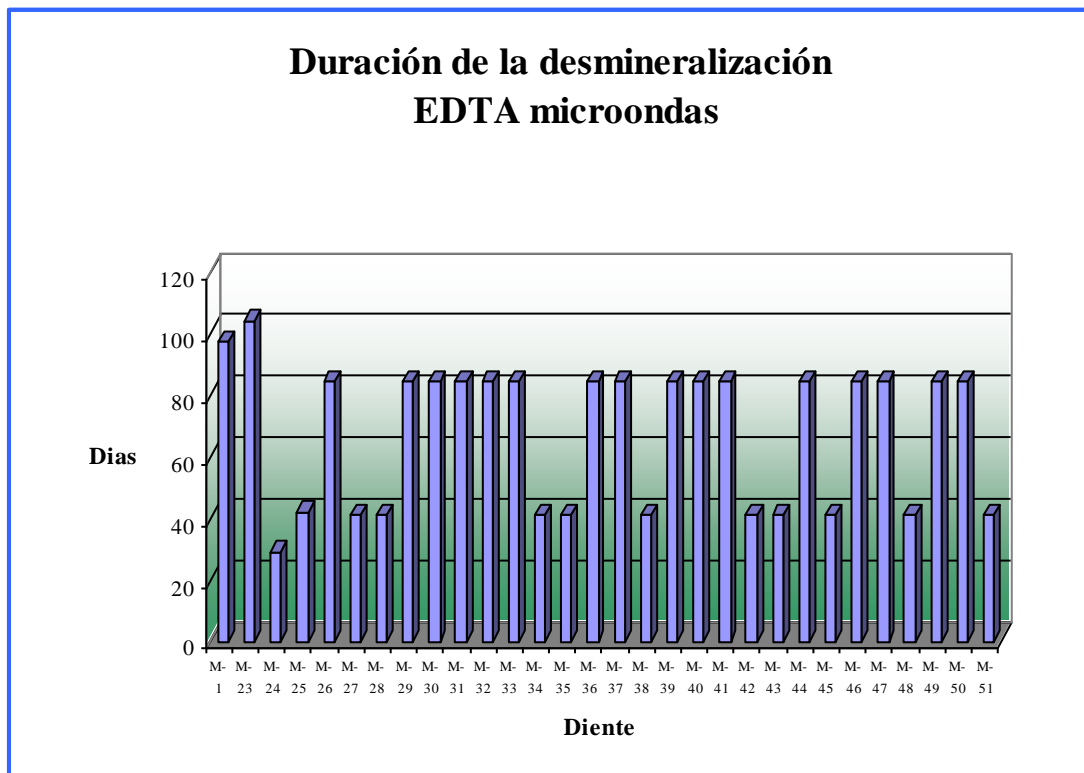


Gráfico 4.5. *Tiempos de descalcificación EDTA Microondas.*

El Gráfico 4.5 muestra los tiempos (en días), de desmineralización en EDTA y microondas para cada una de las 30 muestras sometidas a esta solución. La mayoría de las piezas se desmineralizó en tiempos similares; sin embargo, el menor tiempo de desmineralización se cumplió en 29 días, y el mayor, en 104 días.

Estos dientes fueron divididos en tres grandes grupos, correspondientes al tipo de desmineralizador utilizado para su procesamiento. Es así como 14 dientes se incluyeron en el grupo de Ana Morse, descalcificados antiguos y nuevos dentro de un mismo grupo; 11 integraron el grupo de EDTA temperatura ambiente; y 30 fueron de EDTA microondas.

4.5. MORFOLOGÍA Y TÉCNICA HISTOLÓGICA

El aspecto morfológico permitió evaluar las condiciones de las muestras procesadas para realizar una inmunotinción posterior. Los resultados de la morfología de las muestras se presentan divididos en los grupos ya mencionados, evaluándose la presencia o ausencia de tejido periodontal, como consta en la tabla 4.4. Las fallas de la descalcificación, en Gráfico 4.6; y fallas de corte, en Gráfico 4.7, Gráfico 4.8 y Gráfico 4.9.

Tabla 4.4. *Presencia de tejido periodontal según desmineralizador*

| Desmineralizador | Dientes con tejido periodontal | Dientes sin tejido periodontal | Totales |
|-------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|----------------|
| EDTA y microondas | 29 | 1 | 30 |
| EDTA T. Ambiente | 11 | 0 | 11 |
| Ana Morse | 14 | 0 | 14 |

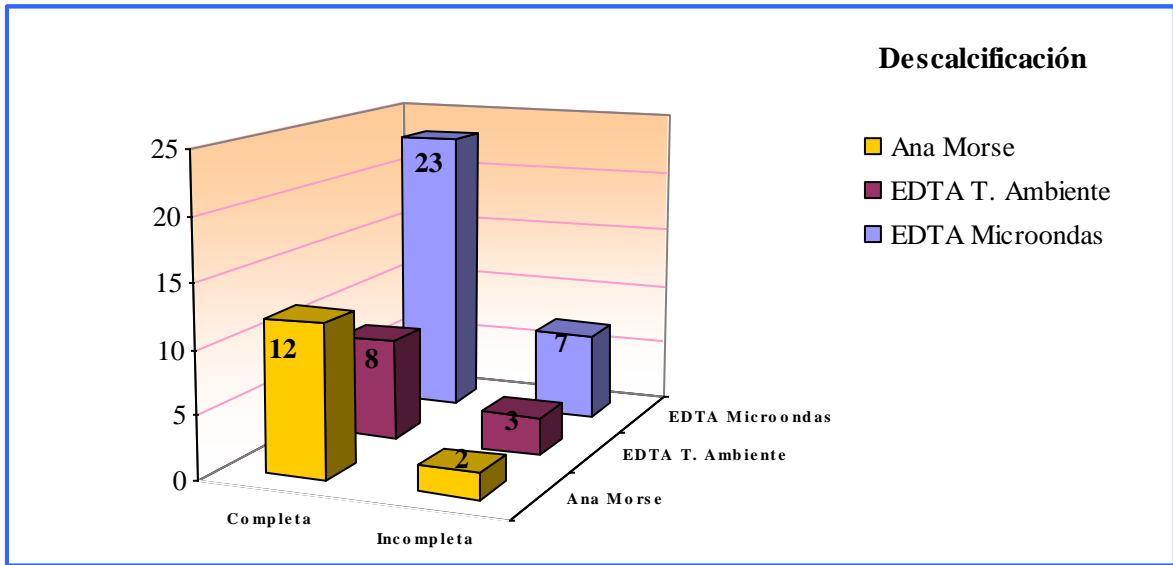


Gráfico 4.6. *Falla de descalcificación. Cantidad de piezas cuya mineralización no fue observada a través del examen físico de las muestras.*

El Gráfico 4.6 muestra las piezas dentales que no se desmineralizaron completamente, de las cuales la mayor cantidad es de EDTA y microondas con 7 piezas; luego EDTA T.A. con 3; y finalmente, Ana Morse con 2.

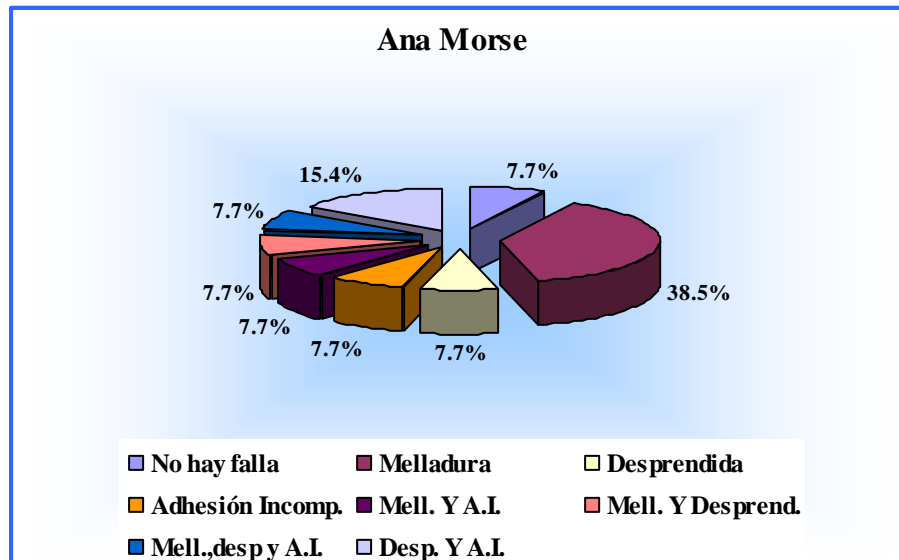


Gráfico 4.7. *Tipos de fallas en el corte con Ana Morse. Mell. Melladura. A.I. Adhesión Incompleta. Desp. Dependimiento.*

El Gráfico 4.7 representa la distribución porcentual de las distintas fallas producidas desde el momento del corte hasta su tinción, con la metodología de descalcificación Ana Morse. Los valores a destacar son: piezas dentales sin falla, correspondientes al 7.7%; y la falla más común, las melladuras correspondientes a un 38.5%.

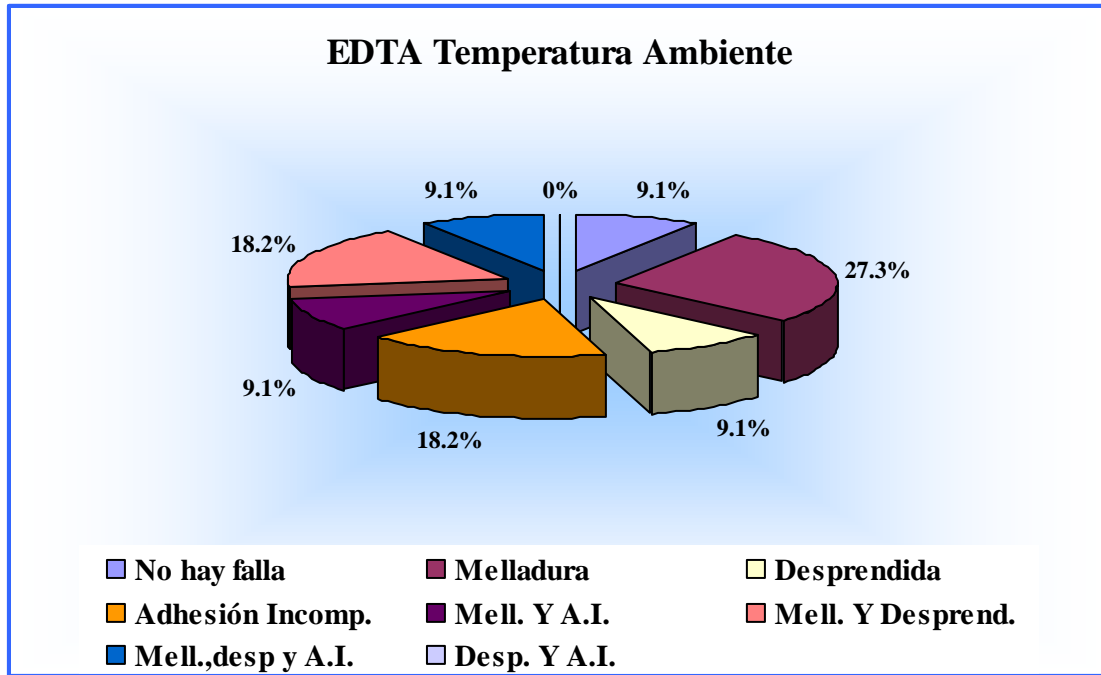


Gráfico 4.8. Tipos de fallas en el corte con EDTA a temperatura ambiente. Mell. Melladura. A.I. Adhesión Incompleta. Desprend. Desprendimiento.

El Gráfico 4.8 permite observar la distribución porcentual de las fallas producidas desde el corte hasta su tinción, con descalcificación EDTA T.A. Los valores importantes son: piezas dentales sin falla, correspondientes al 9.1%; y las melladuras, correspondientes al 27.3%.

