

“Uso de microondas KOS en la descalcificación de tejidos”

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”

Cindy Córdova Arancibia

Ana Olivares Moreno

Nicole Villarreal Cruz

Profesor Guía: TM Camila Vera Montenegro

Profesor Co Guía: TM Daniela Salinas Aránguiz

2018

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo pudo ser realizado en primer lugar gracias al constante apoyo de TM. Camila Vera Montenegro y TM. Daniela Salinas Aranguiz, nuestras profesoras guías; quienes nos orientaron en cada etapa de la investigación y nos brindaron su ayuda cada vez que la necesitamos.

En segundo lugar, agradecemos al laboratorio de investigación Bruno Günther por donarnos los especímenes utilizados durante este estudio.

En tercer lugar, agradecemos a todo el equipo de Prolab, especialmente a Cecilia Leiva por facilitarnos el uso del microondas KOS y su laboratorio para ejecutar la primera etapa de la investigación, y a Sebastián Peña por entregarnos parte de su tiempo para capacitarnos en el uso del equipo.

Agradecemos también al TM. Juan Varas por permitirnos realizar la estandarización de las técnicas especiales en el laboratorio de investigación Bruno Günther de la Universidad de Valparaíso.

Por último, agradecemos a todos nuestros familiares y amigos que de una u otra manera nos incentivaron y apoyaron a finalizar este trabajo.

RESUMEN

La realización de esta investigación tuvo el propósito de comparar los resultados obtenidos entre la descalcificación convencional y aquella realizada mediante el uso del microondas KOS, con el objetivo de buscar una disminución en el tiempo del procesamiento de tejidos mineralizados sin afectar la calidad del tejido. Con el fin de entregar resultados de manera más oportuna, especialmente en aquellos casos en los que se requiere un diagnóstico urgente.

Esta comparación fue llevada a cabo a través de la evaluación de diferentes parámetros, dentro de los cuales se encuentra el tiempo y temperatura de descalcificación, la calidad del corte histológico, la conservación de la morfología tisular, la afinidad tintorial a la tinción de rutina y tricrómico de Masson y la cantidad de depósitos de plata asociados a carbonato y fosfato de calcio con la técnica histoquímica de Von Kossa.

Se evidenció una disminución considerable en el tiempo de descalcificación utilizando el microondas KOS con ciclos de 2 horas a 50°C, reduciéndose de las 3 semanas a 14 horas. Además, no se encontraron alteraciones en la calidad del corte, en la conservación de la morfología ni en la afinidad tintorial, cuyos resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los métodos de descalcificación empleados.

Esperamos que este estudio de pie a nuevas investigaciones en esta área, evaluando aspectos tan importantes en el estudio de muestras óseas como la antigenicidad del tejido en el diagnóstico de linfomas.

PALABRAS CLAVES: Descalcificación, microondas KOS, procesamiento convencional, tejido óseo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 PROCESAMIENTO DE TEJIDOS	1
1.1.1 Fijación	1
1.1.2 Descalcificación.....	4
1.1.3 Deshidratación	15
1.1.4 Diafanización.....	15
1.1.5 Impregnación e inclusión.....	16
1.1.6 Microtomía y corte	17
1.2 TINCIÓN DE TEJIDOS	18
1.2.1 Tinción de rutina Hematoxilina – Eosina (HE):.....	18
1.2.2 Tinciones Especiales.....	21
1.3 HISTOLOGÍA DEL SISTEMA ÓSEO Y MÉDULA ÓSEA.....	24
1.2.1 Cartílago	24
1.2.2 Tejido óseo	29
1.2.3 Médula ósea.....	36
1.4 ARGUMENTACIÓN DEL PROBLEMA.....	40
CAPÍTULO 2 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	42
2.1 OBJETIVO GENERAL.....	42
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
CAPÍTULO 3 MATERIALES Y MÉTODOS	43
3.1 TIPO DE ESTUDIO	43
3.2 POBLACIÓN.....	43
3.2.1 Población objetivo.....	43
3.2.2 Población en estudio.....	43
3.3 DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA.....	43
3.3.1 Tipo de muestreo.....	44
3.3.2 Criterios de inclusión y exclusión	44
3.4 VARIABLES EN ESTUDIO.....	44

3.4.1 Variables principales	44
3.4.2 Variables secundarias.....	44
3.4.3. Definición conceptual	44
3.4.4 Definición operacional	45
3.5 PROCEDIMIENTOS Y ACTIVIDADES.....	46
3.5.1. Obtención de las muestras.....	46
3.5.2 Fijación.....	46
3.5.3 Macroscopía de las muestras.....	47
3.5.4 Descalcificación	48
3.5.5 Procesamiento de las muestras	49
3.6 ANÁLISIS DE DATOS.....	52
3.6.1 Evaluación del Procesamiento	53
3.6.2 Evaluación de la calidad de los cortes.....	53
3.6.3 Evaluación de la Morfología Tisular.....	53
3.6.4 Evaluación de la calidad de la coloración	54
CAPÍTULO 4 . RESULTADOS	55
4.1 COMPARAR LA EFICACIA DE LA DESCALCIFICACIÓN ENTRE EL MÉTODO CONVENCIONAL Y MEDIANTE EL MICROONDAS KOS.	55
4.1.1 Descalcificación Convencional	55
4.1.2 Descalcificación en microondas KOS.....	55
4.2 COMPARAR LA CALIDAD DEL CORTE HISTOLÓGICO ENTRE LAS MUESTRA DESCALCIFICADAS CON EL MÉTODO CONVENCIONAL Y EN MICROONDAS KOS.	56
4.3 MEDIR Y COMPARAR LA CONSERVACIÓN DE LA MORFOLOGÍA TISULAR LUEGO DE LA DESCALCIFICACIÓN CONVENCIONAL Y EN MICROONDAS KOS. .	60
4.4 COMPARAR LA CALIDAD DE LA TINCIÓN DE RUTINA (HEMATOXILINA – EOSINA) ENTRE LO TEJIDOS DESCALCIFICADOS EN MICROONDAS KOS Y EL PROCEDIMIENTO DE DESCALCIFICACIÓN CONVENCIONAL.	63
4.5 COMPARAR LA TINCIÓN TRICRÓMICA DE MASSON EN LAS MUESTRAS DECALCIFICADAS MEDIANTE EL PROCEDIMIENTO CONVENCIONAL Y EN MICROONDAS KOS.....	66
4.6 COMPARAR LA TÉCNICA HISTOQUÍMICA DE VON KOSSA EN LAS MUESTRAS DECALCIFICADAS MEDIANTE EL PROCEDIMIENTO CONVENCIONAL Y EN MICROONDAS KOS.	70

CAPÍTULO 5 DISCUSIÓN	74
CAPÍTULO 6 CONCLUSIÓN.....	78
CAPÍTULO 7 BIBLIOGRAFÍA	80
CAPÍTULO 8 APÉNDICES	84
APÉNDICE A. RATA SPRAGUE DAWLEY.	84
A.1. Esqueleto ratas:.....	84
APÉNDICE B. PROTOCOLOS EMPLEADOS DURANTE LA INVESTIGACIÓN	90
B.1 Preparación de solución de Ana – Morse	90
B.2 Hematoxilina Eosina.....	90
B.3 Tricrómico de Masson	92
B.4 Von Kossa.....	93
APÉNDICE C. EVALUACIONES DE LAS VARIABLES ESTABLECIDAS.....	94
C.1 Calidad del corte histológico	94
C.2 Evaluación de la morfología tisular	97
C.3 Evaluación de la calidad de la coloración	99
APÉNDICE D. TOXICIDAD DE LOS AGENTES DESCALCIFICADORES MÁS UTILIZADOS.....	109
D.1 Toxicidad del Ácido nítrico:.....	109
D.2 Toxicidad del Ácido fórmico:	109
D.3 Toxicidad del Citrato de sodio:	110

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1.1. Fijadores químicos según su mecanismo de acción (1).	2
TABLA 1.2. Soluciones descalcificadoras más utilizadas.	5
TABLA 1.3. Aplicaciones microondas KOS de Milestone descritas por el fabricante (19).	11
TABLA 1.4. Protocolos de descalcificación en microondas KOS entregados por la empresa Milestone (19).	14
TABLA 3.1. Largo de las muestras de huesos largos	47
TABLA 6. Protocolo de procesamiento de las muestras.	50
TABLA 4.1. Evaluación de la calidad del corte histológico.	57
TABLA 4.2. Resultado evaluación morfología tisular.	60
TABLA 4.3. Resultados evaluación tinción de rutina (HE).	63
TABLA 4.4. Evaluación afinidad tintorial Tricrómico de Masson.	66
TABLA 4.5. Evaluación técnica histoquímica Von Kossa.	70
TABLA 8.1. Preparación de solución descalcificadora Ana – Morse.	90
TABLA 8.2. Protocolo HE teñidor automático Medite modelo TST 44 200.	90
TABLA 8.3. Protocolo tinción tricrómica de Masson.	92
TABLA 8.4. Protocolo Von Kossa.	93
TABLA 8.5. Calidad del corte histológico.	95
TABLA 8.6. Conservación de la morfología tisular.	98
TABLA 8.7. Calidad de la coloración HE.	101
TABLA 8.8. Calidad Tinción tricrómica de Masson.	104
TABLA 8.9. Depósitos de plata asociado a fosfato y carbonato de calcio, Von Kossa.	106

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.1. Magnetrón.....	10
FIGURA 1.2. Microondas de laboratorio KOS de Milestone (19).	11
FIGURA 1.3. Microondas KOS de Milestone, vista lateral y frontal (19).....	12
FIGURA 1.4. Microondas KOS de Milestone, vista trasera (19).....	12
FIGURA 1.5 Sistema de control de temperatura y extracción de vapores microondas KOS (19). 13	
FIGURA 1.6. Sistema de agitación automática microondas KOS (19).	13
FIGURA 1.7. Histomódulo y accesorios para descalcificación en microondas KOS (19).	14
FIGURA 1.8. Corte de tejido óseo descalcificado.	20
FIGURA 1.9. Trabécula de tejido óseo recién formado de un centro de osificación primario en el primordio de un hueso plano del cráneo de un feto humano de tres meses.	20
FIGURA 1.10. Mandíbula fetal, tricrómico de Masson, 10x (31).	22
FIGURA 1.11. Tinción de hueso, Von Kossa (33).	23
FIGURA 1.12. Cartílago embrionario.....	25
FIGURA 1.13. Cartílago Hialino Maduro. Corte teñido con hematoxilina – eosina x135 (27). ..	26
FIGURA 1.14. Cartílago Elástico de la epiglotis. Corte teñido con orceína x165 (27).	28
FIGURA 1.15. Cartílago Fibroso de un disco intervertebral. Tinción con HE. x275 (27).	29
FIGURA 1.16. Dibujo esquemático de las distintas partes de un hueso largo típico (tibia) (27). 29	
FIGURA 1.17. Dibujo esquemático de la estructura macroscópica de un hueso largo (27).	31
FIGURA 1.18. Preparado por desgaste de tejido óseo compacto x110 (27).	33
FIGURA 1.19. Dibujo esquemático de una parte de la diáfisis de un hueso largo (27).	33
FIGURA 1.20. Centro de primario de osificación. Tinción con HE x440 (27).	35
FIGURA 1.21. Esquema de un corte transversal de una médula ósea (27).	37
FIGURA 3.1 Ratas Sprague Dawley	46
FIGURA 3.2. Medición de las muestras.....	48
FIGURA 3.3. Muestras previo al lavado con agua corriente	48
FIGURA 3.4. Muestras descalcificadas en microondas KOS.	49
FIGURA 3.5. Inclusión de las muestras.	51
FIGURA 4.1. Evaluación del pH de la solución descalcificadora.	56
FIGURA 4.2. Calidad del corte histológico.	59

FIGURA 4.3. Conservación de la morfología tisular.....	62
FIGURA 4.4. Calidad de tinción de rutina (HE).....	65
FIGURA 4.5. Controles Tricrómico de Masson.....	68
FIGURA 4.6. Afinidad tintorial Tricrómico de Masson.	69
FIGURA 4.7. Depósitos de Ag ⁺ , asociados a carbonato y fosfato de Ca ⁺² , Von Kossa.	72
FIGURA 4.8. Radiografía muestras post descalcificación utilizada como control de la técnica histoquímica de Von Kossa.	73
FIGURA 4.9. Control de la radiografía anterior, corresponde a muestras sin descalcificar.	73
FIGURA 8.1. Anatomía regional de todo el esqueleto.....	85
FIGURA 8.2. Imagen histológica de un ratón de 6 semanas de edad.	86
FIGURA 8.3. Anatomía regional del cráneo (39).	86
FIGURA 8.4. Anatomía regional de la vértebra lumbar (39).....	87
FIGURA 8.5. Articulación de la rodilla, HE.....	88

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO 4.1. Calidad del corte histológico.....	57
GRÁFICO 4.2. Conservación de la morfología tisular.	61
GRÁFICO 4.3. Calidad de la tinción de rutina, Hematoxilina – Eosina.....	64
GRÁFICO 4.4. Afinidad tintorial Tricrómico de Masson.....	67
GRÁFICO 4.5. Resultados técnica de Von Kossa en términos de los depósitos de plata asociados a carbonato y fosfato de calcio.	71

CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN

El trabajo diario en un laboratorio de anatomía patológica consiste en llevar a cabo el procesamiento de diversos tipos de biopsias, el cual permite que éstas sean estudiadas a nivel morfológico para conocer las condiciones del órgano o tejido y, de esta manera, entregar un diagnóstico, pronóstico y tratamiento a los hallazgos encontrados por el médico patólogo. Es por esto que una biopsia siempre es considerada como urgente, porque en la mayoría de los casos el resultado de ella determina el tratamiento y pronóstico.

Un procesamiento incompleto o inadecuado deriva en un perjuicio directo para el diagnóstico y, por tanto, para la calidad de vida del paciente y su red de apoyo.

1.1 PROCESAMIENTO DE TEJIDOS

Para entregar el resultado de una biopsia, es necesario realizar un procesamiento de la muestra que permita la obtención de un corte histológico teñido, para su posterior visualización al microscopio que le permita al médico patólogo entregar su diagnóstico. Para ello, es necesario realizar diversos procedimientos que se describen a continuación.

1.1.1 Fijación

La fijación de tejidos es un proceso mediante el cual se pretende interrumpir los procesos de degradación tras la muerte celular, intentando conservar la arquitectura y la composición tisular lo más próxima posible a lo que se encontraba en el organismo vivo (1).

Según su mecanismo de acción este proceso se clasifica en dos grupos principales: fijación por métodos físicos y fijación por métodos químicos.

a) Fijación por métodos físicos: Se realiza a través de la congelación o el calentamiento del tejido.

En la fijación por congelación se emplea el enfriamiento por congelación del tejido para detener la autólisis y putrefacción tisular, utilizando para ello, agentes como el nitrógeno líquido o el isopentano. Se prefiere este método cuando se pretende realizar estudios morfológicos o

funcionales en los que se requiera conservar intacta la estructura antigénica del tejido o su contenido enzimático (1).

El segundo método físico, consiste en la fijación del tejido aplicando calor, el cual produce coagulación de las proteínas tisulares (1).

b) Fijadores por métodos químicos: Actúan desnaturalizando e insolubilizando las proteínas tisulares, lo que bloquea la autólisis por inactivación enzimática. Además, algunos de estos fijadores funcionan como agentes antimicrobianos (1).

A continuación, se presenta una tabla que contiene el mecanismo de acción de los diferentes fijadores químicos:

TABLA 1.1. Fijadores químicos según su mecanismo de acción (1).

Mecanismo de acción	Descripción	Ejemplos
Deshidratación tisular	Actúan eliminando tanto el agua libre como aquella ligada a las moléculas proteicas.	Alcohol etílico Acetona
Cambios en el estado coloidal de las proteínas	Provoca que las proteínas lleguen a su punto isoelectrico, de esta forma adquieren una estabilidad mínima y una disociación máxima, haciendo que las proteínas se desprendan del agua ligada a ellas.	Ácido acético Ácido tricloroacético Ácido crómico
Formación de sales con los tejidos	Se emplean cationes metálicos o un derivado orgánico que forman proteinatos o picratos con los tejidos	Cloruro de mercurio Dicromato potásico Ácido pícrico Acetato de uranilo

Reticularización de proteínas	Desnaturaliza las proteínas induciendo la ruptura masiva de los puentes de hidrógeno que determinan la estructura helicoidal de las proteínas y forma en su lugar, una malla reticular polipeptídica.	Formaldehído Glutaraldehído Tetróxido de Osmio
Mezclas fijadoras	Combina fijadores simples en soluciones complejas, suma las ventajas de cada uno amortiguando sus inconvenientes	Bouin Gendre Zenker Carnoy Orth

Existen ciertas propiedades fundamentales que debe poseer un fijador ideal, éstas son (1):

1.- *Capacidad para bloquear la autólisis:* Cuanto mayor sea esta capacidad, mejor será el agente fijador. Esto depende de su poder para producir la desnaturalización proteica, de forma que la actividad enzimática quede paralizada.

2.- *Efecto microbicida:* Impide la acción bacteriana que es responsable de la putrefacción.

3.- *No provocar retracción o distorsión sobre el tejido:* Este efecto provoca anomalías en la arquitectura tisular.

4.- *Inducción de cambios en la textura y composición tisular:* Esto favorecerá la inclusión, corte y coloración del material histológico.

El formaldehído es el fijador más ampliamente utilizado en los laboratorios de anatomía patológica, debido a que es una de las mejores opciones considerando las características ideales que se requieren en un fijador, mencionadas anteriormente.

- **Formaldehído:** El mecanismo de acción mediante el cual la formalina fija las estructuras, es a través del radical metilenglicol, que es su forma activa. Esta sustancia tiende a formar enlaces

químicos con todos los grupos químicos, excepto con los de carácter ácido. Por este motivo, tras la ruptura de los puentes de hidrógeno intermoleculares, se forman puentes metálicos entre las moléculas proteicas adyacentes, de forma que los surgidos entre grupos amino, imino, imido, guanidil, hidroxilo, carboxilo y sulfihidrido son reversibles. Por el contrario, los que se forman entre aminoácidos aromáticos, como la tirosina, triptófano, fenilalanina e histidina, son irreversibles (1). En otras palabras, posee una acción polimerizante, es decir, la formación de complejos de adición por creación de uniones entre las proteínas (2).

1.1.2 Descalcificación

Dentro de las biopsias recibidas en los laboratorios de anatomía patológica se encuentran las muestras calcificadas; un ejemplo de ello son las piezas óseas, tiroides con cuerpos de psamomma, osteosarcomas, osteocondromas, etc; las cuales requieren un procesamiento que permita realizar diversos estudios. Para esto es necesario llevar a cabo un proceso previo denominado descalcificación, que consiste en la remoción de las sales de calcio presentes en los tejidos tras haber realizado su fijación. Esta etapa puede realizarse con distintas soluciones descalcificadoras, siendo las principales aquellas formadas por ácidos fuertes o débiles.

Las soluciones descalcificantes ácidas son sustancias que al ponerse en contacto con las sales de los huesos, dientes, etc; poseen la propiedad de formar combinaciones solubles en agua y fácilmente descartables mediante el lavado (3). Otras soluciones descalcificantes son aquellas en las que se emplean agentes quelantes, los cuales son capaces de captar los iones de calcio en solución (2). Además, se han utilizado resinas de intercambio iónico y disociación electrolítica (4).

En la siguiente tabla se presentan las soluciones descalcificadoras más utilizadas:

TABLA 1.2. Soluciones descalcificadoras más utilizadas.

Solución descalcificadora	Ventajas	Inconvenientes
Ácido nítrico	<p>Provoca una rápida descalcificación (2).</p> <p>Causa una menor retracción tisular (4).</p>	<p>La prolongación excesiva del tiempo de descalcificación suele anular la fijación previa y alterar progresivamente el tejido (4).</p>
Solución de formalina – ácido nítrico	<p>Es de acción relativamente rápida (4).</p> <p>Provoca menores alteraciones tisulares que la solución acuosa de ácido nítrico (4).</p> <p>De fácil manejo (4).</p>	<p>Dificulta la tinción nuclear en mayor grado que otras soluciones descalcificadoras con ácidos débiles (4).</p> <p>Antes de su procesamiento requieren neutralización en sulfato sódico al 5% y lavado posterior en agua corriente durante al menos 2 horas (4).</p>
Solución acuosa de ácido fórmico	<p>Fija y descalcifica simultáneamente (4).</p> <p>No dificulta demasiado la coloración nuclear (4).</p> <p>Es especialmente recomendado para descalcificar dientes (4).</p>	<p>Es de acción muy lenta (4).</p> <p>Requiere neutralización posterior en sulfato sódico al 5% y lavado posterior en agua corriente al menos durante 18 hrs (4).</p>

		Puede llegar a dañar los tejidos, antígenos y enzimas (5).
Ácido etilen-diaminotetracético (EDTA)	No altera la coloración ni deforma los tejidos (2). No destruye enzimas ni anticuerpos, por lo que es excelente para las técnicas moleculares como la IHQ (2,5).	Es mucho más lento que los métodos ácidos (2).
Ana Morse	Entrega una descalcificación menos agresiva del tejido (5).	Es más lenta que las soluciones ácidas (5).

1.1.2.1 Métodos de evaluación de la descalcificación

Para evaluar si la descalcificación del tejido está completa, existen varios métodos de prueba para ello, siendo considerados los más confiables los métodos de radiografía y químico, descritos más adelante.

a) Pruebas físicas: Se realiza mediante la utilización de alfileres, agujas o bisturí y se punciona un área del espécimen que no comprometa el análisis para ver el nivel de dureza. Cuando el tejido no opone resistencia, se considera completa (4).

Aunque todavía se usan las pruebas físicas, se consideran imprecisas y dañinas para los tejidos. Explorar físicamente, pinchando, cortando, doblando o apretando el tejido puede crear artefactos como marcas de agua, alterar el tumor blando del hueso o provocar microfracturas falsas positivas de trabéculas finas, con el consecuente error de diagnóstico (5).

b) Prueba del oxalato de calcio (Clayden 1952): Este método implica la detección de calcio en soluciones ácidas por precipitación de hidróxido de calcio insoluble u oxalato de calcio, pero no es adecuado para soluciones que contienen más del 10% de ácido, aunque podrían diluirse y dar como resultado una prueba menos sensible (5).

Se emplean dos soluciones, una de hidróxido de amonio concentrado y otra de oxalato de amonio acuoso saturado y se realiza tomando 5 ml del líquido descalcificador usado y se agrega un trozo de papel tornasol o se emplea un medidor de pH con agitador magnético. Se agrega el hidróxido de amonio gota a gota, agitando después de cada gota, hasta que el papel tornasol o el medidor de pH indiquen que la solución es neutra, es decir, pH 7. Luego, se agregan 5 ml de oxalato de amonio saturado, se agita bien y se deja reposar por 30 minutos.

Si se forma un precipitado blanco (hidróxido de calcio), inmediatamente después de agregar el hidróxido de amonio indica que hay una gran cantidad de calcio en el tejido, por lo que no es necesario continuar con el paso del oxalato, que también sería positivo. Las pruebas se pueden detener y se puede realizar un cambio a una solución descalcificadora nueva en este punto. Si al agregar el hidróxido de amonio la solución se observa clara, es decir, negativa; se procede a agregar el oxalato de amonio. Si ocurre precipitación después de agregar el oxalato de amonio, hay menos calcio presente en el tejido. Cuando hay una cantidad menor de calcio, toma más tiempo formar un precipitado en el líquido, por lo tanto, si el líquido permanece limpio después de 30 minutos es seguro asumir que la descalcificación está completa (5).

c) Método de radiografía: Es la prueba más sensible para detectar calcio en la calcificación ósea o tisular y funciona de la misma forma que las radiografías tomadas con el equipo de rayos (5).

Consiste en enjuagar la solución descalcificadora de la muestra, colocar cuidadosamente los huesos identificados en una lámina de polietileno impermeable sobre la película de rayos X, exponer según las instrucciones y dejar los huesos en su lugar hasta que la película se desarrolle y se examinen las calcificaciones (5).

Los huesos con formas irregulares y grosor variable a veces pueden inducir a error en la interpretación de los resultados. Este problema se resuelve comparando la radiografía de prueba

con la radiografía de la muestra previa a la descalcificación y correlacionar las áreas calcificadas con las variaciones de la muestra (5).

La descalcificación como vimos anteriormente, es un proceso sumamente extenso, lo que se traduce en un retraso en la entrega del resultado de los estudios realizados y, con ello, mayor tiempo de espera de parte del paciente para recibir un diagnóstico y tratamiento. Es por esto que a lo largo de los años se ha trabajado en busca de disminuir los tiempos de procesamiento de biopsias óseas sin afectar la preservación del tejido. Una de las soluciones propuestas es el uso de las microondas durante este proceso.

1.1.2.2 Descalcificación en microondas

Los trabajos de descalcificación en microondas comienzan a fines 1980, siendo los primeros autores Ann Pathol (1989) (6) y N. Vongsavan (1990) (7).

A partir de ese período comienza una línea de tiempo de investigaciones al respecto, pasando por los años 90 (7,8,9,10) y teniendo su auge desde el año 2013 hasta el presente año (11,12,13,14).

A continuación se describe el funcionamiento y mecanismo de acción de estas ondas electromagnéticas y los hornos microondas.