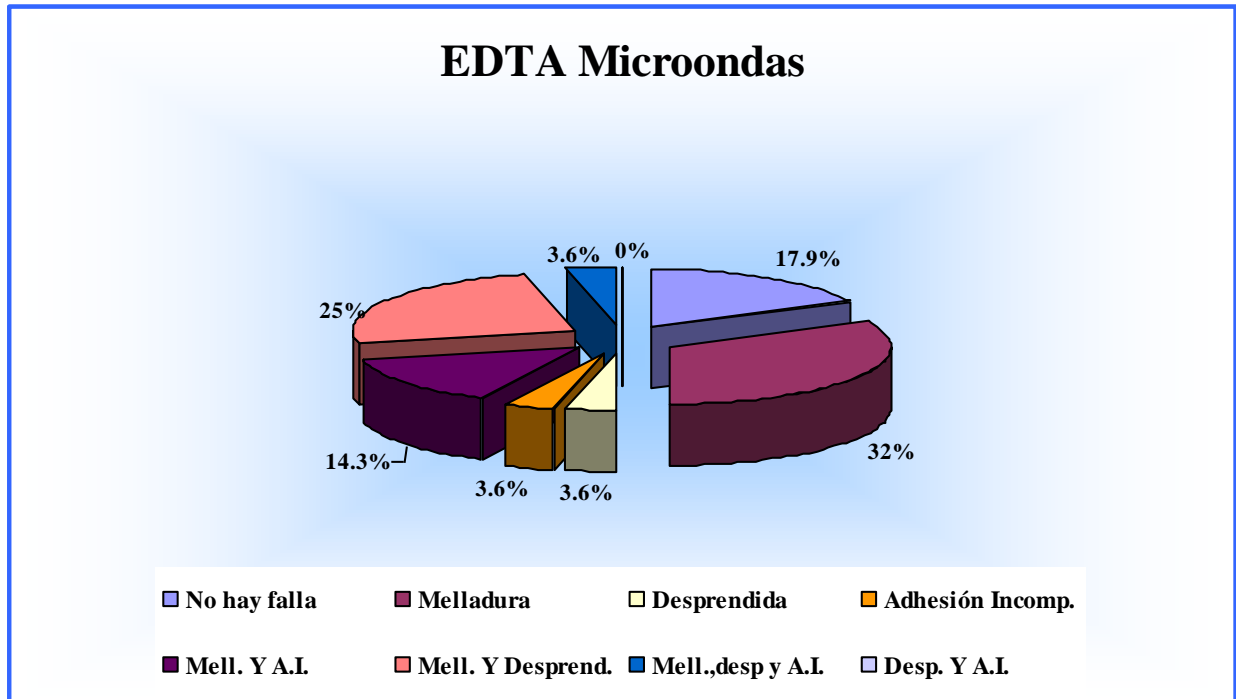


Gráfico 4.9. *Tipos de fallas en el corte con EDTA microondas. Mell. Melladura. Desprend.y desp. Desprendimiento.*

El Gráfico 4.9 muestra la distribución porcentual de las distintas fallas producidas desde el momento del corte hasta su tinción, con la metodología de descalcificación EDTA y microondas. Los valores destacables son: piezas dentales sin falla, correspondientes al 17.9%; y, la falla más común, las melladuras correspondientes al 32%.

4.6. TINCIÓN DE RUTINA Y TRICRÓMICO

Los resultados de las tinciones de rutina y Tricrómica no arrojaron grandes diferencias entre los tipos de descalcificadores. La calidad de tinción de núcleos y citoplasmas en rutina se pueden visualizar en los gráficos 4.10 y 4.11.

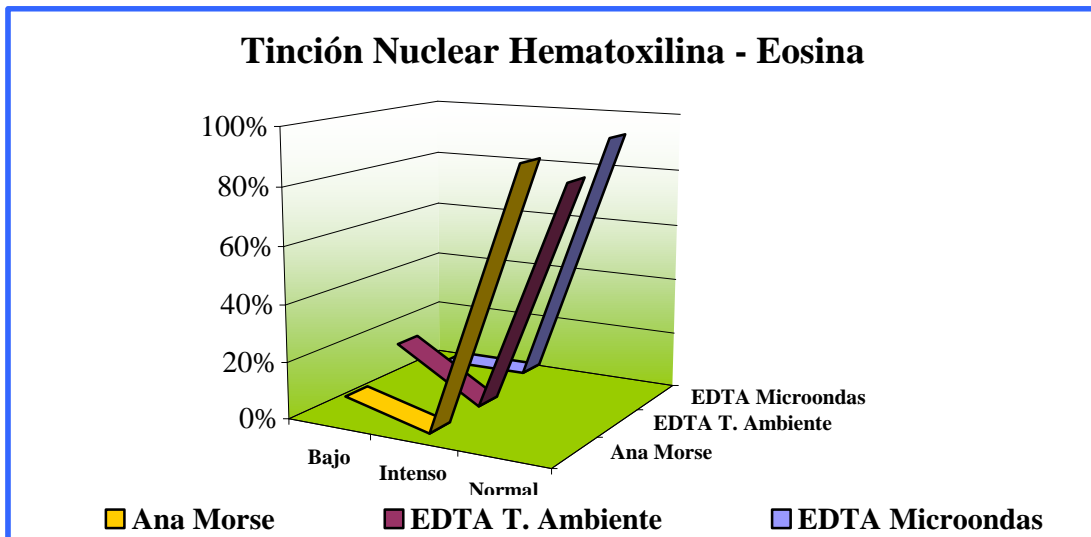


Gráfico 4.10. Comparación de la intensidad de la tinción nuclear. Entre Ana Morse, EDTA temperatura ambiente y EDTA microondas. En tinción de hematoxilina - eosina.

En el Gráfico 4.10, se representan los grados de intensidad nuclear con Hematoxilina-Eosina, medidos para los distintos descalcificadores. Es así como EDTA microondas entregó el 92.9% de los núcleos de coloración normal; EDTA T.A. lo hizo en un 92.3%; y Ana Morse, en un 81.8%.

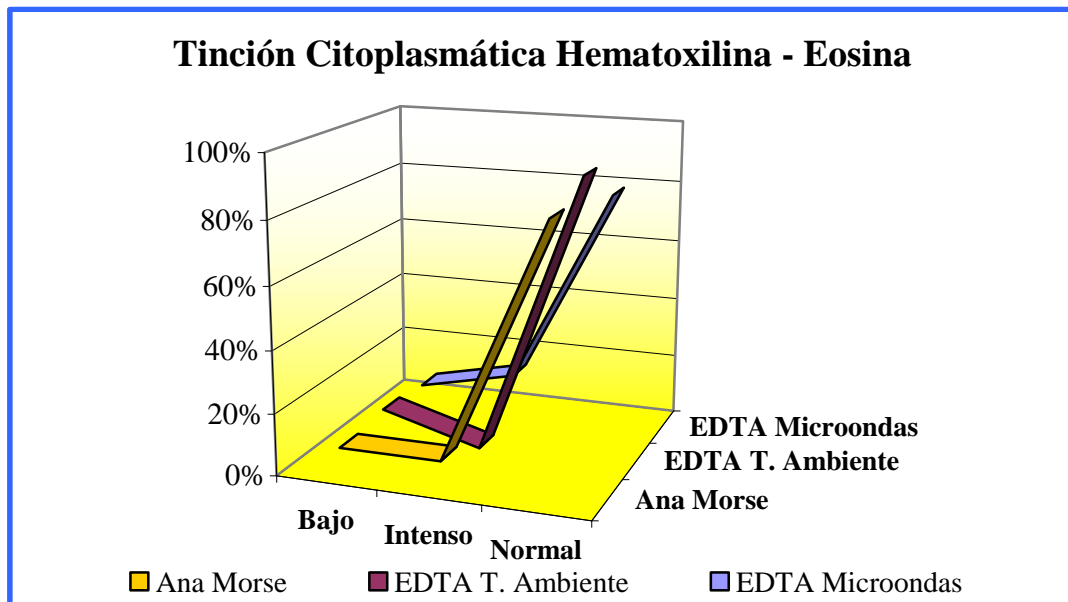


Gráfico 4.11. Comparación de intensidad de tinción citoplasmática. Hematoxilina – eosina de los diferentes desmineralizadores.

En el Gráfico 4.11, se visualizan los grados de intensidad citoplasmática con Hematoxilina – Eosina, medidos para los distintos descalcificadores. Por lo tanto, EDTA microondas aportó el 78.6% de los citoplasmas de coloración normal, EDTA T.A. lo hizo en un 90.9%, y Ana Morse, en un 84.6%.

La tinción TCM también arrojó resultados similares entre los desmineralizadores para núcleos, citoplasmas y fibras, los cuales son cuantificados en los gráficos 4.12, 4.13 y 4.14, respectivamente.

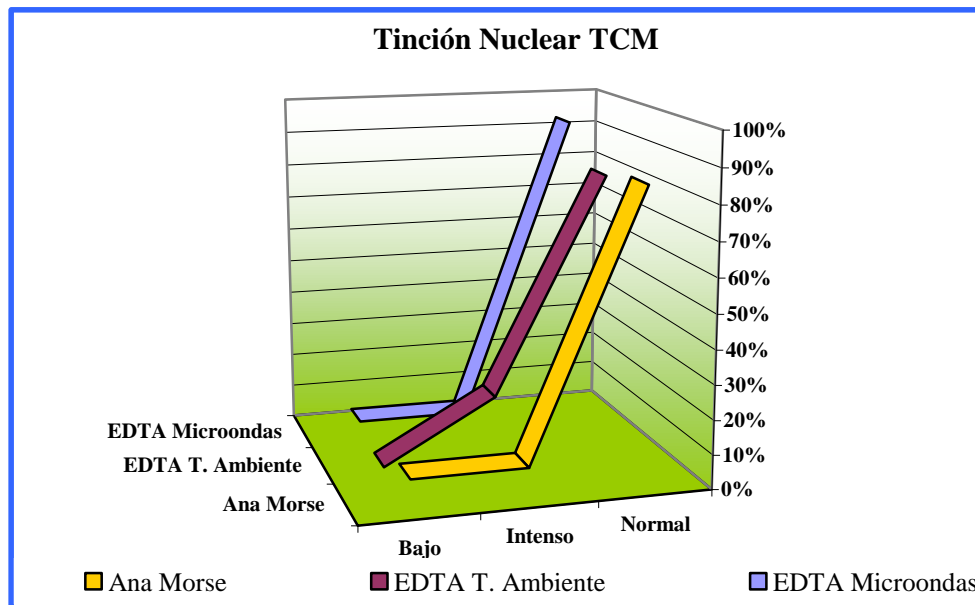


Gráfico 4.12. Comparación intensidad de la tinción nuclear TCM. Entre Ana Morse, EDTA temperatura ambiente y EDTA microondas.

En el gráfico 4.12, se visualizan los grados de intensidad nuclear con TCM, medidos para los distintos descalcificadores. Es así como EDTA microondas entregó el 92.9% de los núcleos de coloración normal, EDTA T.A. lo hizo en un 81.8%, y Ana Morse, en un 84.6%.

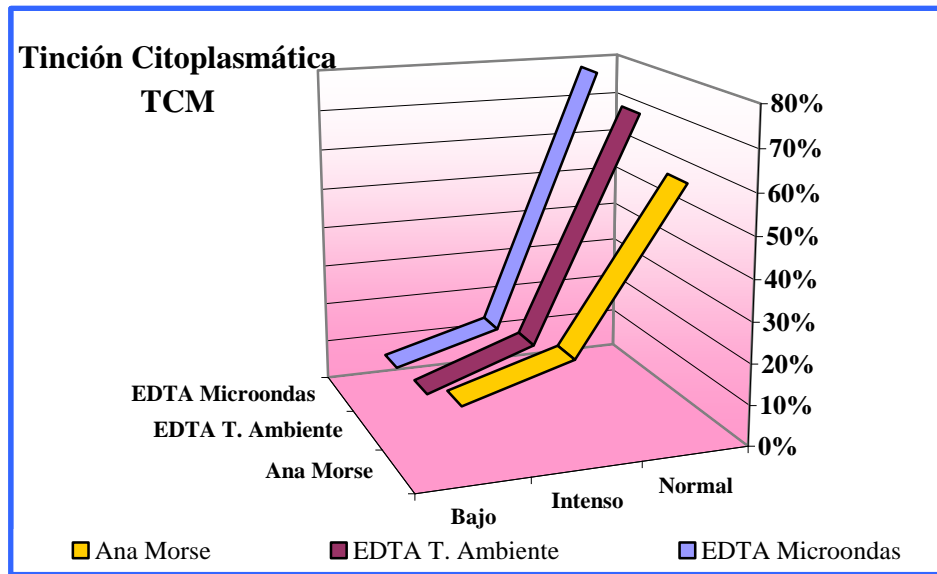


Gráfico 4.13. Comparación intensidad de tinción citoplasmática TCM. Entre Ana Morse, EDTA temperatura ambiente y EDTA microondas.

En el Gráfico 4.13, se visualizan los grados de intensidad citoplasmática con TCM, para los descalcificadores. En consecuencia, EDTA microondas entregó el 78.6% de los citoplasmas de coloración normal, EDTA T.A. lo hizo en un 72.7%, y Ana Morse, en un 61.5%.