1.1.2.2.1. Microondas

Las microondas son ondas de radio de alta frecuencia (300 MHz a 300 GHz), tienen una longitud de onda muy pequeña (30 cm – 0,3 mm, la longitud de onda de los hornos microondas es de 12 cm) (15) y pertenecen al espectro electromagnético (16). Son usadas principalmente para la difusión de televisión, radar para la ayuda a la navegación aérea, marítima y las telecomunicaciones, incluyendo los teléfonos móviles. También son empleadas en la industria para procesar materiales, en medicina para el tratamiento por diatermia y en las cocinas para la preparación de alimentos (16).

Las microondas poseen la propiedad de excitar la molécula de agua, por consiguiente se utilizan en los hornos de microondas para calentar alimentos que contengan este líquido (17). La exposición

de las moléculas polares, como el agua y las regiones terminales de las proteínas a estos campos electromagnéticos, produce una oscilación de 180° a una razón de 2,5 billones de ciclos por segundo, induciendo la cinética molecular, lo que genera un calentamiento casi instantáneo (18).

a) El horno microondas: El horno de microondas fue creado a partir del descubrimiento accidental del investigador de la Universidad de Yale, Albert Hull y se define como un dispositivo generador de ondas electromagnéticas, a través de un magnetrón en una frecuencia de 2,45 GHz y una longitud de onda de 12,2 cm (18).

Está formado por una cavidad de resonancia cerrada, cuyas paredes de alta conductividad generan campos electromagnéticos (18).

Las microondas se generan cuando la corriente eléctrica viaja por un conductor. Los electrones comienzan a moverse por el conductor, generando un campo de energía que lo rodea, flotando sobre la superficie. Esta energía se produce mediante dos campos: el campo eléctrico y el campo magnético. Las ondas eléctricas y magnéticas se combinan perpendicularmente, formando un campo electromagnético. Si se hace oscilar la corriente a una frecuencia mayor, la energía del campo electromagnético se liberará y será lanzada al espacio (18).

El magnetrón es un tubo diodo que convierte la energía eléctrica de baja frecuencia en microondas de alta frecuencia (2,45 GHz) (18). Está formado por varias estructuras:

a) Ánodo: Es un tubo hueco de hierro, con paletas que se proyectan hacia adentro del tubo. Las zonas entre las paletas son cavidades resonantes, que determinan la frecuencia de salida del tubo (18).

b) Filamento: Se encuentra en el centro del tubo de hierro y actúa como cátodo. Se sostiene por las puntas cerradas y blindadas dentro del tubo (18).

c) Antena: Es un círculo conectado al ánodo, se extiende dentro de una de las cavidades resonantes y se une a la guía de onda por la que transmite la energía (18).

El campo magnético es producido por imanes que rodean el magnetrón, para que el campo magnético sea paralelo al eje del cátodo (18).

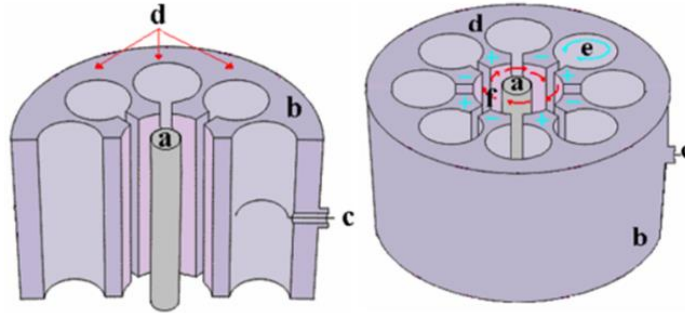


FIGURA 1.1. Magnetron

a) Cátodo, b) Ánodo, c) salida de la microonda, d) Fuerte campo magnético e) Oscilación de la corriente en la cavidad, f) Espacio de interacción entre el campo magnético y eléctrico (18).

Los campos magnéticos y eléctricos influyen sobre el movimiento de los electrones, desde el cátodo al ánodo, desde un potencial negativo a uno positivo. La fuerza sobre un electrón en un campo magnético es perpendicular a este campo como a la trayectoria del electrón, por lo que el electrón se dirige al ánodo en una curva (18).

El magnetrón produce microondas a través de la antena y las envía a la cavidad del horno por medio de la guía de ondas, donde las moléculas de agua se agitan, girando entre sí y colisionando con las demás, penetrando hasta 2,5 cm de profundidad en el tejido, calentándose el resto por contacto (18).

Junto a las aplicaciones del horno microondas en procesos como la fijación, procesamiento, tinción, recuperación antigénica, etc, nacen los microondas de laboratorio, equipos creados especialmente para el trabajo con muestras o soluciones de laboratorio. Un ejemplo de ellos es el microondas KOS de Milestone.

1.1.2.2.2. Microondas KOS



FIGURA 1.2. Microondas de laboratorio KOS de Milestone (19).

El microondas de laboratorio KOS de Milestone y sus accesorios se han diseñado para su uso en el laboratorio y, por tanto, son capaces de resistir las condiciones extremas provocadas por su uso continuo en la preparación de muestras histológicas (19).

La unidad KOS se ha diseñado específicamente para ejecutar en modo semiautomático las aplicaciones descritas en la siguiente tabla (19):

TABLA 1.3. Aplicaciones microondas KOS de Milestone descritas por el fabricante (19).

Aplicaciones microondas de laboratorio KOS
Fijación y postfijación
Deshidratación y diafanización
Infiltración en parafina
Desenmascaramiento antigénico
Coloraciones especiales
Descalcificaciones

A continuación se presentan dos figuras que contienen las vistas frontal, lateral y trasera del microondas KOS (19).

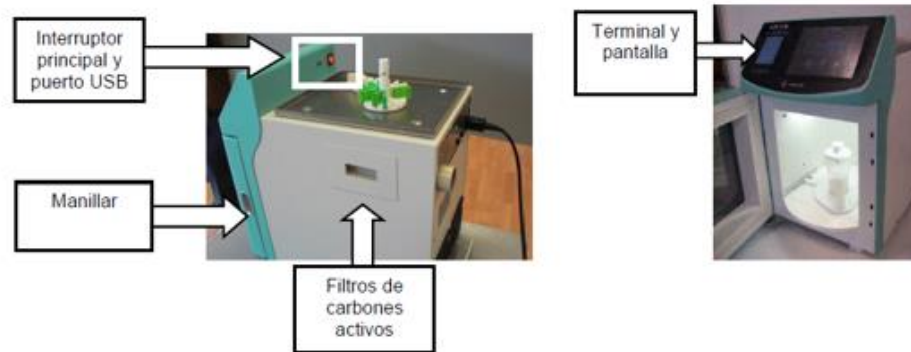


FIGURA 1.3. Microondas KOS de Milestone, vista lateral y frontal (19).

Para abrir la puerta, se debe tirar de la manilla observada en la imagen. El nivel de seguridad máximo está garantizado por 4 microinterruptores que interrumpen inmediatamente la emisión de microondas cuando se abre la puerta (19).



FIGURA 1.4. Microondas KOS de Milestone, vista trasera (19).

1.1.2.2.2.1 Características del microondas KOS de Milestone: El equipo KOS es un microondas diseñado especialmente para el trabajo en el laboratorio de anatomía patológica (19). Presenta diferentes características que le entregan las ventajas de mantener un control constante de la temperatura, una agitación de las soluciones en él y un sistema de ventilación y extracción de vapores (19).

Al igual que todos los microondas, este funciona bajo el principio de generación de energía cinética de moléculas polares, provocando un movimiento en 180° de ellas, lo que tiene como consecuencia la generación de calor (19).

El control constante de la temperatura se lleva a cabo a través de un sensor de temperatura láser ubicado a uno de los costados del equipo, mientras que la agitación es proporcionada por un agitador magnético de inicio automático. Este agitador permite una distribución homogénea de la temperatura en el interior de la solución, lo que elimina los “puntos calientes” (19).

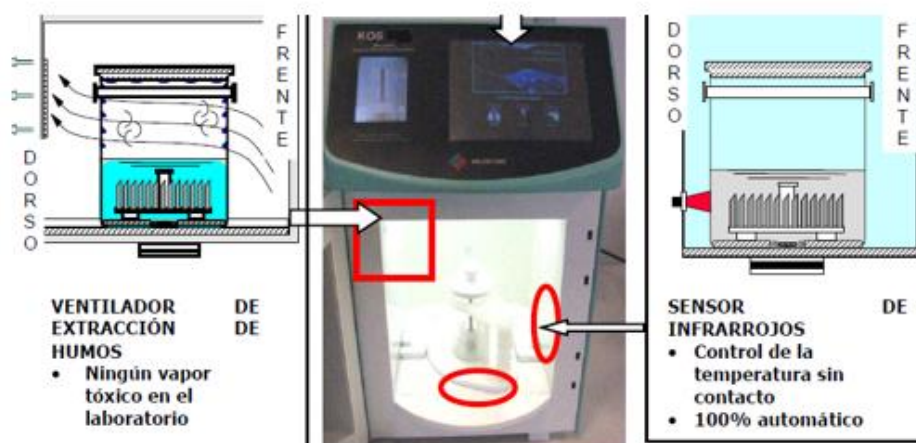


FIGURA 1.5 Sistema de control de temperatura y extracción de vapores microondas KOS (19).

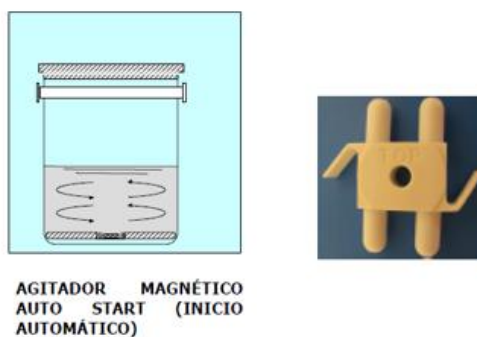


FIGURA 1.6. Sistema de agitación automática microondas KOS (19).

Los recipientes que se utilizan para el trabajo con este microondas son diseñados específicamente para ello, siendo fabricados de un material que no se ve afectado por las microondas (componentes apolares) y son denominados histomódulos (19).







Descalcificación y fijación de hasta 45 casetes. Incluye A-B		
Histomódulo 45K para fijación y descalcificación (cantidad 1) incluye A1-A2-A3  A Ref. P/N 67320	 A1	Recipiente de cristal 135 mm Ref. P/N 67336L
	 A2	Soporte para el histomódulo 45K Ref. P/N 67326
	 A3	Tapa completa Ref. P/N 67330
Gradilla 45K completa (cantidad 1) incluye B1  B Ref. P/N 67325	 B1	Agitador magnético completo Ref. P/N 65594

FIGURA 1.7. Histomódulo y accesorios para descalcificación en microondas KOS (19).

La empresa fabricante del microondas KOS, Milestone, también entrega algunos protocolos tipo para el proceso de la descalcificación, los cuales están pensados para biopsias pequeñas genéricas de 1,8 mm (19).

TABLA 1.4. Protocolos de descalcificación en microondas KOS entregados por la empresa Milestone (19).

EDTA 10% (pH 7,2-7,4) 37 °C	EDTA10% (pH 7,2-7,4) 50 °C	FÓRMICO 10% 37 °C	FÓRMICO 10% 50 °C
18 horas	3,5 horas	1,5 horas	1 hora

1.1.3 Deshidratación

Es el procedimiento que tiene por finalidad la remoción o eliminación completa del agua de los tejidos para que se pueda embeber adecuadamente en un medio de inclusión hidrofóbico, el que entrega un soporte que permita el corte de los tejidos (20). Este proceso debe ser completo porque, de lo contrario, el solvente no actúa de forma adecuada y el bloque de inclusión no alcanza la dureza requerida (21).

Puede realizarse utilizando cualquier reactivo capaz de absorber el agua de los tejidos, mediante agentes deshidratantes, los principales son alcohol etílico, alcohol metílico, alcohol butílico, dióxido de etileno, acetona, alcohol isopropílico y tetrahidrofurano (20). Se prefiere utilizar los alcoholes isopropílico o etílico, debiéndose cumplir con los siguientes parámetros:

a) Graduación de los alcoholes: Empleando una serie de alcoholes de graduación ascendente (70%, 80%, 95% y 100%), para evitar una marcada retracción del tejido por la acción brusca que produce someterlo inmediatamente a una elevada graduación de este agente (20).

b) Volumen y número de baños de deshidratación: El volumen de baño debe ser por lo menos 10 veces superior al volumen de la muestra que se pretenda deshidratar y deben realizarse al menos tres baños de deshidratación. (20).

c) Duración de la deshidratación: Se considera en función del volumen de las muestras y de su contenido de agua. Debe ser completa y evitar exposiciones prolongadas para no provocar endurecimiento excesivo de los tejidos (20).

1.1.4 Diafanización

Es un proceso por el cual se consigue la sustitución del agente deshidratante por una sustancia miscible con el medio de inclusión que va a utilizarse. Con ello se pretende que toda la pieza histopatológica se halle embebida en un agente químico líquido, en el que pueda disolverse el

medio de inclusión y, de este modo, penetrar en el tejido (22). Algunos líquidos diafanizadores son el tolueno, el cloroformo y el xilol, siendo este último el más frecuente (21).

El procedimiento generalmente se hace mediante baños sucesivos en el agente diafanizador, de duración variable en función de las características del agente y del volumen de la muestra (22).

1.1.5 Impregnación e inclusión

Este proceso consiste en embeber los tejidos con un medio que llene todas las cavidades naturales, espacio e intersticios tisulares e intracelulares, que proporcione la consistencia firme necesaria para hacer cortes bastante delgados sin provocar distorsión ni alterar las relaciones espaciales del tejido y los elementos celulares (2). Generalmente se pueden emplear tres medios de impregnación e inclusión, que pueden ser celoidina, gelatina o parafina, siendo esta última la más frecuente (2).

1.1.5.1. Inclusión en parafina

Las parafinas son hidrocarburos saturados provenientes de la destilación del petróleo, generalmente son sustancias sólidas a temperatura ambiente (23). Existen diferentes tipos de parafina que se caracterizan por sus puntos de fusión, estos oscilan entre 40° C y 65° C, éstas se clasifican en:

a) Blandas: Tienen un punto de fusión de 45° C – 52° C. Son recomendables para incluir tejidos en los que se detectarán antígenos mediante inmunohistoquímica (23).

b) Semiduras: Sus puntos de fusión son de 54° C – 58° C. Es la parafina que se emplea con mayor frecuencia en los laboratorios donde se realiza técnica histológica. De acuerdo a la temperatura del medio, se recomienda su uso pues se pueden obtener secciones de 5 a 7 de μm (23).

c) Duras: Tienen un punto de fusión de 60° C – 65° C. Son parafinas que deben usarse en ambientes con climas de temperaturas altas (23).

Durante la inclusión, los tejidos y la parafina integran un solo bloque que posee la dureza y la consistencia suficientes para obtener secciones delgadas y transparentes.

1.1.6 Microtomía y corte

Las secciones delgadas o “cortes” se obtienen mediante un micrótopo, que secciona el bloque de parafina en cortes delgados y de grosor uniforme, estos deben ser de un grosor de 3 a 5 μm , en la mayoría de los casos (24).

Se utilizan dos tipos principales de micrótopos, los de tipo Minot y los de deslizamiento. Los micrótopos tipo Minot son los de uso más frecuente en cualquier laboratorio donde se realiza técnica histológica, especialmente cuando los tejidos están incluidos en parafina. Los micrótopos de deslizamiento, en cambio, se emplean cuando los tejidos están incluidos en celoidina o cuando la inclusión en parafina contiene porciones voluminosas de tejidos y órganos (24).

Estos instrumentos brindan ventajas como el control del grosor del corte, pudiendo regular el número de micras deseadas, también producen cortes seriados, es decir, cuando se obtiene un corte, éste queda adherido por su borde anterior al borde posterior del que lo precedió; formándose de esta manera una cinta de cortes que va descendiendo por la superficie anterior de la navaja. Los cortes seriados se emplean cuando se desea realizar reconstrucciones tridimensionales del órgano procesado, cuando se requieren comparar secciones vecinas del tejido u órgano, coloreadas por diversas técnicas de tinción o cuando se hace el estudio microscópico topográfico en embriones y fetos (24).

1.2 TINCIÓN DE TEJIDOS

Los tejidos en general carecen de color, a menos que tengan pigmentos como la melanina o la hemoglobina.

El procesamiento completo de los tejidos deja como resultado un corte de tejido incoloro y relativamente traslúcido, para permitir su visualización microscópica debe ser teñido con algún agente colorante. Éstas técnicas permiten evaluar tanto la morfología como la distribución de los componentes de la muestra (2).

También existen las llamadas técnicas histoquímicas descritas más adelante, las cuales son utilizadas para identificar sustancias, estructuras o depósitos específicos en el tejido.

1.2.1 Tinción de rutina Hematoxilina – Eosina (HE):

Esta técnica es parte de la rutina diaria dentro de un Laboratorio de Anatomía Patológica, ya que permite evaluar la morfología general del tejido y verificar si se encuentra o no alterada, lo que puede llevar a un diagnóstico o a la solicitud de otras técnicas adicionales, como las tinciones histoquímicas o reacciones inmunohistoquímicas para poder entregar un diagnóstico.

Utiliza como principio básico la combinación de un colorante básico (Hematoxilina) y uno ácido (Eosina) que colorean el tejido mediante unión electrostática a los componentes ácidos (ADN y ARN) y básicos (citoplasma y fibras colágenas) del tejido, respectivamente.

a) Hematoxilina: Es un colorante básico natural que se extrae del duramen del árbol *Hematoxylon campechianum*, encontrado por primera vez en la región de Campeche, México (2).

El extracto natural que se obtiene de la madera no es un colorante activo y debe ser oxidado para formar hemateína. En este proceso de transformación oxidativa, el hematoxilón pierde dos átomos de hidrógeno y uno de sus núcleos se vuelve quinona. En solución alcohólica o acuosa, la oxidación espontánea es muy lenta, y puede requerir hasta un año. Este proceso de oxidación se denomina “maduración” y se puede lograr casi instantáneamente con oxidantes químicos como el óxido de mercurio, yodato de sodio, permanganato de potasio, peróxido de hidrógeno e hipoclorito cálcico (2).

La hemateína sin mordientes es casi inútil, pues es un colorante que produce una tinción ámbar. Los mordientes son sustancias cuya estructura fisicoquímica facilita la fijación del colorante sobre los tejidos. Para esta tinción se utilizan como mordientes sales bi o trivalentes o hidróxidos de metales, como las sales de aluminio, hierro, cromo, cobre, molibdeno y vanadio; además de sales simples como sulfatos y cloruros, pero suelen preferirse los alumbres, como el alumbre de potasio, hierro o amonio. El complejo resultante se denomina “laca” de hematoxilina (2).

Este agente es capaz de teñir la cromatina de los núcleos permitiendo evaluar los cambios en los patrones de ésta junto con las alteraciones del tamaño y la forma nuclear, lo cual es un marcador diagnóstico en patología (25).

b) Eosina: Las eosinas son xantenos ácidos o colorantes de ftaleína y es un colorante artificial de naturaleza química ácida, lo que le permite ser atraído fuertemente hacia los radicales básicos de la histidina, lisina y arginina presente en las proteínas citoplasmáticas y tisulares. Los representantes más comunes de este grupo de colorantes comerciales son la Eosina Y, la Eosina B y la Safranina. La eosina misma deriva su nombre de su color parecido a la aurora; el “Y” quiere decir amarillento, pues éste es el color predominante de su solución. La eosina se utiliza sobre todo como colorante de fondo o de contraste, en unión con los colorantes de núcleos como la hematoxilina (2,26).

• **Resultados:** Núcleos azul /negro, eritrocitos naranja a rosa y estructuras restantes rosado a rojo (26).

Un corte de hueso teñido con HE permite identificar los núcleos celulares de color azul/negro (basófilos) con detalle cromatínico evidente, el tejido conectivo de color rosado a rojo pálido (acidófilo), la matriz ósea del mismo color pero más intensamente teñido (mayor acidofilia) y los eritrocitos de los vasos sanguíneos de color naranja a rosa.

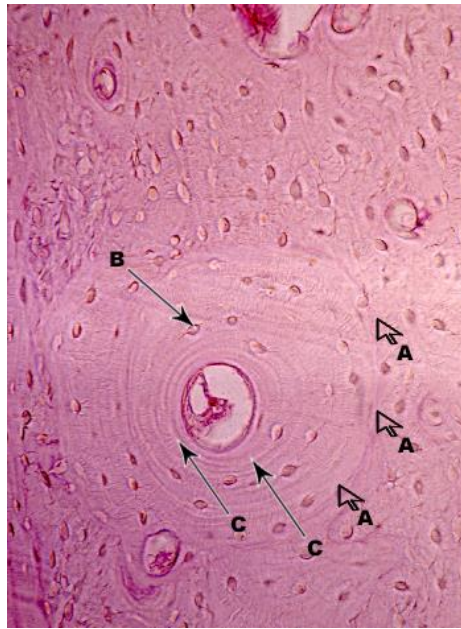


FIGURA 1.8. Corte de tejido óseo descalcificado.

A. Sistema de Havers; B. Osteocitos; C. Laminillas (27)

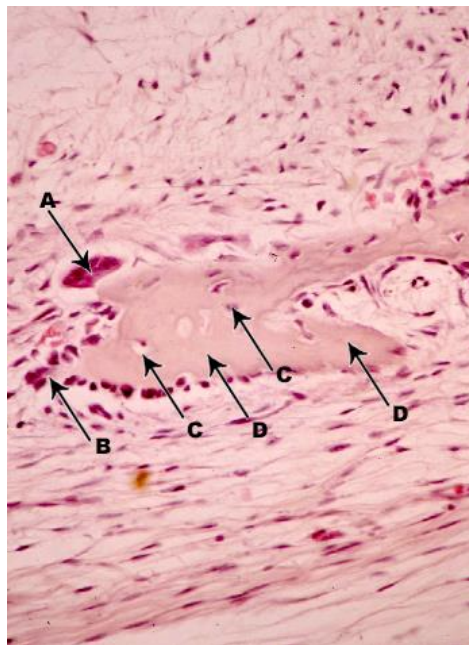


FIGURA 1.9. Trabécula de tejido óseo recién formado de un centro de osificación primario en el primordio de un hueso plano del cráneo de un feto humano de tres meses.

A. Osteoclasto; B. Osteoblastos; C. Osteocitos; D. Matriz ósea (27).

1.2.2 Tinciones Especiales

Son técnicas que buscan la identificación específica de una estructura, componente o sustancia del tejido y se realizan mediante reacciones químicas específicas controladas, que se evidencian como una coloración fija de dicha estructura (2).

Los colorantes o soluciones empleadas se caracterizan por poseer gran afinidad por el componente que se desea demostrar y una afinidad pobre o nula para los demás elementos de los tejidos (2).

1.2.2.1 Coloración tricrómica de Masson

Consiste en una técnica de tinción en la que se emplean tres colorantes diferentes, Hematoxilina férrica, Biebrich Scarlet y Azul de Anilina o Verde Luz que tiñen selectivamente los distintos componentes del tejido (28,29).

Respecto de su fundamento técnico, podemos decir que hay numerosos factores que influyen en la coloración específica diferencial que las tinciones tricrómicas producen sobre los núcleos celulares, los tejidos epiteliales, musculares y el tejido conectivo (28).

Entre esos factores, quizá el de mayor importancia sea el distinto grado de permeabilidad que ofrecen estas estructuras al paso de colorante, dependiendo fundamentalmente de su grado de dispersión en la solución empleada. De esta manera y tras el proceso de fijación tisular que provoca una reticularización proteica general, las proteínas de los citoplasmas celulares se agrupan para constituir una malla de poro fina, mientras que las fibras del tejido conectivo lo hacen dibujando una red más laxa (28).

Otro factor de importancia a la hora de definir estas coloraciones es el valor del pH al que se utilizan los colorantes: tienen mayor afinidad por las fibras colágenas en medio fuertemente ácido (especialmente a un pH óptimo en torno a 1.5) (28).

En la coloración selectiva desempeñan un papel fundamental los fenómenos de mordentaje previo con los ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico. Al parecer, estos ácidos bloquean selectivamente los residuos básicos existentes en el tejido a excepción de los fuertemente catiónicos de la colágena, donde luego se acoplarán los radicales aniónicos (28).

En lo que respecta a la coloración nuclear empleada, el bajo pH con que se realiza la coloración diferencial hace aconsejable utilizar lacas de hematoxilina que no sean decoloradas en este proceso, lo que prácticamente impone el empleo de hematoxilas férricas (28).

- **Resultados:** Se obtiene una coloración nuclear negro azulada entregada por la hematoxilina férrica, un citoplasma, queratina, fibras musculares y eritrocitos teñidos de color rojo con Biebrich Scarlet) y el colágeno y reticulina teñidos de azul o verde, gracias al Azul de Anilina o Verde Luz (28).

Al realizar esta técnica sobre un tejido óseo se observa una matriz ósea descalcificada teñida de un color azul o verde intenso (dependiendo del uso de azul de anilina o verde luz), colágeno y reticulina del mismo color pero menos intenso, células óseas con núcleos negro azulado y citoplasmas, eritrocitos, calcificaciones y fibras musculares de color rojo (30).