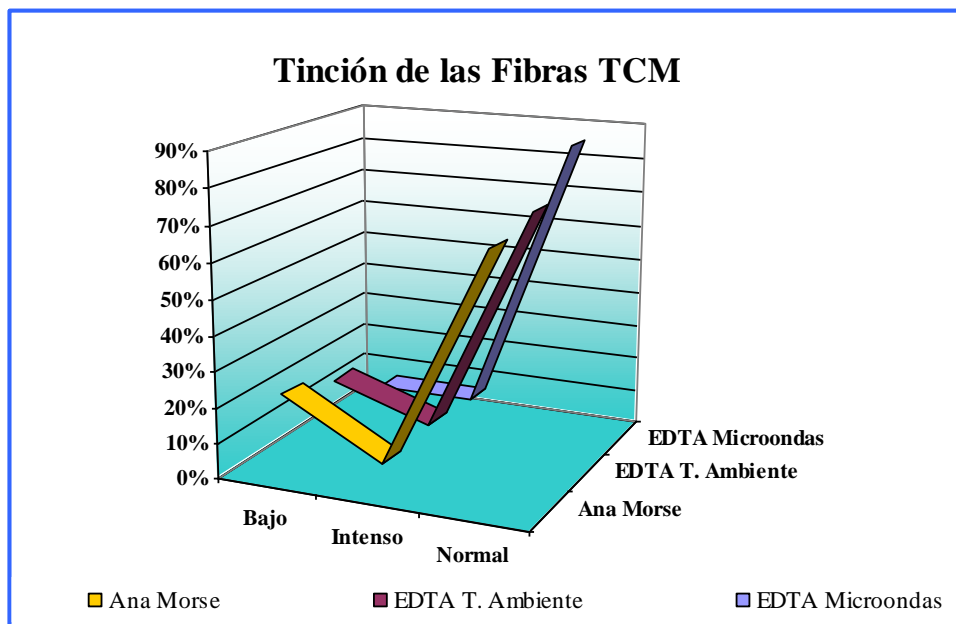


Gráfico 4.14. Comparación intensidad de tinción de fibras TCM. Entre Ana Morse, EDTA temperatura ambiente y EDTA microondas.

En el Gráfico 4.14, se visualizan los grados de intensidad de fibras con TCM, medidos para los distintos descalcificadores. Es así como EDTA microondas entregó el 85.8% de las fibras de coloración normal, EDTA T.A. lo hizo en un 72.7%, y Ana Morse, en un 69.2%.

En las imágenes mostradas a continuación se observan los resultados de las tinciones de HE y TCM. En éstos se observa pulpa bien conservada, dentina, unión pulpo-dentinaria, odontoblastos, pulpa necrótica y absceso pulpar.



Imagen 4.1. Diente descalcificado EDTA Microondas (a). Tinción H-E 40X. **D:** Dentina. **P:** Pulpa. **O:** Odontoblastos. **VS:** Vaso sanguíneo.

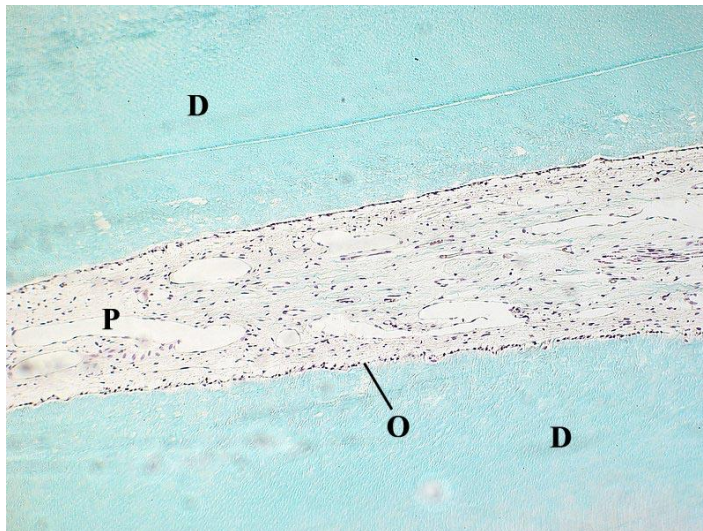


Imagen 4.2. Diente descalcificado EDTA microondas (b). Tinción TCM 10X. **D:** Dentina. **P:** Pulpa. **O:** Odontoblastos en unión pulpo-dentinaria.

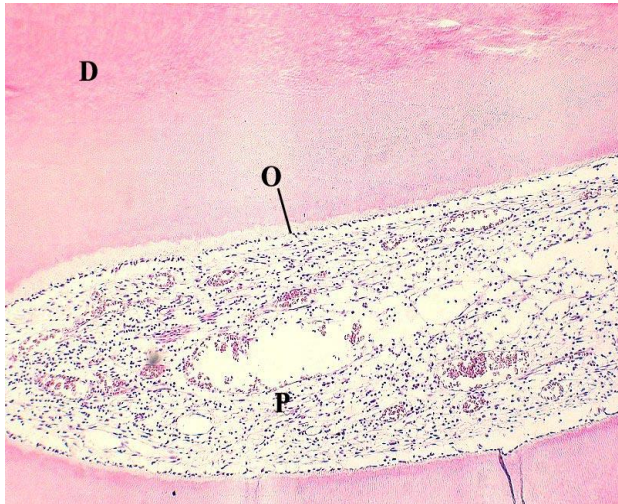


Imagen 4.3. Diente descalcificado EDTA T.A.
 (a).Tinción HE 10X. **D:** Dentina. **P:** Pulpa.
O: Odontoblastos en unión pulpo-dentinaria.

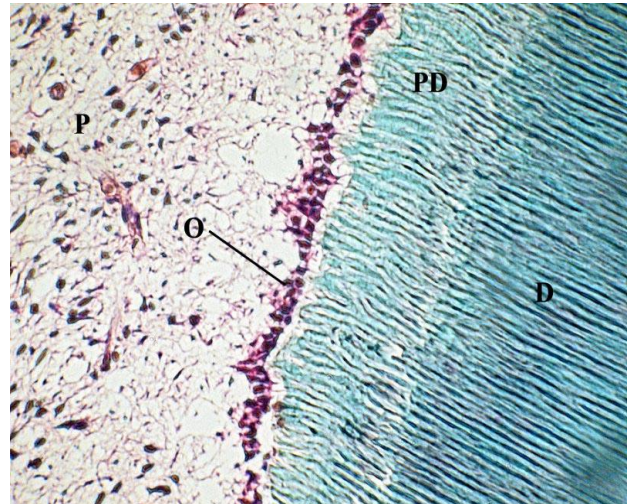


Imagen 4.4. Diente descalcificado EDTA T.A.
 (b). Tinción TCM 40X. **D:** Dentina.
P: Pulpa. **O:** Odontoblastos. **PD:** predentina.

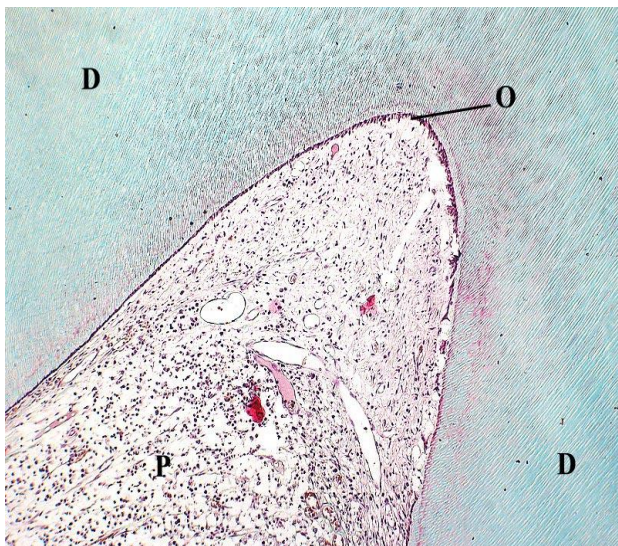


Imagen 4.5. Diente descalcificado Ana Morse
 (a). Tinción TCM 10X.
D: Dentina. **P:** Pulpa. **O:** Odontoblastos.

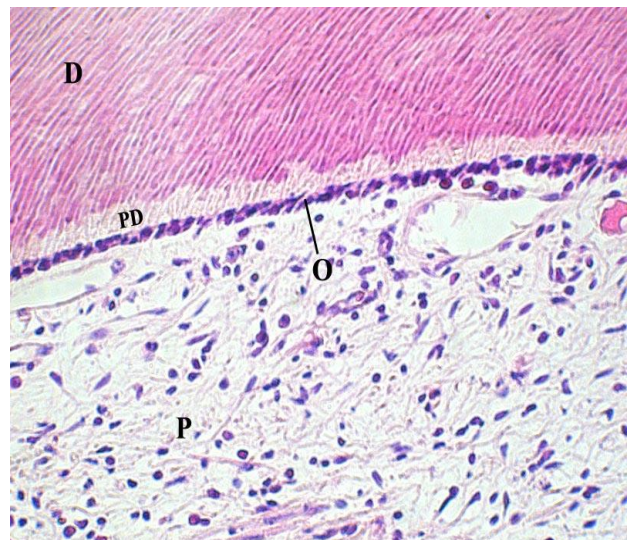


Imagen 4.6. Diente descalcificado Ana Morse (b).
 Tinción HE 40X. **D:** Dentina.
P: Pulpa. **O:** Odontoblastos. **PD:** predentina

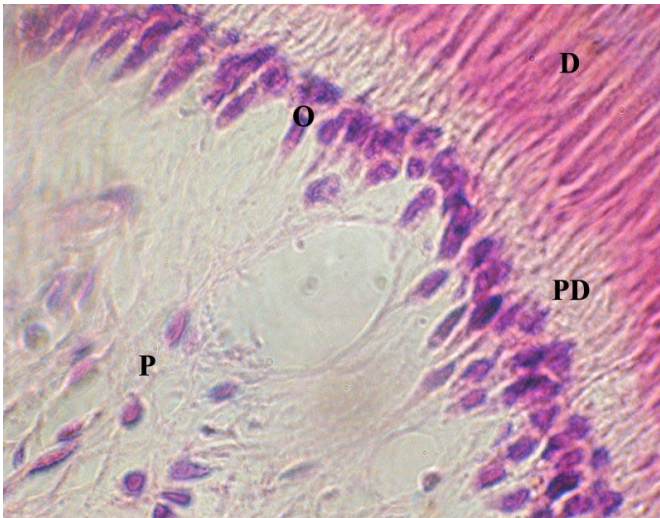


Imagen 4.7. Unión Pulpo-dentinaria.

Muestra descalcificada en Ana Morse. Lente de Inmersión 100X. Tinción de HE. Unión pulpo dentinaria donde se observa la dentina no mineralizada o predentina (PD), la dentina (D), células cilíndricas denominadas odontoblastos (O) y la pulpa (P).

Imagen 4.8. Dentina. Diente descalcificado EDTA T.A. Tinción hematoxilina. Lente de Inmersión 100X. Se distingue la dentina (D) y sus túbulos dentinarios (Td).

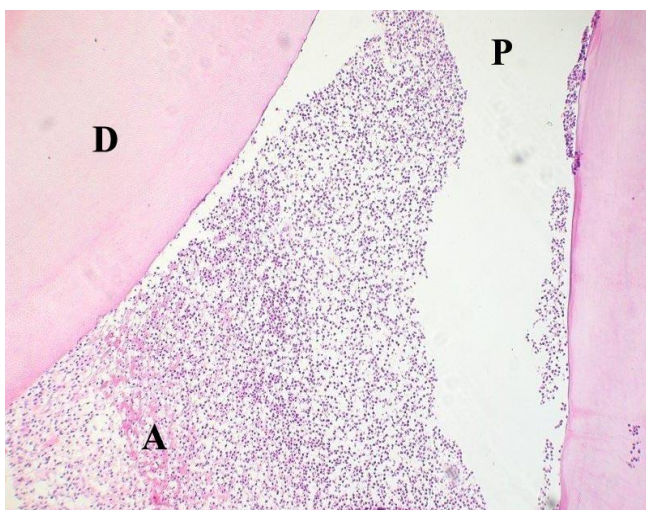
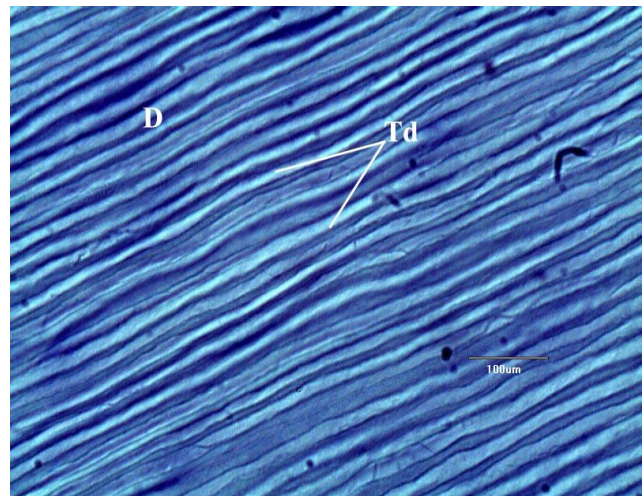


Imagen 4.9. Diente con absceso pulpar (a).