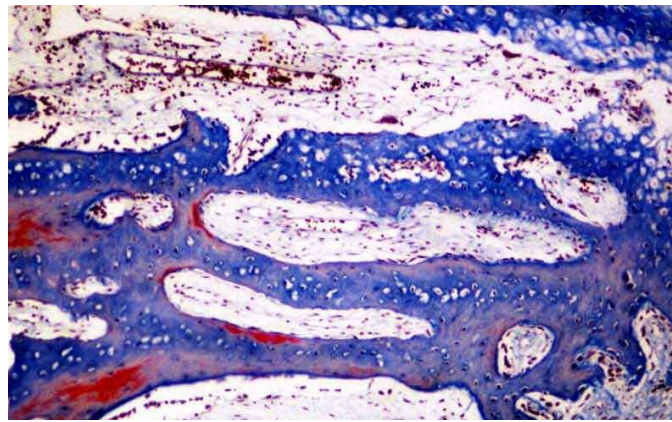


FIGURA 1.10. Mandíbula fetal, tricrómico de Masson, 10x (31).

1.2.2.2 Método de Von Kossa

La técnica de Von Kossa generalmente es designada como un método histoquímico para la identificación de calcio, pero en realidad es una técnica que demuestra el fosfato y el carbonato, que son los aniones con los que se asocia el calcio en los tejidos calcificados normales y patológicos (29).

Los cortes se tratan con nitrato de plata y los cationes de calcio son reemplazados por ella. La reacción se lleva a cabo con luz brillante, lo que produce la reducción de los iones de plata, formando fosfato y carbonato de plata insoluble, que se observa como un depósito fino de color negro (29,32).

Alternativamente, el nitrato de plata se puede aplicar en la oscuridad o a baja luz, llevando a cabo la reducción de forma química con una solución de hidroquinona u otros agentes de revelado fotográfico. Cualquier plata ionizada no reducida es finalmente eliminada por el tratamiento con tiosulfato de sodio (29).

- **Resultados:** Hueso mineralizado y calcificaciones de color negro, osteoide y núcleos de color rojo y citoplasma de color rosado claro (32,33).

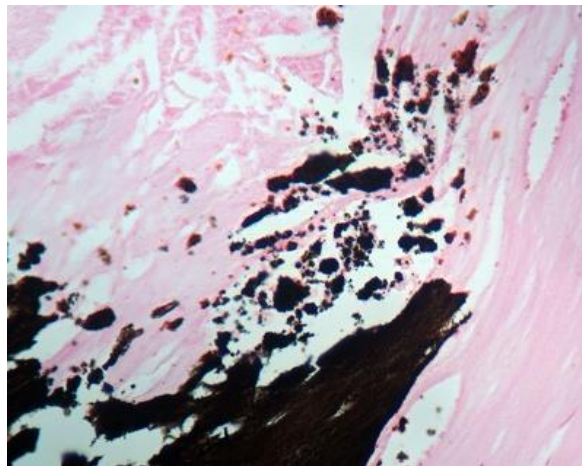


FIGURA 1.11. Tinción de hueso, Von Kossa (33).

1.3 HISTOLOGÍA DEL SISTEMA ÓSEO Y MÉDULA ÓSEA

Es indispensable conocer la histología del sistema óseo y la médula ósea a la hora de estudiar este tipo de muestras, pues de ello dependerán las técnicas escogidas por el médico patólogo o el tecnólogo médico a la hora de buscar un diagnóstico.

Durante esta investigación se realizaron técnicas destinadas a la visualización general de la morfología del sistema óseo y médula ósea, como la Hematoxilina – Eosina, otras empleada para evidenciar las fibras colágenas, útil para la búsqueda de fibrosis ante lesiones benignas o malignas, y por último, una técnica utilizada para demostrar los iones fosfato y carbonato, que son los iones a los cuales se encuentra asociado el calcio en el tejido calcificado normal y patológico.

1.2.1 Cartílago

El cartílago es una forma especializada de tejido conectivo, compuesto por células y componentes extracelulares. Las células, los condrocitos, están aislados en pequeños espacios de la abundante matriz extracelular, compuesta por fibras incluidas en una sustancia fundamental. Este tejido no posee vasos sanguíneos ni terminaciones nerviosas (salvo las articulaciones) y las células se nutren por difusión a través de la sustancia fundamental (27).

1.3.1.1. Histogénesis:

El cartílago se desarrolla a partir del mesénquima, a excepción de aquel presente en la cabeza, el cual es de origen ectodérmico debido a que evoluciona de las células que migran desde la cresta neural. Hacia la quinta semana de vida se distinguen zonas en las cuales las células del mesénquima se hacen más redondeadas y forman cúmulos celulares densos, denominados núcleos cartilaginosos o centros de condricificación (27).

Durante la diferenciación aumenta el tamaño de las células, que comienzan a secretar la sustancia fundamental metacromática y el tropocolágeno, que se polimeriza fuera de la célula para formar microfibrillas de colágeno. A medida que aumenta la cantidad de matriz, la consistencia del tejido se hace más elástica y firme, en el que las células se ubican en pequeños espacios denominados lagunas. Gradualmente las células se diferencian a condrocitos y al mismo tiempo se desarrolla, a

partir del mesénquima y alrededor del modelo cartilaginoso, una capa de células aplanadas y de fibras, el pericondrio que rodea al cartílago (27).

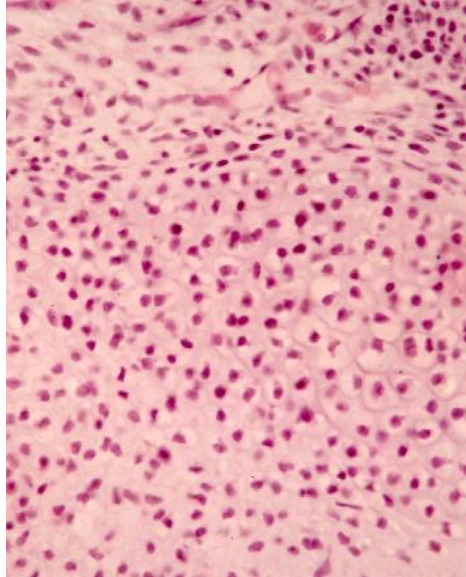


FIGURA 1.12. Cartílago embrionario.

Los condroblastos ya se han diferenciado a condrocitos que aparecen menos empaquetados que los condroblastos, debido a la presencia más abundante de matriz cartilaginosa (27).

En cuanto se formaron los primeros condrocitos se produce el crecimiento del cartílago, el que puede desarrollarse de dos formas:

a) Crecimiento intersticial: Ocurre en el centro de condricación, en el cual el cartílago crece por divisiones mitóticas de las células cartilaginosas ya diferenciadas, los condroblastos, e inmediatamente después de la mitosis las células hijas producen una delgada pared de matriz. Tras una nueva división de las células hijas se forma un pequeño grupo de cuatro células, que a su vez se pueden dividir. Cada uno de los pequeños grupos formados contiene células originadas por divisiones mitóticas a partir de un único condrocito, por lo que se denominan grupos isógenos (27).

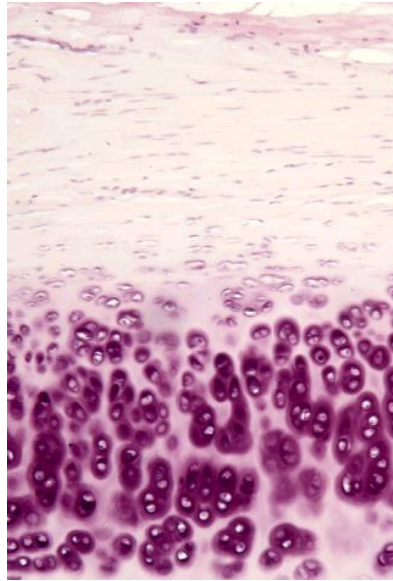


FIGURA 1.13. Cartílago Hialino Maduro. Corte teñido con hematoxilina – eosina x135 (27).

b) Crecimiento aposicional: Tiene lugar por diferenciación a condrocitos por varias células mesenquimáticas alrededor del cartílago en formación. Después de la formación del pericondrio tiene lugar la diferenciación de las células en el interior, en la denominada capa condrogénica. Durante toda la vida fetal y en el período de crecimiento de la infancia y pubertad, se produce un crecimiento aposicional continuo desde el pericondrio. Por lo tanto, las lagunas ubicadas inmediatamente por debajo del pericondrio contienen células cartilaginosas recién formadas (27).

1.3.1.2. Componentes del cartílago

a) Condrocitos: Los condrocitos vivos adoptan la forma de las lagunas que ocupan pero en los preparados observados con el microscopio óptico suelen estar contraídos por la deshidratación. Los condrocitos más inmaduros (condroblastos) cercanos al pericondrio se ubican en lagunas ovales, aplanadas en sentido paralelo a la superficie, mientras que los condrocitos maduros ubicados más en la profundidad del cartílago se ubican en lagunas más redondeadas. La forma de los núcleos también varía dependiendo del nivel de maduración de los condrocitos. El citoplasma es basófilo en los condrocitos inmaduros. Durante el proceso de diferenciación a condrocito maduro, la basofilia se torna gradualmente en acidofilia y se retrae el retículo endoplasmático rugoso. A

menudo que los condrocitos maduros contienen cantidades importantes de gránulos de glucógeno y gotas pequeñas de lípido (27).

b) Matriz cartilaginosa: En los preparados teñidos con HE la matriz es acidófila cerca del pericondrio (en la zona de los condrocitos inmaduros) pero se torna gradualmente más basófila a medida que se penetra en la profundidad del cartílago, al mismo tiempo que las lagunas se hacen más ovals. Se observa una basofilia muy marcada alrededor de cada grupo isógeno, denominada matriz territorial (27).

La sustancia fundamental adopta una coloración metacromática intensa. En su mayor parte se compone de proteoglucanos, cuyos glucosaminoglucanos principales son condroitinsulfatos y queratansulfato. La basofilia se debe a los grupos sulfato muy ácidos, y la notable basofilia de la matriz territorial se debe a mayor contenido de proteoglucanos sulfatados en esa zona. Los proteoglucanos también conforman agregados de proteoglucanos por unión con hialuronano (27).

En estado fresco, la matriz contiene alrededor del 75% de agua bajo la forma de un gel coloidal firme y el cartílago se nutre por difusión de nutrientes y gases a través de la fase acuosa de este gel (27).

El colágeno representa más del 40% del peso seco de la matriz cartilaginosa, el cual en su mayor parte es colágeno de tipo II. Las fibrillas son muy delgadas y forman un reticulado especialmente denso alrededor de las lagunas. También hay pequeñas cantidades de tipos más raros de colágeno (tipos IX, X y XI), que se entretrejen al reticulado de fibrillas de colágeno tipo II, con lo cual éste se estabiliza (27).

Los condrocitos también sintetizan moléculas de adhesión celular, de las cuales la mejor estudiada es la condronectina. Es una glucoproteína del mismo tipo que la fibronectina y fija a los condrocitos al colágeno tipo II, para lo que la condronectina tiene sitios de unión específicos (27).

1.3.1.3. Tipos de cartílago

a) **Cartílago Hialino:** En estado fresco, tiene aspecto vidrioso azulado y es el más abundante. En el individuo adulto aparece en los cartílagos costales, como parte del esqueleto nasal, en la laringe, tráquea, bronquios y superficies articulares (27).

b) **Cartílago Elástico:** Aparece formando parte del cartílago de la epiglotis, del cartílago corniculado y cuneiforme en la laringe, en el oído externo y en las paredes del conducto auditivo externo y la trompa de Eustaquio. A simple vista es amarillento y presenta mayor elasticidad y flexibilidad que el cartílago hialino (27).

Desde el punto de vista histológico la matriz presenta un entretejido denso de finas fibras elásticas, que son basófilas en los cortes teñidos con HE y se tiñen con colorantes selectivos, como la orceína. Las fibras elásticas son muy densas alrededor de las lagunas (27).

Al igual que en el cartílago hialino, el colágeno es, en su mayor parte, de tipo II (27).

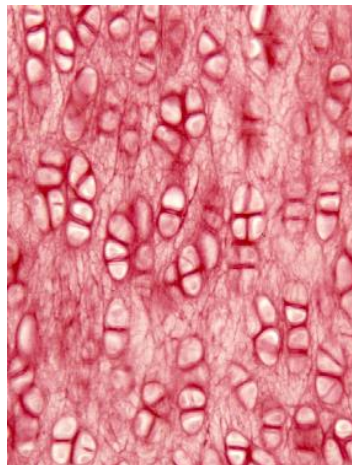


FIGURA 1.14. Cartílago Elástico de la epiglotis. Corte teñido con orceína x165 (27).

c) **Cartílago Fibroso:** Es una forma de transición entre el tejido conectivo denso y el cartílago hialino, dado que se compone de una combinación de fibras densas de colágeno y de células cartilaginosas ubicadas en lagunas y rodeadas por cantidades variables de matriz hialina. Las cantidades relativas de fibras de colágeno, células cartilaginosas y matriz hialina son muy variables. A menudo las células cartilaginosas se disponen en hileras entre las que se encuentran densos haces ondulantes de fibras de colágeno tipo I y carece de pericondrio (27).

El fibrocartilago se encuentra en relación con ciertas articulaciones, en los discos intervertebrales, en el cartilago articular de algunas articulaciones (discos articulares y meniscos), en los sitios de inserción de los ligamentos y tendones (27).

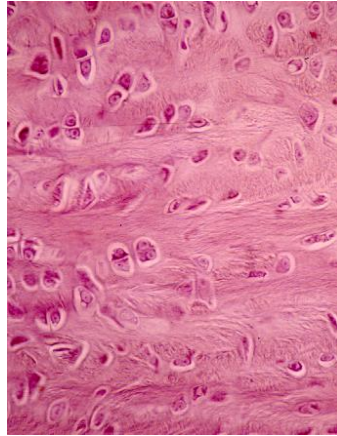


FIGURA 1.15. Cartilago Fibroso de un disco intervertebral. Tinción con HE. x275 (27).

1.2.2 Tejido óseo

El tejido óseo representa es una forma especializada de tejido conectivo denso en el que los componentes extracelulares sufren calcificación, lo que les confiere dureza (27)

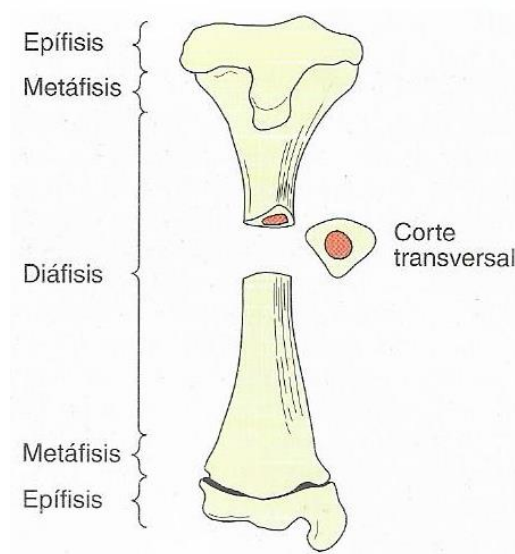


FIGURA 1.16. Dibujo esquemático de las distintas partes de un hueso largo típico (tibia) (27).

1.3.2.1 Organización macroscópica del tejido óseo

Desde el punto de vista macroscópico, el tejido óseo se organiza en los huesos de dos formas diferentes (27)

a) Tejido óseo esponjoso: Sustancia esponjosa o hueso trabecular que está compuesto por trabéculas, que son finos listones u hojas que se entrecruzan en distintas direcciones y forman un reticulado esponjoso, cuyos espacios huecos intercomunicantes están ocupados por la médula ósea (27).

b) Tejido óseo compacto: Sustancia compacta o hueso cortical que forma una masa compacta sin espacios visibles a simple vista (27).

Casi todos los huesos se componen de tejido óseo cortical y trabecular, aunque en cantidad y distribución muy variable de ambos tipos. Por ejemplo, en los huesos largos como el húmero y la tibia, la diáfisis se compone de tejido óseo compacto que, al igual que un tubo de paredes gruesas rodea el espacio medular. Por el contrario, los extremos de los huesos largos o epífisis se componen casi exclusivamente de tejido óseo esponjoso, que sólo en la parte más externa se transforma en una fina capa de tejido óseo compacto. Las superficies articulares están recubiertas por una capa de cartílago hialino (cartílago articular). El espacio medular de la diáfisis se comunica con los espacios de la sustancia esponjosa de las epífisis. Durante el período de crecimiento la diáfisis está separada de cada epífisis por un disco de cartílago, el disco epifisiario, donde se produce el crecimiento longitudinal del hueso (27).

Además de las superficies recubiertas por cartílago, los huesos están rodeados por una capa de tejido conectivo denso, el periostio. Una delgada capa interior de tejido conectivo rico en células, el endostio, recubre el espacio medular y los espacios de la sustancia esponjosa (27).

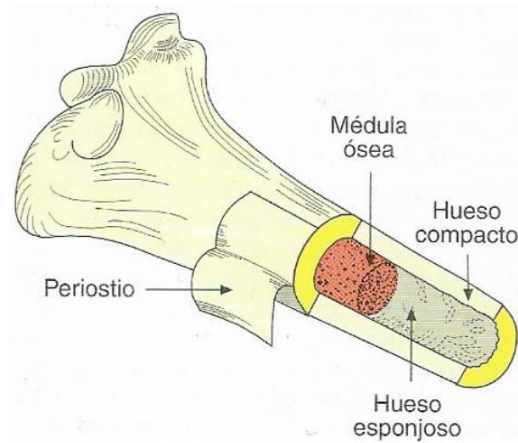


FIGURA 1.17. Dibujo esquemático de la estructura macroscópica de un hueso largo (27).

1.3.2.2. Características histológicas del tejido óseo

La preparación de cortes histológicos de tejido óseo presenta algunas dificultades debido a su dureza. El método clásico consiste en cortar discos de hueso tan delgados como sea posible y luego lijarlos hasta hacerlos tan finos que permitan el pasaje de la luz del microscopio, lo que se conoce como preparados lijados o “por desgaste”. Otro método consiste en descalcificar el tejido óseo y luego prepararlos como cualquier tejido (27).

En un preparado lijado el hueso compacto aparece compuesto en su mayor parte por matriz ósea que forma capas o láminas de unos 3 μm de espesor. Las células óseas u osteocitos se ubican en pequeños espacios alargados, las lagunas, en las láminas. Los osteocitos poseen numerosas prolongaciones finas que pasan a canales estrechos, denominados canalículos, los cuales desembocan perpendicularmente en las lagunas y se anastomosan con los canalículos de las lagunas vecinas y con canales ricos en vasos sanguíneos del tejido óseo. De este modo, los osteocitos pueden cambiar sustancias por difusión a través de la escasa cantidad de líquido tisular que rodea las prolongaciones en los canalículos (27).

En el hueso compacto, la mayor parte de las láminas están dispuestas de forma concéntrica alrededor de canales longitudinales del hueso denominados conductos de Havers, por lo que se forman los sistemas de Havers u osteonas corticales. Cada conducto de Havers contiene 1 o 2 capilares, además de vasos linfáticos, fibras nerviosas y tejido conectivo. Una osteona cortical típica tiene unas 15 láminas, que en un corte transversal se visualizan como anillos concéntricos

que rodean el conducto de Havers. Los osteocitos correspondientes se disponen de manera semejante. Las láminas se componen de fibras de colágeno que transcurren en paralelo en cada lámina pero con diferente dirección de fibras para láminas vecinas (27). Cada osteona cortical forma un cilindro longitudinal en el tejido óseo alrededor de las cuales también se encuentran las denominadas láminas intersticiales. Que son restos de osteonas degradadas. Por último, justo por debajo del periostio y el endostio, respectivamente, se encuentra una delgada capa de láminas basales externa e interna que transcurren paralelas a la superficie externa e interna de la diáfisis (27).

En los sitios donde se encuentran los distintos sistemas laminares hay límites netos denominados líneas de cemento, que sólo contienen escasas fibras de colágeno no calcificadas (27).

Otro sistema de canales conductores de vasos, los conductos de Volkmann, comunican los sistemas de Havers entre sí y con las superficies externa e interna del hueso. Los conductos de Volkmann atraviesan el tejido óseo en sentido casi transversal y no están rodeados de láminas ordenadas en forma concéntrica. Por medio de estos conductos los vasos de los conductos de Havers se comunican con los vasos del periostio y endostio (27).

El tejido óseo trabecular también está compuesto por láminas pero carece de conductos de Havers, de Volkmann y de vasos sanguíneos. El elemento básico estructural del tejido óseo trabecular es la osteona trabecular, que tiene la forma de un disco plano formado de 20 láminas de transcurso paralelo a la superficie del disco. El espesor de las trabéculas varía entre 10 y 400 μm dependiendo del peso que deba soportar cada hueso. Las trabéculas más delgadas están compuestas por una única osteona trabecular, con ambas superficies ubicadas hacia el espacio medular recubiertas por endostio, mientras que las trabéculas más gruesas se componen de varias osteonas trabeculares con líneas de cemento intermedias (27).

La nutrición de los osteocitos se produce por difusión desde la superficie cubierta por endostio a través de los canalículos comunicantes (27).

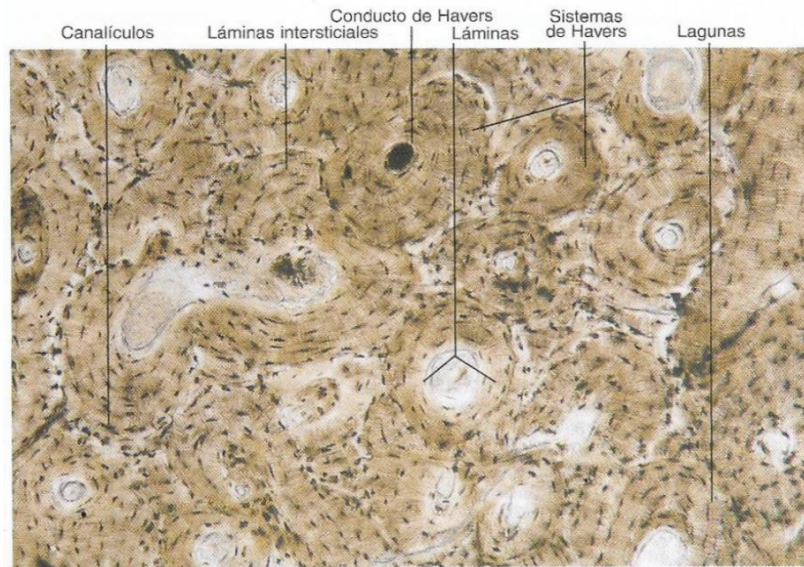


FIGURA 1.18. Preparado por desgaste de tejido óseo compacto x110 (27).

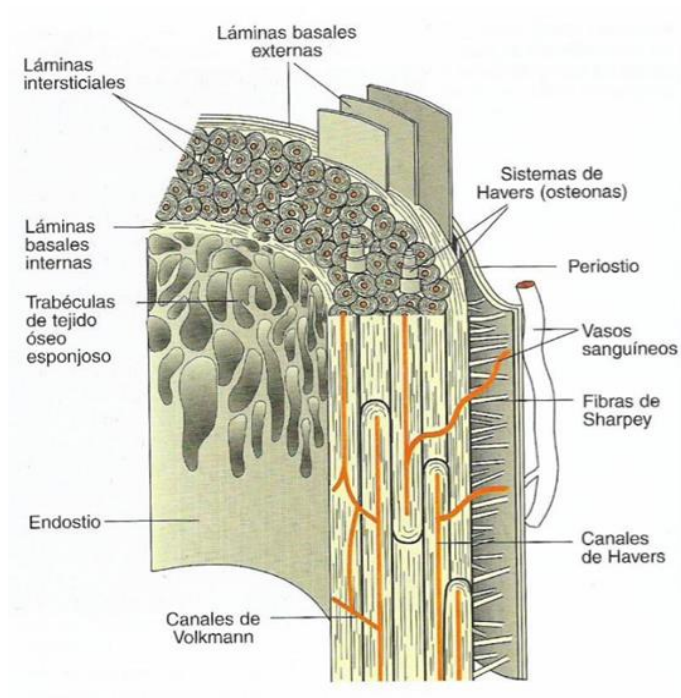


FIGURA 1.19. Dibujo esquemático de una parte de la diáfisis de un hueso largo (27).

a) Matriz ósea: se compone de una matriz orgánica y sales inorgánicas. La matriz orgánica está formada por fibras de colágeno incluidas en una sustancia fundamental. En adultos, el colágeno representa alrededor del 90% de la matriz orgánica, por lo que la matriz ósea es eosinófila. La dureza y la resistencia a la compresión del tejido óseo se deben al contenido de sales inorgánicas, mientras que sus propiedades elásticas y resistencia a la tracción dependen del colágeno (27).

b) Sustancia fundamental: Está compuesta por proteoglicanos, especialmente por condroitinsulfato y pequeñas cantidades de ácido hialurónico, por proteínas como la osteocalcina. La osteocalcina es producida por los osteoblastos depende de la vitamina K. Se une a la hidroxiapatita, por lo que es posible que tenga importancia para el proceso de calcificación y su producción es estimulada por 1,25 – dihidroxicolecalciferol (forma activa de la vitamina D). Los osteoblastos también secretan osteonectina y osteopontina, la osteonectina, una glucoproteína adhesiva del mismo tipo que la fibronectina y la condronectina. La cual se une a las superficies celulares y a los componentes de la matriz, en especial la hidroxiapatita y la osteopontina, es otra glucoproteína y posee propiedades similares a la fibronectina (27).

c) Colágeno: Las fibras de colágeno del tejido óseo se componen fundamentalmente por colágeno tipo I, el mismo tipo general del tejido conectivo (27).

d) Sales minerales: Son los componentes inorgánicos del tejido óseo y consisten en su mayor parte de depósitos de sales de fosfato y de calcio cristalino (también hay una pequeña cantidad de fosfato de calcio amorfo). Los cristales son casi idénticos a los del mineral hidroxiapatita, con fórmula general $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ y poseen forma de varas finas, de unos 3 nm de espesor y hasta 60 nm de largo dispuestos en paralelo, en relación estrecha con las fibras de colágeno (27).