Muestra descalcificada en Ana Morse. Aumento 10X. Tinción HE. Se observa la dentina (D). Hacia el centro la cámara pulpar (P), afectada por un absceso pulpar (A).

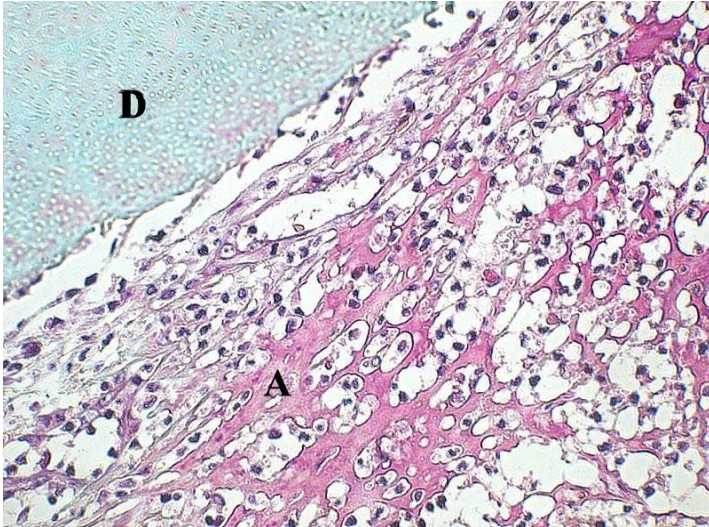


Imagen 4.10. Diente con absceso pulpar (b). Muestra descalcificada en Ana Morse. Aumento 40X. Tinción TCM. Se observa la dentina (D) y la pulpa afectada por el absceso (A).

Imagen 4.11. Pulpa necrótica (a). Diente descalcificado EDTA T.A. Aumento 10X. Tinción TCM. Se observa la dentina (D) con sus túbulos dentinarios, afectados por la caries (Cr). La pulpa (P) afectada por la necrosis (N).

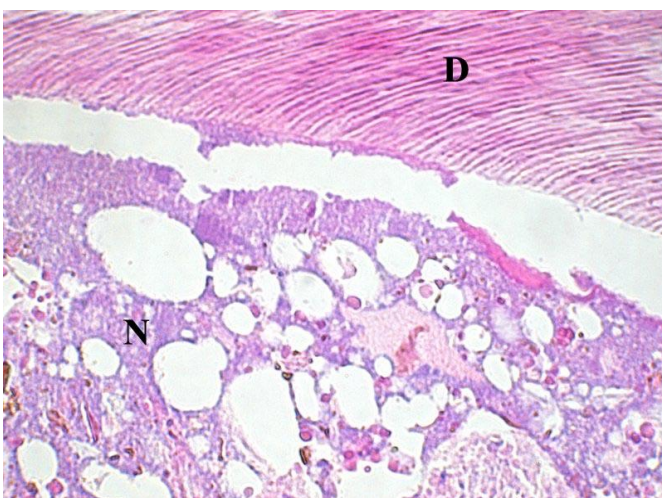
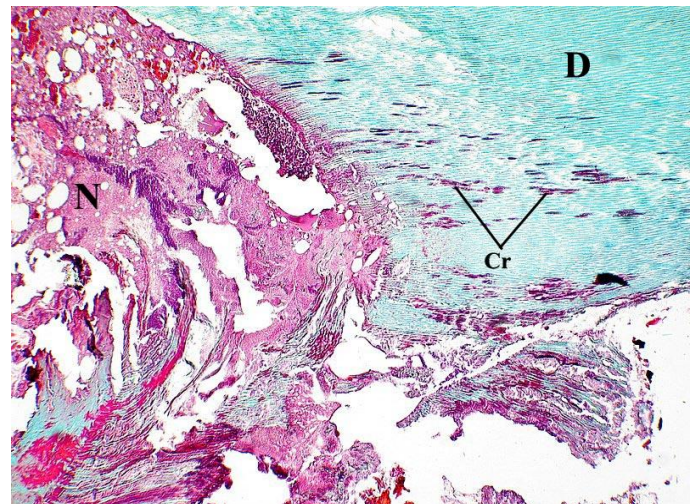


Imagen 4.12. Pulpa necrótica (b). Diente descalcificado EDTA T.A. Tinción HE. Aumento 40X. Se reconoce la dentina (D) y sus túbulos dentinarios. La pulpa afectada por la necrosis (N).

4.7. TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA

Luego del análisis morfológico y coloración de las piezas en estudio, se determinó qué porción de éstas debía ser eliminada para su posterior procesamiento inmunohistoquímico. Dentro de las muestras excluidas, se encuentran aquellas que no cumplieron con los requisitos necesarios para este proceso. Se entiende como requisito a la ausencia de necrosis y absceso pulpar y existencia de pulpa bien conservada, en el caso de las muestras incubadas con NSE. Para Ki-67, el criterio de exclusión consideró la presencia de tejido periodontal gingival con epitelio conservado (véase en la Tabla 4.5)

Tabla 4.5. *Muestras descartadas por anticuerpo.*

| Anticuerpo | Piezas descartadas | Piezas Conservadas | Totales |
|-------------------|---------------------------|---------------------------|----------------|
| NSE | 19 | 36 | 55 |
| Ki-67 | 14 | 41 | 55 |

De las 19 piezas descartadas para el estudio de NSE, 2 correspondieron a EDTA T.A., 5 a Ana Morse y 12 a EDTA y microondas. En el caso de Ki-67, de las 14 muestras eliminadas del estudio, 1 correspondió a EDTA T.A., 6 a Ana Morse y 7 a EDTA microondas.

De los resultados expuestos en el Gráfico 4.15, es posible observar que el 25% de las muestras dio resultados positivos para la inmunotinción con NSE. De ellas, el 11,11% correspondió a piezas desmineralizadas en Ana Morse, siendo éste el mayor porcentaje de positividad. Luego, le siguieron EDTA con microondas y EDTA T.A., respectivamente.

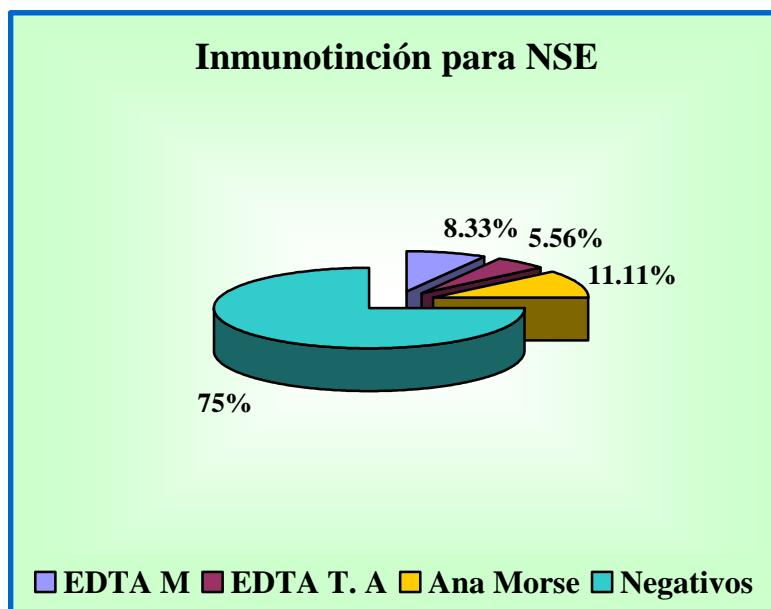


Gráfico 4.15. *Distribución porcentual de dientes positivos y negativos para NSE. Positivos según técnica de descalcificación empleada.*

En el gráfico 4.15, se muestran los resultados positivos y negativos para NSE, dentro de los cuales el mayor porcentaje de muestras positivas fue de Ana Morse, con un 11.11%; EDTA T.A., con 5.56%; y EDTA y microondas, con 8.33%.

El análisis por descalcificadores arrojó los siguientes resultados, expuestos en la Tabla 4.6. De ella se desprende que Ana Morse es el descalcificador con mayores resultados positivos para la reacción con NSE

Tabla 4.6. *Positividad de reacción con NSE por descalcificador empleado.*

| Descalcificador | Número de dientes conservados | Positividad (%) |
|-----------------|-------------------------------|-----------------|
| EDTA Microondas | 19 | 16.66 |
| EDTA T.A. | 9 | 22.22 |
| Ana Morse | 8 | 33.33 |

Con respecto a la inmunotinción de Ki-67, de los 41 dientes conservados para este anticuerpo, sólo se obtuvieron resultados negativos con los distintos desmineralizadores.

Para finalizar, a continuación se observan las imágenes de los resultados obtenidos tanto para NSE como para Ki-67, tales como controles positivos para NSE, fibras nerviosas positivas con nodo de Ranvier, al igual que fibras negativas, epitelio gingival periodontal negativo para Ki-67, entre otros.

Imagen 4.13. Control positivo NSE (a). Inmunotinción anticuerpo NSE, contraste hematoxilina 40X. Corte transversal de nervio. Con selección.

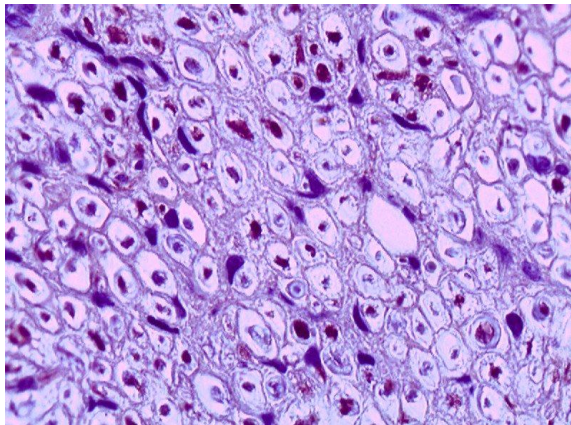
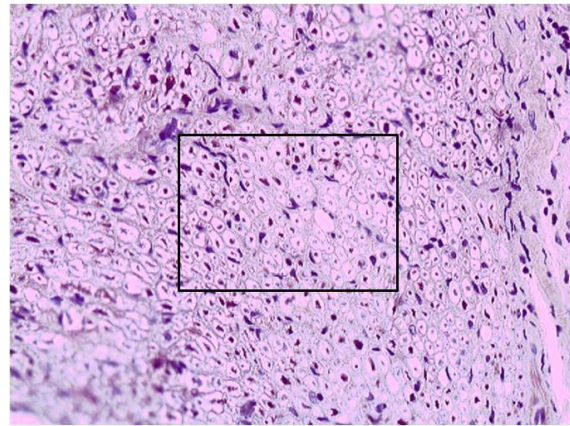
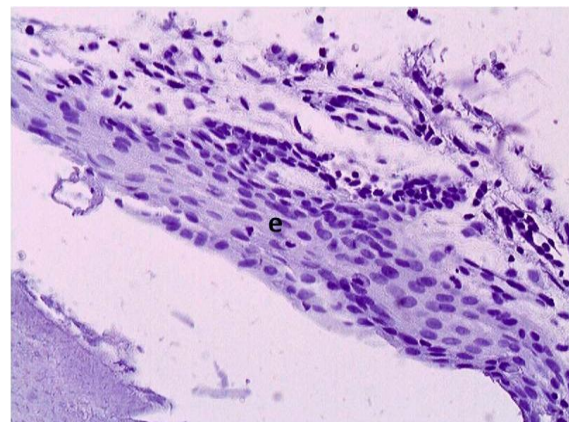


Imagen 4.14. Control positivo NSE (b). Inmunotinción anticuerpo NSE, contraste hematoxilina. Lente Inmersión 100X. Aumento de la selección anterior.

Imagen 4.15. Epitelio Gingival. Diente descalcificado EDTA y microondas. Inmunotinción anticuerpo NSE, contraste hematoxilina 40X. Epitelio gingival (e) negativo.



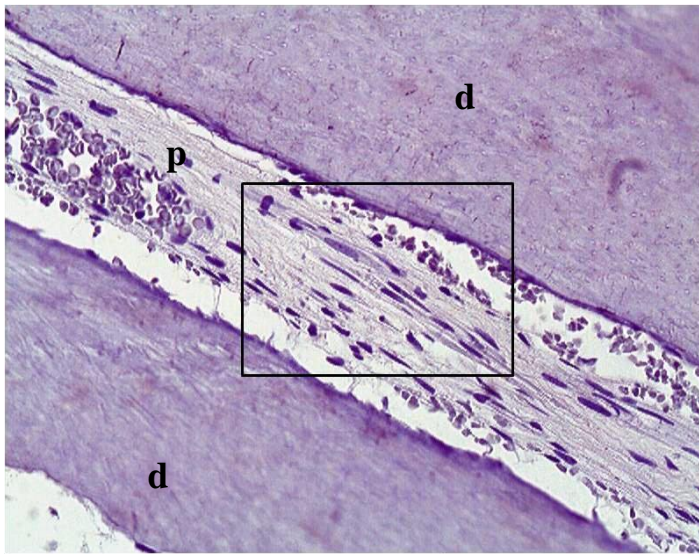


Imagen 4.16. Inmunotinción anticuerpo NSE negativo (a), contraste hematoxilina. Aumento 40X. Se observa dentina (d), pulpa (p). Imagen con selección.