Además del fosfato de calcio, el mineral de los huesos contiene numerosos iones diferentes, entre ellos magnesio, potasio, sodio, carbonato y citrato (27).

e) **Células óseas:** Existen 5 tipos de células óseas, las células osteoprogenitoras, los osteoblastos, los osteocitos, las células de recubrimiento óseo y los osteoclastos (27).

- *Células Osteoprogenitoras:* Se diferencian de la células mesenquimáticas más primitivas, las CFU-F (fibroblast colony forming unit). Se asemejan a los fibroblastos, poseen núcleos ovales claros y citoplasma claro con bordes irregulares (27).

Durante la formación del hueso las células osteoprogenitoras se dividen y desarrollan a células formadoras de hueso u osteoblastos (27).

- *Osteoblastos:* Son células formadoras de hueso, sintetizan y secretan la matriz ósea orgánica (fibras de colágeno, proteogucanos, osteopontina, osteocalcina y osteonectina). En las zonas de formación de hueso a menudo los osteoblastos forman una capa semejante a un epitelio de células cúbicas sobre la superficie del tejido óseo recién formado. Están en contacto entre sí mediante prolongaciones delgadas unidas por nexos. El núcleo suele estar localizado en la porción de la célula orientada en dirección opuesta al hueso recién formado. El citoplasma es muy basófilo y contiene una gran cantidad de fosfatasa alcalina demostrable por métodos histoquímicos (27).

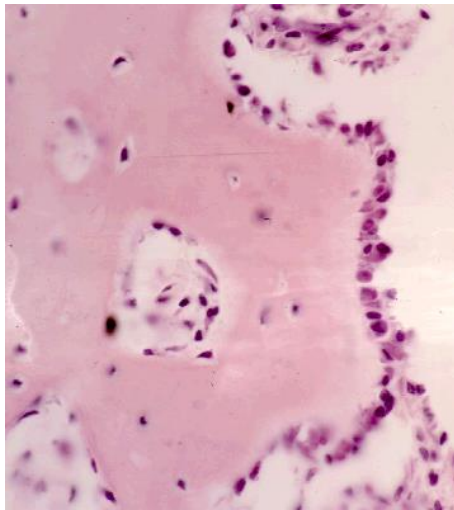


FIGURA 1.20. Centro de primario de osificación. Tinción con HE x440 (27).

- *Osteocitos:* Se originan a partir de osteoblastos que quedan atrapados en la matriz ósea recién formada durante el proceso de formación del hueso. La transformación se caracteriza por una degradación paulatina del retículo endoplasmático rugoso y del aparato de Golgi (27).

- *Células de recubrimiento óseo (osteocitos de superficie)*: Se originan a partir de osteoblastos que han finalizado la formación de hueso y recubren como una capa de epitelio simple todas las superficies óseas internas y externas en las que no hay actividad de osteoblastos u osteoclastos. En consecuencia, están mucho más dispersa en el individuo adulto (27).

- *Osteoclastos*: Son las células que degradan el hueso. Son células gigantes, multinucleadas de tamaño y forma muy variable. Por lo general contienen entre 5 y 10 núcleo pero puede haber hasta 50 en una única célula. El citoplasma de los osteoclastos jóvenes es algo basófilo pero después se torna acidófilo y contiene varios complejos de Golgi, numerosas mitocondrias y suele estar muy vacuolado (27).

A menudo se localizan en cavidades de la superficie del hueso, denominadas lagunas de Howship y en la superficie orientada hacia el tejido óseo resorbido por los osteoclastos se distingue un rayado radial irregular (27).

1.2.3 Médula ósea

La médula ósea es un tejido conectivo especializado. Aparece en el feto en el segundo mes de vida intrauterina, cuando los primeros huesos comienzan a osificarse, y después se desarrolla en los demás huesos, a medida que estos se forman. La médula ósea toma a su cargo gradualmente la función formadora de la sangre que tenía el hígado y es el principal tejido hematopoyético de la última mitad de la vida fetal y del resto de la vida (27).

1.3.3.1. Aspecto macroscópico de la médula ósea

A simple vista, la médula ósea aparece roja o amarilla. La médula ósea roja tiene actividad hematopoyética y el color se debe al contenido de eritrocitos y los estadios previos ricos en hemoglobina. La médula ósea amarilla casi no tiene actividad hematopoyética y hay predominio de adipocitos, que le confieren la tonalidad amarilla. Los dos tipos pueden transformarse entre sí, según las necesidades. En los recién nacidos y en niños pequeños toda la médula ósea es roja, pero a partir de los 5 – 6 años se comienza a transformar en médula ósea amarilla en los extremos de los huesos largos. Esta transformación continúa hasta que en la edad adulta sólo se encuentra médula ósea roja en el esqueleto axial (27).

1.3.3.2. Características histológicas de la médula ósea

Se caracteriza por estar dividida en un compartimiento hematopoyético, que forma columnas o cuñas irregulares entre los vasos. En la médula ósea roja, el compartimiento hematopoyético está ocupado casi en su totalidad por células hematopoyéticas, incluidas en el escaso tejido conectivo reticulado, denominado estroma de la médula ósea. En la porción central de la médula, alrededor de los grandes vasos se observa gran cantidad de grasa, dado que la hematopoyesis es más activa en la periferia. En la médula ósea amarilla la grasa ocupa casi todo el compartimiento hematopoyético, donde sólo se distinguen algunos megacariocitos (27).

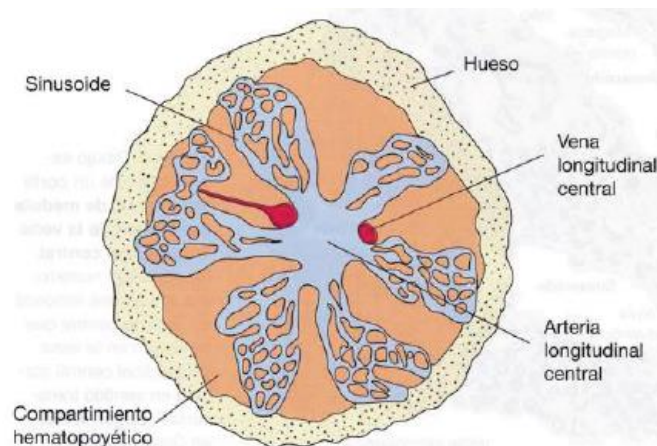


FIGURA 1.21. Esquema de un corte transversal de una médula ósea (27).

a) Compartimiento vascular de la médula ósea: Forma un esqueleto estructural en la médula. En un hueso largo típico, la médula está irrigada por un único vaso grande, la arteria nutricia, que recorre el hueso compacto en la mitad de la diáfisis. Dentro de la médula, la arteria nutricia se divide en dos ramas, cada una de las cuales se dirige a su lado de la diáfisis, en el centro de la médula; reciben el nombre de arterias longitudinales centrales. Desde las arterias centrales de transcurso longitudinal se emiten ramas radicales que transcurren hacia la periferia de la médula, donde forman capilares. Los capilares se vacían en sinusoides, que son grandes vasos de paredes delgadas, que se anastomosan intensamente entre sí en la periferia de la médula ósea y envían

prolongaciones hacia el centro. Aquí se vacían en una vena longitudinal central, que sigue el sistema arterial hacia el exterior de la médula ósea (27).

b) Estructura de los sinusoides: El intercambio de componentes entre la médula ósea y la circulación sólo tiene lugar a través de la pared de los sinusoides, que puede estar compuesta por tres capas: el endotelio, una capa de sustancia basal y una capa de células reticulares adventicias, pero sólo el endotelio es constante (27).

- *Endotelio:* Es delgado y forma un epitelio simple plano, como en casi todo el resto del sistema vascular, donde las células están intercomunicadas mediante complejos de contacto (27).

- *Capa inconstante de material semejante a la sustancia basal:* Separa el endotelio de las células reticulares adventicias circundantes. Rara vez esta capa tiene carácter de verdadera membrana basal (27).

- *Células reticulares adventicias:* En condiciones normales, recubren casi la mitad de la superficie externa de la pared de sinusoide. Sus prolongaciones citoplasmáticas delgadas se pueden extender hacia la profundidad del compartimiento hematopoyético, donde forma un reticulado anastomosado, suplido con finas fibras reticulares producidas por las células reticulares. Se cree que son contráctiles, dado que cuando aumenta la liberación de células desde la médula ósea hacia la sangre cubren una parte menor de la superficie externa de la pared. De esta manera aumenta la probabilidad del pasaje transendotelial. Las células reticulares adventicias se pueden transformar en células adiposas típicas. Cuando esto se hace muy manifiesto, la médula roja se transforma en amarilla (27).

El pasaje transendotelial de células maduras desde el compartimiento hematopoyético a la luz del sinusoide tiene lugar directamente a través de la célula endotelial, donde en sitios más aplanados se forma un poro de migración transitorio, que nunca supera los 4 µm de diámetro y desaparece en cuanto pasó la célula sanguínea (27).

c) Compartimiento hematopoyético de la médula ósea: Es el espacio entre los sinusoides, que está ocupado por células hematopoyéticas y por un estroma de la médula ósea compuesta por células y matriz extracelular. Las células del estroma incluyen células reticulares (en su mayor parte son

células reticulares adventicias), que forman fibras reticulares, además de macrófagos y adipocitos, que en apariencia se forman por acumulación de grasa en las células reticulares adventicias. La matriz extracelular se compone de fibras reticulares, proteoglicanos y glucoproteínas de adhesión, entre ellas fibronectina y laminina (27).

1.4 ARGUMENTACIÓN DEL PROBLEMA

Durante los últimos años, los recientes avances en los métodos de evaluación y diagnóstico, así como los progresos en el tratamiento tumores malignos han repercutido en una mejora en la expectativa de vida de los pacientes. Sin embargo, como aspecto negativo, se presenta un aumento paralelo de las metástasis óseas. Un 75% de los pacientes que fallecen por cáncer presentan metástasis óseas al momento de su muerte. Esto supone una amenaza para la calidad de vida del paciente y un reto para oncólogos y ortopedas, quienes en conjunto buscan paliar los efectos negativos de esta complicación (34,35).

Actualmente en España, aproximadamente el 30% de los nuevos casos de cáncer corresponden a localizaciones primarias con gran predisposición a metastatizar en hueso, dentro de los cuales se encuentra el cáncer de pulmón, mama, próstata, riñón y tiroides (34).

Ante este panorama se requiere un diagnóstico urgente del tumor metastásico, ya que el resultado de la biopsia del tejido afectado define el pronóstico y tratamiento de dicha complicación.

Lo mismo sucede en el estudio de muestras óseas en niños, en las cuales puede evidenciarse patologías como el sarcoma de Ewing, osteosarcomas, leucemia aguda, entre otros. En estos casos el diagnóstico es requerido de forma urgente, con el fin de entregar rápidamente la información al médico tratante y, con ello, disminuir la mortalidad y mejorar la oportunidad en el diagnóstico y tratamiento de los niños afectados (36).

Para realizar el diagnóstico de las patologías mencionadas anteriormente es necesario efectuar una biopsia de tejido óseo, la cual debe procesarse para permitir la obtención de un corte histológico que posteriormente será analizado y diagnosticado por el médico patólogo. Una de las etapas de dicho procesamiento es la descalcificación, la cual consiste en la remoción de las sales de calcio que endurecen el tejido para permitir su corte en el micrótopo.

La descalcificación de tejidos es un procedimiento sumamente extenso, se completa normalmente en 1 – 20 días, dependiendo del tamaño, el tipo de hueso, y al tipo y concentración del agente descalcificante (2,4,5), lo cual se manifiesta en un retraso en la entrega del diagnóstico, lo que conlleva un mayor tiempo de espera para los pacientes y su posterior tratamiento.

Actualmente en Chile no existen estudios que entreguen un protocolo estandarizado para descalcificación en microondas KOS con el líquido descalcificador Ana Morse.

Además, se requiere un método que permita evitar la exposición del operador a los gases tóxicos producidos por los agentes descalcificantes, un control constante de la temperatura y agitación para resguardar la integridad de la histoarquitectura de la muestra.