Imagen 4.17. Inmunotinción anticuerpo NSE negativo (b), contraste hematoxilina. Lente inmersión 100X. Se observa dentina (d), pulpa (p). Nodo de Ranvier negativo, (flecha negra). Aumento selección anterior.

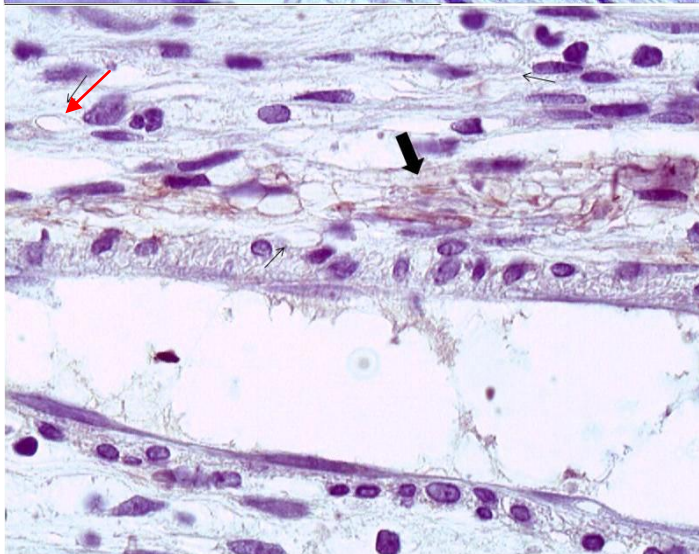


Imagen 4.18. Inmunotinción NSE (a). Contraste hematoxilina. Lente de inmersión 100X. Nodo de Ranvier positivo (flecha negra) y negativo (flecha roja).

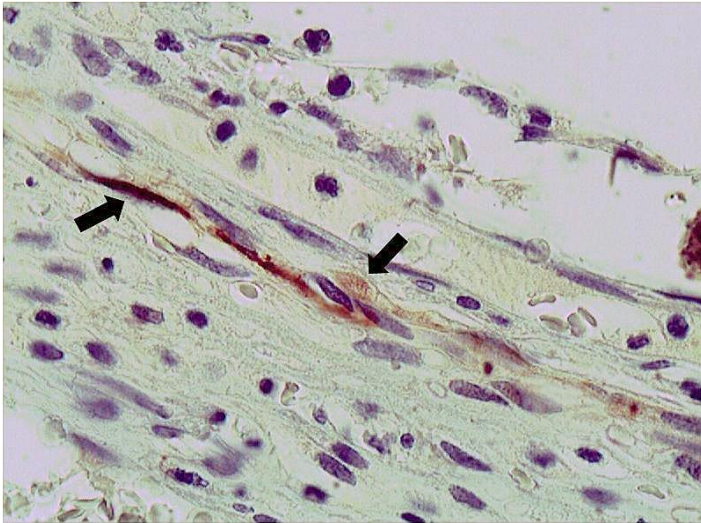


Imagen 4.19. Inmunotinción NSE (b). Contraste hematoxilina. Lente de inmersión 100X. Se observa fibra positiva con nodo de Ranvier positivo (flecha negra).

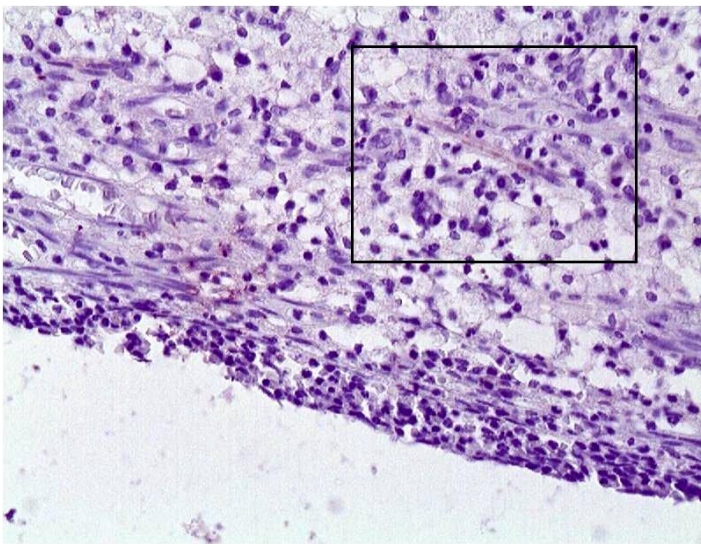


Imagen 4.20. Inmunotinción NSE (c). Contraste hematoxilina. Aumento 40X. Imagen con selección.

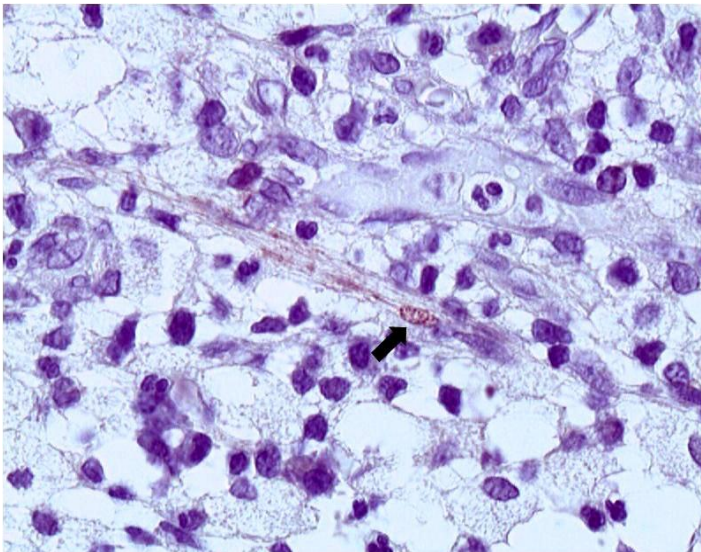


Imagen 4.21. Inmunotinción NSE (d). Contraste hematoxilina. Lente de inmersión 100X. Aumento de la selección anterior. Se observa fibra nerviosa con nodo de Ranvier, ambos positivos.

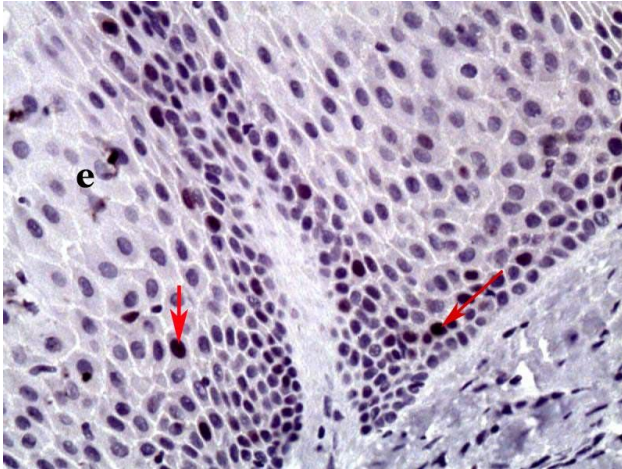


Imagen 4.22. Control positivo Ki-67 (a). Tinción de contraste con hematoxilina. Aumento 40X. Se observa epitelio gingival (e) con núcleos positivos para Ki-67 (flechas rojas).

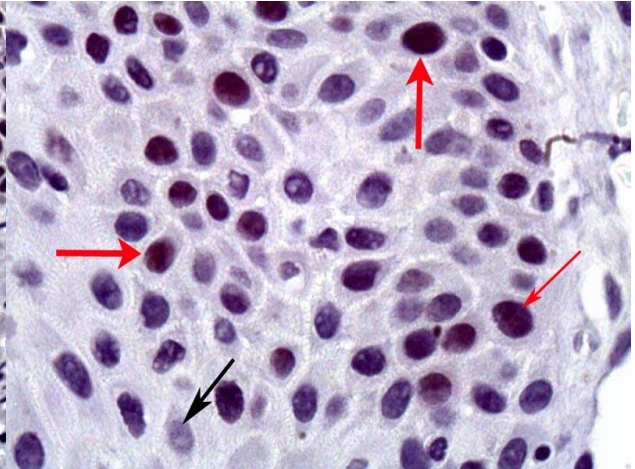


Imagen 4.23. Control positivo Ki-67 (b). Tinción de contraste con hematoxilina. Lente de inmersión 100X. Se observa los núcleos positivos en el epitelio (flechas rojas) y núcleos negativos (flecha negra).

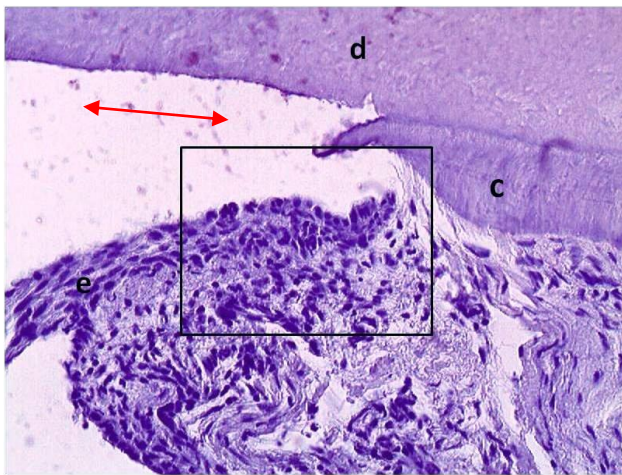


Imagen 4.24. Epitelio-cemento-dentina. Inmunotinción anticuerpo Ki-67, contraste hematoxilina. Aumento 40X. Se observa dentina (d), cemento (c), y el epitelio (e) negativo. Ausencia de esmalte debido a la desmineralización (flecha roja). Con selección.

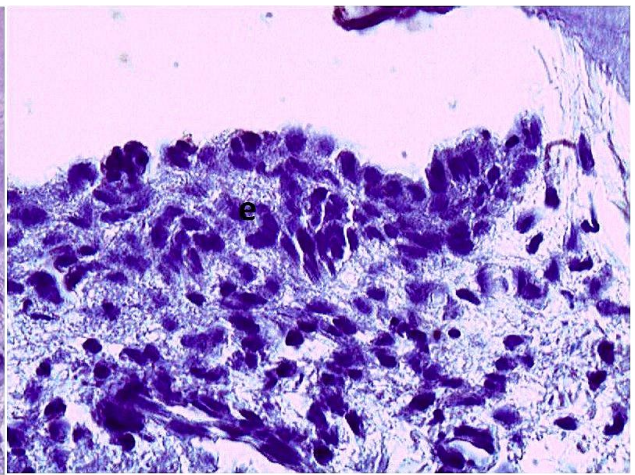


Imagen 4.25. Epitelio-cemento. Inmunotinción anticuerpo Ki-67, contraste hematoxilina. Lente de inmersión 100X. Núcleos del epitelio (e) negativo. Aumento de la selección anterior.

CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN

Esta investigación, de tipo experimental, busca compensar el vacío científico existente en el área de desmineralización de piezas calcificadas, como es el caso de los dientes caducos humanos. Algunos autores han incursionado en este tema [17] y han logrado obtener resultados satisfactorios, pero, al dar a conocer sus estudios, se constata que aún quedan problemas por resolver y algunos tópicos con escasas posibilidades de reproducción, como es la mantención de la inmuno-reactividad nuclear [1].

Otro de los puntos de interés para esta investigación fue la aceleración de la desmineralización, objetivo alcanzado gracias a la aplicación de las microondas sobre la solución descalcificadora escogida, EDTA. Esta solución es reconocida por sus propiedades quelantes, que causan menos daño morfológico al tejido, en comparación con los desmineralizadores de principio ácido [17], [47].

EDTA, a temperatura ambiente, posee un tiempo de desmineralización que se extiende de 4 a 7 meses, según Cunningham[19]. También señala que la acción de este desmineralizador se podría acelerar con el uso de microondas, incluso, hasta alcanzar períodos de 3 a 6 semanas de descalcificación. De acuerdo a lo comprobado en nuestro estudio, la desmineralización con este agente quelante, acelerada con microondas, demoró 2 meses en promedio. Sin embargo, en lo que se refiere a EDTA T.A., no pudimos demostrar lo concluido por los investigadores, debido a que las piezas que utilizamos fueron parte de trabajos anteriores, que datan del año 2001. Según los resultados obtenidos (véase Gráfico 4.6), los tiempos de descalcificación variaron para cada muestra; de hecho, con EDTA y microondas, fueron considerablemente menores a los esperados con respecto a los con EDTA T.A [17]

Los sitios inmuno-reactivos están constituidos principalmente de proteínas, sustancias que mantienen su estructura terciaria y cuaternaria a temperatura fisiológica, entre los 36.5 y 37°C.

Por el contrario, la temperatura elevada por períodos prolongados puede afectar su visualización. En esta investigación, se manejó la variable temperatura, controlándola periódicamente en todas las soluciones descalcificadoras, en especial en EDTA y microondas, donde se mantuvo una temperatura de valor medio de 36°C.

En cuanto a los pH evidenciados en los resultados para EDTA y microondas, se observó una mantención de los mismos en el tiempo. Esto sucede, debido a que los iones hidrógenos no juegan un rol importante en la reacción entre el quelante y la hidroxiapatita. En consecuencia, no debería existir una disminución en el pH de la solución. Entre tanto, Ana Morse, a pesar de ser una solución que contiene citrato de sodio (quelante), actúa sobre la molécula de hidroxiapatita bajo los principios de un ácido, entendiéndose, entonces, que los iones hidrógenos cumplen una función significativa en la reacción. Es por esto que la solución posee un pH promedio de 1.42 [6], [43]; así se entienden los resultados obtenidos para esta variable en los diferentes descalcificadores.

Se ha señalado ampliamente que EDTA es capaz de desempeñarse como recuperador antigénico en tejidos blandos [17], [39]. Al desmineralizar los dientes en EDTA y microondas, y utilizar el protocolo convencional de técnica inmunohistoquímica (véase protocolo apéndice C), se observó únicamente resultados negativos. Ante esto, se realizó un nuevo protocolo (véase protocolo apéndice D); esta vez sin recuperación de epítopes, lo que arrojó resultados positivos para la técnica de NSE. Una posible explicación para estos resultados es que, al reproducir el protocolo convencional, se produjo una doble recuperación antigénica y, por lo tanto, se eliminaron todos los epítopes disponibles para los anticuerpos utilizados en este estudio.

Por otro lado, es importante la relación que se produce entre la presencia o ausencia de caries. Como es sabido, la caries penetra a través de la destrucción del diente, desde el esmalte hacia la pulpa, creando un orificio de entrada. Algunos autores [44] recomiendan cortar una porción radicular de la pieza dental para que la solución descalcificadora penetre con mayor eficacia. La caries avanza desde el esmalte hacia la pulpa, creando una cavidad en estos tejidos calcificados

que permite la entrada de los desmineralizadores y, por lo tanto, un tiempo menor para este proceso. Al evidenciar la presencia de caries, tanto en el estudio macroscópico como microscópico, se pudo corroborar la existencia de una relación entre su presencia y la disminución del tiempo de descalcificación, aunque estadísticamente no es significativa.

Asimismo, observamos que el tiempo de desmineralización se ve influenciado por el tamaño de la muestra. Esto sucede debido a que los dientes más pequeños pueden ser penetrados rápidamente por el desmineralizador. Sin embargo, esta relación no es directamente proporcional; este fenómeno puede explicarse porque la cantidad de sales de calcio varía entre dientes caducos. Éstos se mineralizan progresivamente, previa exfoliación, y poseen distintas densidades del mineral [11]. Por lo anterior, no tenemos certeza de la concentración exacta de la matriz extracelular; además, es determinante la capacidad que posee cada descalcificador para extraer la hidroxiapatita, como señalan diversos autores [3], [6].

En los análisis de procesamiento de los dientes caducos, observamos una mayor facilidad en la manipulación de las muestras desmineralizadas con EDTA y microondas, evidenciado, principalmente, al realizar el corte de los dientes incluidos en parafina, dado que oponen menos resistencia que las muestras descalcificadas con Ana Morse y EDTA a temperatura ambiente. Además, fue posible constatar la existencia de un mayor porcentaje de muestras sin fallas de técnica, indicando que el procesamiento de la muestra se ve menos influenciado por la descalcificación con EDTA y microondas, en comparación con las otras metodologías (véase gráficos 4.9, 4.10 y 4.11).

Para las tinciones de H-E y TCM de las muestras, se esperaba una diferencia mayor entre Ana Morse y las soluciones de EDTA, que las obtenidas; con ello, se dedujo que tanto las soluciones descalcificadoras empleadas como la aplicación de calor por medio de microondas, no afectó en mayor medida, la composición iónica de los tejidos. La escasa diferencia entre la intensidad de coloración de núcleos, citoplasmas y fibras colágenas nos demuestra que la desmineralización por

quelación no es deletérea y que Ana Morse, al poseer citrato de sodio que actuaría como quelante, podría imitar la característica de EDTA, anteriormente mencionada.

Otro de los objetivos de esta investigación fue comprobar que la desmineralización con EDTA y microondas mantiene la mayor cantidad de epítopes, tanto citoplasmáticos como nucleares. Sin embargo, al analizar los resultados, nos encontramos con que éstos no sustentaban a cabalidad esta hipótesis, pues aunque se obtuvieron resultados positivos para NSE, la proporción dentro de la muestra para este desmineralizador no fue la más alta, sino que Ana Morse logró los mejores resultados de inmunotinción para NSE.

Desde nuestra perspectiva, la variable tiempo influyó en los resultados comentados anteriormente, pues Ana Morse descalcificó las piezas en un menor período que las soluciones con EDTA. A su vez, entre las soluciones quelantes, EDTA T.A. demoró más tiempo, coincidiendo con la menor cantidad de piezas positivas para el anticuerpo ya señalado. EDTA y microondas resultaron más rápidos que la solución a temperatura ambiente, pero fueron más lentos que Ana Morse y obtuvieron mejores resultados de inmunotinción que EDTA T.A., aunque más bajos comparados con aquellos obtenidos en Ana Morse (véase Gráfico 4.18). A pesar de su pH ácido, este último descalcificador preservó los epítopes y aportó resultados positivos para NSE. Al modificar el protocolo, eliminando el paso de recuperación antigénica, Ana Morse aún presentó positividad para el anticuerpo mencionado. Por lo anterior, es posible suponer que el componente quelante, citrato de sodio, es relevante en esta solución, reemplazando el paso de recuperación antigénica, utilizado en protocolos convencionales de inmunotinción.

Al analizar la tabla 4.5, nos encontramos con una situación diferente a la explicada; esta vez, EDTA y microondas otorgaron los resultados más bajos para la proporción de piezas positivas para cada descalcificador. De un total de 19 muestras conservadas y descalcificadas con EDTA y microondas, sólo el 16% fue positivo para el anticuerpo NSE, en contraste con Ana Morse, cuyas muestras positivas correspondieron al 33% de un total de 9 conservadas. Ana Morse es una

solución provista del principio de extracción ácido de la hidroxiapatita de la MEC, y además posee citrato de sodio al 20%, capaz de unirse al ión calcio, formando un quelato [18]. Por lo tanto, su alto porcentaje de muestras positivas se explica porque resulta menos injurioso para el tejido, que las soluciones ácidas por sí solas.

Por otro lado, si bien Ana Morse constituyó la mayor proporción de resultados inmunohistoquímicos positivos dentro de la muestra, no fue suficientemente alta como para obtener resultados más concluyentes; esto se debió a que el protocolo utilizado para la inmunotinción de las muestras no incorporó una recuperación de epítopes (véase apéndice D). Por lo anterior, muchos sitios antigénicos quedaron enmascarados por la fijación con formalina, entendiéndose, por lo tanto, que se podría obtener una mejora en los resultados inmunohistoquímicos para NSE en muestras desmineralizadas en Ana Morse, si se utilizaba el protocolo observado en el apéndice C. En cambio, puede suceder algo diferente para explicar la pequeña diferencia existente entre EDTA T.A. y EDTA y microondas, ésta es la concentración de ambas soluciones, representada en el 4% y 10%, respectivamente. Entonces, la baja porcentual de la positividad de las muestras para NSE, descalcificadas en EDTA y microondas, puede deberse a que la concentración utilizada fue mayor a la del grupo descalcificado con EDTA T.A., por lo tanto, constituyó una mayor quelación de los epítopes disponibles para dicho anticuerpo.

El anticuerpo Ki-67 puede otorgar resultados positivos en el epitelio periodontal gingival, debido a que la proliferación de este tejido produciría un empuje mecánico del diente, resultando su exfoliación. Sin embargo, los resultados obtenidos para esta reacción no concuerdan con este postulado, al no evidenciar inmunotinción en los núcleos del epitelio mencionado. Una posible explicación es proporcionada por [19], [43], al precisar que los núcleos celulares, posiblemente positivos para Ki-67 en piezas mineralizadas y descalcificadas en EDTA, sin importar su temperatura, podrían estar afectados por la quelación en un período prolongado de tiempo. Es por lo anterior que, a pesar de la disminución considerable de tiempo entre EDTA T.A. y EDTA microondas, el proceso continúa ocupando un período demasiado extenso para conservar la inmuno-reactividad de este anticuerpo.

Por último, y según lo señalado hasta aquí, cabe destacar que el anticuerpo que podríamos haber utilizado, para corroborar que la técnica de descalcificación no afecta la inmunoreactividad nuclear en dientes temporales humanos, es el anticuerpo nuclear de proliferación celular (PCNA). Este anticuerpo permitiría determinar núcleos celulares en estado quiescente o G0 del ciclo celular, a diferencia del aplicado en esta investigación, correspondiente a Ki-67, el cual no reconoce dicho estado. En otras palabras, al reconocer todos los estados del ciclo celular, PCNA permitiría comprobar que es posible emplear el método de descalcificación EDTA y microondas para técnicas inmunohistoquímicas nucleares en piezas dentales temporales. En definitiva, el reactivo sugerido no pudo ser utilizado en la presente investigación, porque el laboratorio en que se realizaron los procedimientos no contaba con el anticuerpo primario PCNA.

CONCLUSION

Según los resultados obtenidos y de acuerdo al objetivo general de esta investigación, se concluye que el uso de EDTA y microondas en piezas temporales humana constituye un método desmineralizador más eficaz que EDTA a temperatura ambiente. De hecho, permite disminuir el tiempo de acción desmineralizadora, ahorrando tres meses; dicha economía lo convierte en un procedimiento similar al método Ana Morse, el que ejerce su acción con una diferencia menor de sólo 17 días. Sin embargo, EDTA y microondas no logra la preservación de todos los epítopes para las inmuno-reacciones de Ki-67 y NSE. La desmineralización con EDTA y microondas en dientes caducos no otorga positividad para Ki-67, aunque existen resultados positivos para el anticuerpo citoplasmático de difícil manejo, NSE [45].

En el caso de Ana Morse, a pesar de ser un descalcificador ácido, cuyo pH podría dañar los sitios antigénicos del tejido, se recomienda su uso para la técnica implementada con NSE en dientes humanos. Esto permitirá realizar estudios sobre la sensibilidad dental en pacientes diabéticos que suelen presentar resistencia al dolor, tema de difícil estudio inmunohistoquímico, hasta ahora [46].

En relación a los artefactos de corte, las piezas tratadas con EDTA y microondas presentan los mejores resultados en comparación con EDTA a temperatura ambiente y Ana Morse. Su utilidad reside en que ofrecen una visualización íntegra del tejido, lo cual se traduce en la posibilidad de proponer un diagnóstico basado en la observación de la totalidad de la muestra, todo lo cual asegura resultados eficaces. En tanto, las tinciones de H-E y TCM otorgaron resultados similares en cuanto a la intensidad y definición del color de los núcleos, citoplasmas y fibras colágenas en los dientes procesados con los diferentes métodos de descalcificación.

Lo señalado con anterioridad permite establecer que el método de descalcificación más conveniente para dientes, en el caso de técnicas histológicas, especialmente las de rutina, es

EDTA y microondas. Si se extrapolan los resultados a piezas mineralizadas de menor tamaño y parcialmente calcificadas, se obtendría que el tiempo de desmineralización de EDTA y microondas no dista del que se observa con Ana Morse (actualmente utilizado en rutina). Además, presenta menos artefactos de corte, preservando la morfología, y la intensidad de coloración no se ve disminuida en comparación con otros descalcificadores, posicionándolo como una solución óptima para el procesamiento rutinario de tejidos blandos con microcalcificaciones y remanentes óseos.

Respecto a los análisis estadísticos, se obtuvo que el tiempo de descalcificación se relaciona con el tamaño de la muestra a desmineralizar y con la presencia de caries. Aunque ello no asegura la disminución de los períodos de procesamiento de las piezas dentales, es recomendable fraccionar las muestras calcificadas para que la penetración del desmineralizador sea más rápida, al disminuir el tamaño de la misma y crear una superficie de entrada [44]. Sin embargo, la caries tiene efectos deletéreos sobre las pulpas dentales, pues puede generar absceso y necrosis en las mismas. En consecuencia, es fundamental procesar muestras sin presencia de caries dental.

En cuanto a los estudios inmunohistoquímicos con Ki-67 y NSE, la utilización de descalcificadores con componentes quelantes permitió eliminar el paso de recuperación antigénica. Esto ocurre debido a que la naturaleza quelante de los desmineralizadores estudiados cumple dos procesos simultáneos: desmineralización y recuperación antigénica [17]. De esta manera, se disminuye el tiempo de trabajo hasta en 60 minutos con el nuevo protocolo y se reducen los elevados costos de inmunotinción, al ahorrar el reactivo empleado para dicho efecto.

Dado que no existen estudios sobre la descalcificación con microondas y su efecto sobre los sitios antigénicos en dientes caducos, se recomienda utilizar distintos tiempos de acción, nuevas concentraciones de las soluciones empleadas y anticuerpos más sensibles, que permitan obtener resultados positivos con esta técnica de desmineralización. Por ejemplo, se podrían utilizar anticuerpos dirigidos a células en estado quiescente, tal como PCNA; técnicas moleculares, como Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), Hibridación in Situ (ISH), entre otras. Lo anterior

evidenciaría, definitivamente, si la desmineralización con EDTA y microondas logra preservar antígenos nucleares. Además, se sugiere estudiar los efectos del EDTA y microondas sobre epítopes nucleares de relevancia clínica en piezas blandas con calcificaciones patológicas y remanentes óseos; al ser muestras con menor cantidad de hidroxapatita, éstas se desmineralizarían en periodos cortos de tiempo. Esto provocaría en la muestra la desmineralización y recuperación antigénica justa y necesaria, sin alterar los epítopes y suministrando resultados posiblemente positivos.

Asimismo, se deja para estudios posteriores de muestras blandas, que posean microcalcificaciones patológicas y que se puedan desmineralizar con este método, la extrapolación del protocolo de inmunotinción, creado en este estudio. Además, queda por investigar otros anticuerpos dirigidos a citoplasmas, membranas, núcleos, entre otros, para corroborar los resultados positivos de NSE.

Es también posible estudiar la variable fijación para experimentaciones inmunohistoquímicas en dientes caducos desmineralizados en EDTA y microondas, debido a que algunos autores señalan que los fijadores de base alcohólica logran preservar mejor los sitios inmuno-reactivos de las muestras [47]. Esto se explica porque no producen una reacción aditiva sobre las proteínas del tejido, como sucede con la formalina, al formar puentes de metileno [6]. Además, se señala que el alcohol de 70° es un fijador no aditivo medio que puede conservar mejor las características de permeabilidad de la dentina [48], entendiéndose que el manejo prolijo de esta variable permitirá conservar en mayor cantidad y calidad los epítopes celulares.

Otro punto, importante para investigar, incluye el uso de soluciones quelantes, como EDTA a distintas concentraciones. Esta variable llevaría a determinar si existe, efectivamente, una relación entre la concentración de la solución desmineralizadora y la quelación del tejido estudiado.

La investigación realizada es un avance en el área de desmineralización de piezas dentarias caducas y su posterior inmunotinción, pues ha permitido aportar datos relevantes sobre la negatividad de los núcleos celulares de dientes caducos a los anticuerpos celulares. Además, ha sido posible formular un nuevo protocolo de inmunotinción, capaz de proveer resultados positivos para anticuerpos citoplasmáticos de difícil manejo, como es la NSE, y de disminuir los tiempos de reacción al eliminar el paso de recuperación de antígenos.

Por último, cabe destacar que la importancia de una rápida desmineralización radica en su valor clínico. Esto se traduce en una disminución en el periodo que va desde la toma de muestra, hasta lograr el diagnóstico. Lo anterior constituye un avance en el procesamiento de biopsias de tejido calcificado.

BIBLIOGRAFIA

1. Brown,R.S.D., Edwards. J., Bartlett J.W., Jones C., Dogan A. *Routine acid decalcification of bone marrow samples can preserve dna for fish and cgh studies in mestastatic prostate cancer.* J Histochem Cytochem.2002; 50 (1): 113-15.
2. Mullink H., Henzen-Logmans S.C., Tadema T.M., Moll J.J., Meijer C.J. *Influence of fixation and the decalcification on the immunohistochemical staining of cell-specific markers in paraffin-embedded human bone biopsies.* J Histochem Cytochem. 1985; 33(11): 1103-109.
3. Witter, K.; Matulová ; Mišek. *The effects of two different decalcification procedures on size and structure of embryonic epithelial tissue in objects prepared for light microscopy.* Anat Histol Embryol.2000; 29(6): 351-55.
4. Hall P.A., Linderman R., Butler M.G., Lamess J.A., D'Ardenne A.J. *Demonstration of lymphoid antigens in decalcified bone marrow trephines.* J. Clin Pathol. 1987; 40: 870-73.
5. Geneser Finn. *Histología.* 3^a ed. Buenos Aires, Argentina: Panamericana; 2002.
6. Kiernan J.A. *Histological and Histochemical Methods: theory and practice.*3^a ed. Londres, Inglaterra: Arnold; 1999.

7. Morales Pintanel Macarena. *Análisis comparativo in vitro al M.E.B. del efecto de los adhesivos de grabado y lavado V/S adhesivos de autograbado sobre esmalte y dentina*. Trabajo de Investigación para obtener el Título de cirujano dentista. 2007, Carrera de odontología, Facultad de Odontología, Universidad de Chile.
8. Resnick Donald. *Huesos y Articulaciones en Imagen*. 2ª ed. Madrid, España: Marbán; 2001.
9. Açil Yahya, Mobasser Ali E., Warnke Patrick H., Terheyden Hendrik, Wiltfang Jörg, Springer Ingo. *Detection of Mature Collagen in Human Dental Enamel*. *Calcif Tissue Int* .Febrero de 2005; 76 (2): 121-26.
10. Ten Cate A.R. *Histología Oral: Desarrollo, estructura y función*. 2ª ed. Buenos Aires, Argentina: Panamericana; 1986.
11. Gómez de Ferraris Mª E., Campos Muñoz A. *Histología y embriología bucodental*. 2ª ed. Madrid, España: Panamericana; 2002.
12. Find a dentist. Dental Center. [Internet]. [Acceso 10 de Octubre de 2007] *Classification and Descriptive Anatomy on the Teeth* [1 pantalla] Disponible en : <http://www.findadentist.com/dental-center/classification-and-descriptive-anatomy-of-the-teeth.asp>).
13. Oral Health Topics [Internet]. ADA: American Dental Association; 1995-2007 [Actualizado 14 de marzo de 2005; acceso 10 de Octubre de 2007]. Tooth Anatomy [1 pantalla]. Disponible en: <http://www.ada.org/public/topics/tooth.asp>).

14. Cohen Stephen. *Vías de la pulpa*. 8^a ed. Barcelona, España: Elsevier; 2002.
15. Gartner Leslie P., Hiatt James L. *Texto Atlas Color de Histología*. 2^a ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2002.
16. Facultad de estudios superiores Iztacala. *Notas de endodoncia*. [Internet]. [Acceso 23 de agosto de 2007]. [1 Pantalla] Disponible en: <http://www.iztacala.unam.mx/~rrivas/histologia4.html>.
17. Bustamante G. Milán. *Estudio comparativo de métodos de demineralización dentaria a través del análisis inmunohistoquímico*. Trabajo de titulación para obtener el grado académico de Licenciado en Tecnología Médica mención en Morfofisiopatología y citodiagnóstico. Tecnología Médica, Universidad de Valparaíso. 2006.
18. Lynch Matthew J, Rápale Stanley S., Mellor Leslie D., Spare Meter D., Inwood Martin J.H. *Métodos de laboratorio*. 2^o ed. México: Interamericana; 1977.
19. Cunningham, Calhoun D., Schulte, Bradley A., Bianchi, Lynne M., Weber, Peter C., Schmiedt, Barbara N. *Microwave decalcification of human temporal bones*. Laryngoscope. Febrero 2001; 111 (2): 278-82.
20. Arana-Chavez Victor E. y Nanci Antonio. *High-resolution Immunocytochemistry on Noncollagenous Matrix Proteins in Rat Mandibles Processed with Microwave Irradiation*. J Histochem Cytochem. Marzo 2001; 49 (9): 1099-109.

21. Reineke T, Jenni B, Abdou MT, Frigerio S, Zubler P, Moch H, Tinquely M. *Ultrasonic decalcification offers new perspectives for rapid fish, dna, and rt-pcr analysis in bone marrow trephines*. Am J Surg Pathol. Julio 2006; 30(7): 892-96.
22. Morse Ana. *Formic acid-sodium citrate decalcification and butyl alcohol dehydration of teeth and bones for sectioning in paraffin*. Journal Dent. 1945; 24: 143.
23. Biblioteca Digital de la Universidad de Chile. *Valoraciones con EDTA*. [Internet]. [Acceso 9 de septiembre de 2007] [1 pantalla]. Disponible en: http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/ap/ciencias_quimicas_y_farmaceuticas/apquim-an-instr-6/c13a.html
24. Chang Raymond. *Química*. 4º ed. México DF, México: McGraw-Hill; 1992.
25. The Skeptic: *The Newsletter of The North Texas Skeptics*. [Internet]. [Última actualización enero de 1994; Acceso 9 de septiembre de 2007]. [1 pantalla]. Disponible en: <http://www.ntskeptics.org/1994/1994january/january1994.htm>
26. Franco M^a Eugenia. 2006. *Métodos de descalcificación en el laboratorio de Histopatología*. En: Cátedra Técnica Histológica: 14 de Septiembre de 2007. Valparaíso, Universidad de Valparaíso, Escuela de Tecnología Médica, Facultad de Medicina.
27. Tonnaer Edith L., Kuijpers Wim, Peters Theo A., y Ramaekers Frans C. *Effect of EDTA on Cytokeratin Detection in the Inner Ear*. J Histochem Cytochem. Abril 1990; 30(8): 1223-227.

28. Christgau Michael, Caffesse Raul G., Newland J. Robert, Schmalz Gottfried, and D'Souza Rena N. *Characterization of immunocompetent cells in the diseased canine periodontium*. J Histochem Cytochem. Diciembre 1998; 46: 1443-454.
29. Kroff Balloqui, Paula K. *Aplicación de las microondas en el Laboratorio de Anatomía Patológica*. Trabajo de titulación para obtener el grado académico de Licenciado en Tecnología Médica mención en Morfofisiopatología y citodiagnóstico. Tecnología Médica, Universidad de Valparaíso. 2006.
30. Leiva CE, Ordenes GA.: *Utilización de Hornos de microondas en el laboratorio de Cito-Histopatología*. Curso de Post- título, Escuela de post grado. Carrera de Tecnología Médica, Universidad de Chile. 1994.
31. Universidad Simón Bolívar, Departamento de Física. *El espectro electromagnético*. [Internet]. [Última actualización agosto de 2003; Acceso 29 de agosto de 2007] [1 pantalla]. Disponible en: <http://www.fis.usb.ve/~rcastell/Fisica5/>
32. Aranzabal Olea, Andrés. *Semiconductores*. [Internet]. Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Industrial EIBAR, Departamento de Electrónica y Telecomunicaciones. [Acceso 29 de agosto de 2007]. [1 pantalla]. Disponible en: http://www.uned.es/ca-bergara/ppropias/Morillo/web_et_dig/02_semiconduc/diodos.pdf
33. Gallawa J. Carlton. *"The Magnetron Tube Used In Microwave Ovens: Structure and Operation"*. [Internet]. [Acceso 25 de Mayo de 2007]. [1 pantalla]. Disponible en: <http://gallawa.com/microtech/magnetron.html>.

34. Dabbs DJ. *Diagnostic Immunohistochemistry*. 1° ed. Livingstone, Estados Unidos: Churchill; 2002.
35. Boenisch Thomas, Farmilo A.J., Stead Ronald H., Key Marc, Welcher Rosanne, Richard Harvey, Karen N. Anwood. *Manual: Métodos Inmunohistoquímicos de Coloración*. 3° ed. California, Estados Unidos: Dako; 2002.
36. Leiva CE., Ordenes GA. *Técnicas y teoría en inmunohistoquímica diagnóstica*, 1° ed. Santiago, Chile: Villagra 73 B; 1998.
37. Taylor Cliver R y Cote Richard J. *Immunomicroscopy a diagnostic tool for the surgical pathologist*. 3° ed. Philadelphia, Estados Unidos: Saunders el Sevier; 2006.
38. Veripath OncoDiagnostic. *Mib-1*. [Internet]. [Acceso 9 de Septiembre de 200]. [1 pantalla]. Disponible en: http://www.oncodx.com/onco/mib_1.htm
39. Novocastra laboratorios LTDA. *Catálogo. Antibodies, Probes, Kits and Conjugated Reagents for Biomedical Research, Microbiology, Virology and Histopathology*. Balliol Bussiness Park West, Benton Lane, Newcastle: Novocastra; 2003.
40. Silva Risopatron, Luis; Casanova, Dunny; San Martín, Sebastian. Curso de Capacitación y Perfeccionamiento: Taller de Metodología de la Investigación

41. Hernández Sampieri, Roberto; Fernández Collado, Carlos; Baptista Lucio, Pilar. *Metodología de la Investigación*. 1º ed. México: McGraw-Hill Interamericana. 1991.
42. Leppe Zamora, Jaime; Villarroel, Lorena; Henríquez, Carlos; Muñoz, Marcelo. En: *Jornadas de Metodología en Investigación Clínica*: 8 y 9 de Septiembre de 2006, Universidad de Valparaíso, Facultad de Medicina, Carrera de Kinesiología.
43. Mardfin, Dorothy F., James, Verda E. *Effect of nitric acid and chelation demineralization on various stains of histochemical nature*. J. Dent. Rent. 1957; 36(5): 759-64.
44. Edna B. Prophet, Mills, Bob, Arrington, Jacquelyn B, Sobin, Leslie H., Armed Forces Institute of Pathology. American Registry of Pathology. Editores. *Laboratory methods in histotechnology*. Washington D.C.: Armed Forces Institute of Pathology. American Registry of Pathology; 1994.
45. Ortega P. Ana. Franco M. M^a Eugenia. En: *Inmunohistoquímica en tejidos calcificados*. 16 de abril de 2007, Universidad de Chile, Facultad de Odontología, Carrera de Odontología.
46. San Martín G., Guillermo. *Respuesta pulpar a pruebas de vitalidad térmicas e inervación de pulpa dentaria en pacientes con y sin diabetes mellitus tipo II*. Tesis para optar al título de Cirujano Dentista. Odontología, Facultad de Odontología, Universidad de Chile. 2006.
47. Aguilera Chamorro, José Pablo. Silva Salazar, Jorge Orlando. *Evaluación de un nuevo fijador comparado con la formalina para su uso en histopatología*. En: Tesis para optar al

grado de Licenciado en Tecnología Médica, Escuela de Tecnología Médica, Facultad de Medicina, Universidad San Sebastián; 2006.

48. Goodis HE, Marshall GW Jr, White JM, *The effects of storage after extraction of the teeth on human dentin permeability in vitro*. Arch Oral Biol. 1991; 36(8): 561-66

49. Franco M., María Eugenia. *Coloración de rutina*. En: Cátedra Técnicas de Laboratorio: 5 de abril de 2005. Curso de Postgrado. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Odontología.

50. López A. María Luisa. Graf V, María Elena. Leyton M., Cecilia. *Laboratorios de Técnica Histológica*, Parte II. Departamento de Biología Celular y Genética Norte. Santiago, Chile: Universidad de Chile; 1974.

APÉNDICE A

TINCIÓN DE RUTINA: HEMATOXILINA-EOSINA [49]

1. Desparafinar e hidratar:
 - a. Baño de xilol por 5 minutos
 - b. Baño de xilol por 5 minuto
 - c. Baño alcohol 100° por 2 minutos
 - d. Baño alcohol 100° por 2 minutos
 - e. Baño alcohol 96° por 2 minutos
 - f. Baño alcohol 96° por 2 minutos
 - g. Baño de agua corriente
2. Tinción nuclear con Hematoxilina de Harris por 30 segundos.
3. Lavado en agua corriente.
4. Virado de la hematoxilina con borato de sodio (bórax).
5. Tinción citoplasmática con eosina acuosa por 30 segundos.
6. Lavado en agua corriente.
7. Deshidratación:
 - a. Inmersión en Alcohol 96°
 - b. Inmersión en Alcohol 96°
 - c. Inmersión en Alcohol 100°
 - d. Inmersión en Alcohol 100°
8. Aclaramiento con xilol.
9. Montaje con medio hidrófobo Flo-Texx® Rev. 1,6/96 Lerner Laboratories.

APÉNDICE B

TINCIÓN TRICRÓMICA: TÉCNICA DE MASSON [50]

1. Desparafinar e hidratar:
 - a. Baño de xilol por 5 minutos
 - b. Baño de xilol por 5 minuto
 - c. Baño alcohol 100° por 2 minutos
 - d. Baño alcohol 100° por 2 minutos
 - e. Baño alcohol 96° por 2 minutos
 - f. Baño alcohol 96° por 2 minutos
 - g. Baño de agua destilada
2. Tinción nuclear con Hematoxilina de Weigert durante 10 minutos.
3. Lavar en agua corriente por 10 minutos.
4. Lavar en agua destilada.
5. Teñir en solución de Biebrich Scarlett – Fucsina ácida por 2 minutos.
6. Lavar en agua destilada.
7. Colocar en solución de ácido fosfomolibdico y ácido fosfotúngstico durante 2 minutos y descartar la solución.
8. Teñir en solución de azul de anilina o verde luz por 5 minutos
9. Lavar en agua destilada
10. Colocar las muestras en solución de agua acetificada al 1% por 3 minutos, descartando la solución.
11. Deshidratación:
 - a. Inmersión en Alcohol 96°

- b. Inmersión en Alcohol 96°
- c. Inmersión en Alcohol 100°
- d. Inmersión en Alcohol 100°

12. Aclaramiento con xilol.

13. Montaje con medio hidrófobo Flo-Texx® Rev. 1,6/96 Lerner Laboratories.

Resultados: Núcleos negros, citoplasmas rojos y fibras azules o verdes cuando corresponda.

APÉNDICE C

TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA CONVENCIONAL [39]

1. Desparafinar e hidratar:
 - a. Baño de xilol por 5 minutos
 - b. Baño de xilol por 5 minuto
 - c. Baño alcohol 100° por 2 minutos
 - d. Baño alcohol 100° por 2 minutos
 - e. Baño alcohol 96° por 2 minutos
 - f. Baño alcohol 96° por 2 minutos
 - g. Baño de agua destilada
2. Someter los cortes de 2 lavados en PBS, de 2 minutos cada uno.
3. Recuperación antigénica con Buffer Citrato de Sodio, en vaporera durante 20 minutos.
4. Dejar reposar las muestras en Buffer Citrato de Sodio por 20 minutos.
5. Realizar 2 lavados en PBS, de 2 minutos cada uno.
6. Realizar bloqueo de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3% durante 10 minutos, a temperatura ambiente.
7. Aplicar a las muestras suero Normal Horse por 10 minutos a temperatura ambiente.
8. Incubar con el anticuerpo primario monoclonal correspondiente (NSE, Ki-67, p53) en estufa a 37°C por 20 minutos.
9. Continuar con 2 lavados en PBS, de dos minutos cada uno.
10. Incubar con el anticuerpo secundario policlonal durante 20 minutos en estufa a 37°C.
11. Realizar 2 lavados en PBS, de 2 minutos cada uno.
12. Incubar en Streptavidina durante 20 minutos en estufa a 37°C.

13. Continuar con 2 lavados en PBS, de 2 minutos cada uno.
14. Revelar con sustrato cromógeno DAB por 10 minutos a temperatura ambiente.
15. Llevar al agua destilada por 5 minutos.
16. Realizar tinción nuclear con hematoxilina de Harris.
17. Deshidratación:
 - a. Inmersión en Alcohol 96°
 - b. Inmersión en Alcohol 96°
 - c. Inmersión en Alcohol 100°
 - d. Inmersión en Alcohol 100°
18. Aclaramiento con xilol.
19. Montaje con medio hidrófobo Flo-Textx® Rev. 1,6/96 Lerner Laboratories

Resultados

NSE: coloración de patrón citoplasmático; en caso de positividad el citoplasma se observará de tono marrón.

Ki-67, p53: coloración de patrón nuclear; en caso de positividad el núcleo celular se visualizará en tono marrón.

APÉNDICE D

TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA MODIFICADA

1. Desparafinar e hidratar:
 - a. Baño de xilol por 5 minutos
 - b. Baño de xilol por 5 minuto
 - c. Baño alcohol 100° por 2 minutos
 - d. Baño alcohol 100° por 2 minutos
 - e. Baño alcohol 96° por 2 minutos
 - f. Baño alcohol 96° por 2 minutos
 - g. Baño de agua destilada
2. Someter los cortes de 2 lavados en PBS, de 2 minutos cada uno.
3. Aplicar a las muestras suero Normal Horse por 10 minutos a temperatura ambiente.
4. Incubar con el anticuerpo primario monoclonal correspondiente (NSE, Ki-67, p53) a 4°C *overnight*.
5. Continuar con 2 lavados en PBS, de dos minutos cada uno.
6. Realizar bloqueo de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3% durante 10 minutos, a temperatura ambiente.
7. Realizar 2 lavados en PBS, de 2 minutos cada uno.
8. Incubar con el anticuerpo secundario policlonal durante 20 minutos en estufa a 37°C.
9. Realizar 2 lavados en PBS, de 2 minutos cada uno.
10. Incubar en Streptavidina durante 20 minutos en estufa a 37°C.
11. Continuar con 2 lavados en PBS, de 2 minutos cada uno.
12. Revelar con sustrato cromógeno DAB por 10 minutos a temperatura ambiente.

13. Llevar al agua destilada por 5 minutos.
14. Realizar tinción nuclear con hematoxilina de Harris.
15. Deshidratación:
 - a. Inmersión en Alcohol 96°
 - b. Inmersión en Alcohol 96°
 - c. Inmersión en Alcohol 100°
 - d. Inmersión en Alcohol 100°
16. Aclaramiento con xilol.
17. Montaje con medio hidrófobo Flo-Texx® Rev. 1,6/96 Lerner Laboratories

Resultados

NSE: coloración de patrón citoplasmático; en caso de positividad el citoplasma se observará de tono marrón.

Ki-67, p53: coloración de patrón nuclear; en caso de positividad el núcleo celular se visualizará en tono marrón.

ANEXOS

ANEXO 1

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se tomo la variable dependiente tiempo de desmineralización, variable cuantitativa. Se verifico la distribución de los datos con test de Shapiro-Wilk:

| Shapiro-Wilk | W | test | for normal | data | | |
|--------------|---|------|------------|-------|-------|---------------|
| Variable | | Obs | W | V | z | Prob>z |
| tiempodedes | | 30 | 0.85763 | 4.525 | 3.122 | 0.0009 |

El resultado de 0.0009 nos indica que la muestra no se distribuye de manera normal. Por otro lado el n=30.

Al relacionarlas con la ausencia o presencia de caries, se realizó test de Mann-Whitney como se ve a continuación:

| caries | obs | rank sum | expected |
|---|-----|---------------|----------|
| 0 | 19 | 309.5 | 294.5 |
| 1 | 11 | 155.5 | 170.5 |
| combined | 30 | 465 | 465 |
| unadjusted variance | | 539.92 | |
| adjustment for ties | | -101.50 | |
| ----- | | | |
| adjusted variance | | 438.42 | |
| Ho: tiempo~s(caries==0) = tiempo~s(caries==1) | | | |
| z = | | 0.716 | |
| Prob > z = | | 0.4738 | |

Por otro lado, se realizó un análisis con la variable tamaño de cada pieza dental, a través del estudio de Kruskal-Wallis, como se ve a continuación:

| | | |
|-------------------|--------------------|--|
| -----+-----+----- | 8x10x7 1 6.50 | |
| 10x14x10 1 20.50 | 8x12x8 1 6.50 | chi-squared = 23.548 with 28 d.f. |
| 4x13x3 1 6.50 | 8x13x7 1 20.50 | probability = 0.7051 |
| 4x3x2 1 1.00 | 8x14x6 2 41.00 | |
| 4x9x3 1 30.00 | 8x15x7 1 20.50 | chi-squared with ties = 29.000 with 28 d.f. |
| 4x9x4 1 29.00 | -----+-----+----- | probability = 0.4125 |
| -----+-----+----- | 8x15x8 1 20.50 | |
| 5x3x3 1 6.50 | 8x16x9 1 20.50 | |
| 6x11x4 1 6.50 | 8x6x5 1 20.50 | |
| 6x11x7 1 6.50 | 8x8x6 1 6.50 | |
| 6x12x5 1 20.50 | 9x10x8 1 6.50 | |
| 6x20x5 1 20.50 | -----+-----+----- | |
| 7x13x5 1 20.50 | 9x12x7 1 6.50 | |
| 7x13x6 1 20.50 | 9x16x18 1 20.50 | |
| 7x14x7 1 20.50 | 9x5x5 1 20.50 | |
| 7x15x9 1 20.50 | 9x5x6 1 12.00 | |
| 7x3x4 1 6.50 | +-----+-----+----- | |
| -----+-----+----- | | |