CAPÍTULO 2 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

2.1 OBJETIVO GENERAL

Comparar el resultado final de la descalcificación convencional y microondas KOS con el líquido descalcificador de Ana – Morse, a través del corte, tinción de rutina, tinción especial Tricrómica de Masson y técnica histoquímica de Von Kossa, en huesos largos de Rata Sprague Dawley.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar la eficacia de la descalcificación entre el método convencional y mediante el microondas KOS.
- Comparar la calidad del corte histológico entre las muestras descalcificadas con el método convencional y en microondas KOS.
- Comparar la conservación de la morfología tisular luego de la descalcificación convencional y en microondas KOS.
- Comparar la calidad de la tinción de rutina (Hematoxilina – Eosina) entre los tejidos descalcificados en microondas KOS y el procedimiento de descalcificación convencional.
- Comparar la calidad de la tinción Tricrómica de Masson entre las muestras descalcificadas mediante el microondas KOS y a través del procedimiento convencional.
- Comparar el resultado de la técnica histoquímica de Von Kossa en las muestras descalcificadas en microondas KOS y el procedimiento convencional.

CAPÍTULO 3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDIO

Es un estudio de tipo descriptivo debido a que existe bibliografía asociada que nos permite identificar el vacío de conocimiento, además de reconocer las variables susceptibles a describir en nuestra investigación (37).

Asimismo, es experimental completo ya que el nivel de control de las fuentes que afectan su validez es alto (37).

3.2 POBLACIÓN

3.2.1 Población objetivo

A pesar de que el estudio fue realizado sobre Ratas Sprague Dawley, con esta investigación se buscó identificar los parámetros necesarios para la optimización de una técnica de procesamiento para obtener un diagnóstico más oportuno, lo que beneficiaría a la población chilena que se somete a biopsias de tejidos calcificados.

3.2.2 Población en estudio

Ratas Sprague Dawley, donadas por el bioterio del laboratorio de investigación Bruno Günther de la Universidad de Valparaíso.

3.3 DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

Huesos largos de Ratas Sprague Dawley, donadas por el bioterio del laboratorio de investigación Bruno Günther de la Universidad de Valparaíso.

3.3.1 Tipo de muestreo

De tipo no probabilístico y de conveniencia pues no fueron escogidos aleatoriamente sino que han sido seleccionados directa e intencionalmente de acuerdo a las características de la investigación (37).

3.3.2 Criterios de inclusión y exclusión

- **Inclusión:** Ratas Sprague Dawley.
- **Exclusión:** Para este estudio no se anticipan criterios de exclusión.

3.4 VARIABLES EN ESTUDIO**3.4.1 Variables principales**

1. Tiempo de descalcificación
3. Temperatura de descalcificación
2. Grado de descalcificación

3.4.2 Variables secundarias

1. Morfología tisular
2. Calidad de la Coloración

3.4.3. Definición conceptual

a) **Tiempo de descalcificación:** Tiempos durante los cuales la muestra se someterá a desmineralización con la solución de Ana – Morse, en microondas KOS y en descalcificación convencional.

b) Temperatura de descalcificación: Temperaturas a las cuales será expuesto el tejido en la solución desmineralizadora en cada método de descalcificación empleado.

c) Grado de descalcificación: Nivel de descalcificación, es decir, dureza del tejido luego de la descalcificación en un determinado tiempo y temperatura.

d) Morfología tisular: Grado de modificación estructural que sufre el tejido luego de ser sometido a descalcificación en microondas KOS y procedimiento convencional.

e) Calidad de la coloración: Grado de afinidad del tejido por los colorantes de diversas tinciones.

3.4.4 Definición operacional

a) Tiempo de descalcificación: Planilla de registro de datos obtenidos en cada procesamiento

b) Temperatura de descalcificación: Planilla de registro de datos obtenidos en cada procesamiento

c) Grado de descalcificación: Planilla de registro de resultados obtenidos en la prueba química con hidróxido de sodio y oxalato de sodio.

d) Morfología tisular: Planilla de registro de resultados obtenidos en la visualización al microscopio de luz

e) Calidad de la coloración: Planilla de registro de resultados obtenidos en la visualización al microscopio de luz

3.5 PROCEDIMIENTOS Y ACTIVIDADES

3.5.1. Obtención de las muestras

Se recibieron 7 ratas Sprague Dawley en hielo, donadas del bioterio del laboratorio de investigación Bruno Günther de la Universidad de Valparaíso, las cuales fueron sacrificadas bajo las normas de bioéticas para el trabajo con animales de experimentación de la misma, cumpliendo con la norma de las 3R (reducir, reciclar y reutilizar), siendo sedadas con Halotano (con una dosis en relación al peso) y posteriormente decapitadas con una guillotina.

Luego se procedió a separar las extremidades del cuerpo y a remover el músculo hasta dejar descubierto el hueso en todas las patas.



FIGURA 3.1 Ratas Sprague Dawley

3.5.2 Fijación

Luego de separar las extremidades y quitarles la piel, se procedió a la fijación de las muestras. El líquido fijador utilizado fue Formaldehído tamponado al 10% y el tiempo de fijación fue de 2 semanas con recambio del líquido fijador.

3.5.3 Macroscopía de las muestras

Se seleccionaron y midieron 15 huesos largos de Ratas Sprague Dawley, obteniendo un promedio de 5,24 cm.

TABLA 3.1. Largo de las muestras de huesos largos

Muestra	Largo (cm)
1	5,5
2	5
3	5,4
4	5,3
5	5,4
6	5,1
7	5,3
8	5,6
9	4,9
10	5,3
11	4,6
12	4,6
13	5,7
14	5,5
15	5,4

Posteriormente, cada hueso fue dividido a la mitad, destinando de manera aleatoria una de las mitades a la descalcificación convencional y la otra a la descalcificación en el microondas KOS, siendo encasetas y rotuladas con el número correspondiente a la muestra, seguida de una letra M o C, correspondiente a la descalcificación en microondas o convencional, respectivamente.



FIGURA 3.2. Medición de las muestras.

3.5.4 Descalcificación

Fue realizada mediante la solución de Ana Morse, la cual consiste en una solución de ácido fórmico con un tampón de citrato de sodio añadido, lo que le permite contrarrestar los efectos perjudiciales del ácido (5).



FIGURA 3.3. Muestras previo al lavado con agua corriente

Se procedió a realizar un lavado previo a la descalcificación con agua corriente durante 1 hora.

a) **Muestras para descalcificación microondas:** Se realizaron dos pruebas de tiempo y temperatura de descalcificación mediante Microondas KOS escogiendo el protocolo más adecuado para las muestras. Finalmente fueron descalcificadas en líquido descalcificador Ana – Morse en el horno microondas en ciclos de 2 horas a 50°C.

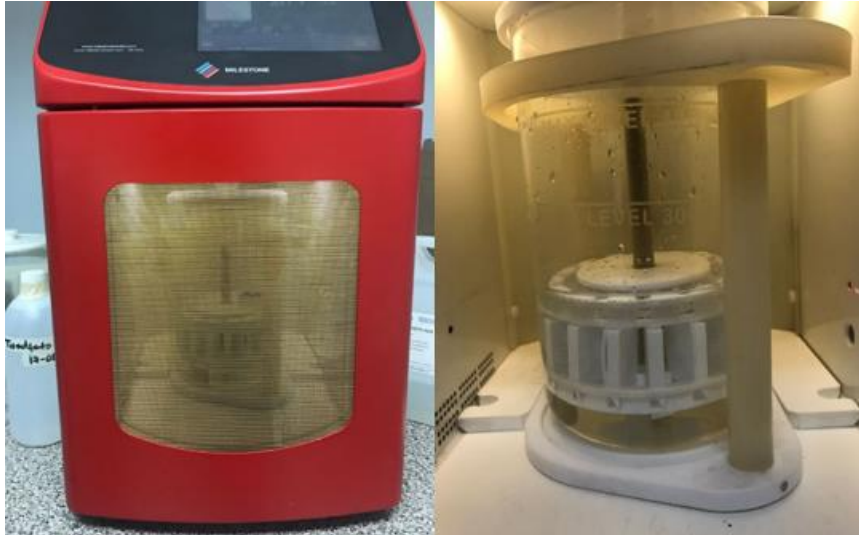


FIGURA 3.4. Muestras descalcificadas en microondas KOS.

b) **Muestras para descalcificación convencional:** Al igual que las muestras anteriores, estas fueron descalcificadas en Ana – Morse a través de descalcificación convencional, a temperatura ambiente y sin agitación.

La evaluación de la descalcificación para ambos procesamientos fue a través del método físico, con las manos y un bisturí.

3.5.5 Procesamiento de las muestras

Todas las muestras fueron procesadas de forma manual en dos grupos, de acuerdo al método de descalcificación empleado y en igualdad de condiciones para asegurar resultados confiables.

El protocolo aplicado para este procedimiento se presenta en la siguiente tabla:

TABLA 2. Protocolo de procesamiento de las muestras

Etapa del procesamiento	Solución utilizada	Tiempo
Deshidratación	Alcohol 70°	1 hora
	Alcohol 95°	1 hora
	Alcohol 95°	1 hora
	Alcohol 100°	1 hora
	Alcohol 100°	1 hora
Diafanización	Xilol	2 horas
	Xilol	2 horas
	Xilol	2 horas
Impregnación	Parafina semi dura	2 horas
	Parafina semi dura	2 horas
	Parafina semi dura	2 horas

3.5.5.1 Inclusión

Cada muestra fue incluida en moldes de tamaño mediano que permite el correcto posicionamiento de las muestras.



FIGURA 3.5. Inclusión de las muestras.

3.5.5.2 Obtención de cortes histológicos

De cada cassette se obtuvo un total de 4 cortes histológicos, alcanzando un total de 60 cortes. Cada uno de ellos fue rotulado de acuerdo al número de muestra, a la letra correspondiente al método de descalcificación utilizado y a la tinción empleada posteriormente.

3.5.5.3 Secado de los cortes

Los cortes fueron secados en una estufa a 60°C durante 60 minutos.

3.5.5.4 Tinción de los cortes

a) Tinción de Rutina (HE): Un corte de cada muestra fue teñido bajo este método. El cual permite evaluar la morfología general del tejido luego del procesamiento.

b) Tricrómico de Masson: Se sometió un corte de cada muestra a esta tinción tricrómica, esto permitió observar la conservación y la distribución de las fibras colágenas y musculares presentes en el tejido.

Como control, se utilizó un corte de piel, una muestra con calcificación distrófica y un corte de hueso descalcificado de forma convencional.

c) **Von Kossa:** Al igual que en los casos anteriores un corte de cada muestra fue tratado con esta técnica, la cual busca identificar los iones fosfato y carbonato a los cuales se encuentra asociado el calcio en los tejidos, y de este modo, identificar indirectamente el calcio presente en las muestras. Como control se utilizaron dos radiografías, correspondientes a las muestras descalcificadas sin desgastar y muestras óseas sin descalcificar, respectivamente.

3.5.5.5 Montaje

Las placas fueron montadas de forma manual utilizando un medio hidrófobo, posteriormente se dejaron secar a temperatura ambiente para luego ser visualizadas al microscopio óptico.

3.5.5.6 Análisis al Microscopio

Se dividieron las placas histológicas de acuerdo al método de descalcificación y tinción empleada y cada técnica fue evaluada por dos observadores ciegos, es decir, que no conocen el método de descalcificación ni el número de la muestra a evaluar.

3.6 ANÁLISIS DE DATOS

El análisis de los resultados obtenidos fue realizado en base a las tablas de recolección de datos a través del software IBM SPSS Statistics 21. Se realizaron los siguientes análisis estadísticos:

a) **Distribuciones de Frecuencia:** Tanto de frecuencia absoluta como de frecuencia porcentual. Esto nos permitirá evaluar con qué frecuencia obtenemos un determinado resultado y también saber cuánto se repiten y así comparar los resultados obtenidos de las muestras descalcificadas en microondas KOS con aquellas descalcificadas convencionalmente.

b) **Prueba exacta de Fisher:** Entrega un valor que se relaciona con la diferencia estadísticamente significativa entre un resultado y otro.

3.6.1 Evaluación del Procesamiento

3.6.1.1 Evaluación de la Descalcificación

Durante este proceso se evaluaron las variables de Tiempo de Descalcificación y Temperatura de descalcificación, escogiendo el valor de cada una necesario para la descalcificación óptima a la evaluación física, por lo que a partir de esta etapa su valor se mantuvo constante.

Para determinar si el procedimiento de la desmineralización está completo, existen diversas técnicas de confirmación. En este caso utilizamos el método de confirmación física.

- **Prueba Física:** Se realizó mecánicamente, comprobando la dureza del tejido con los dedos, una aguja, bisturí o cualquier elemento cortante.

Para estimar el período de recambio de la solución descalcificadora evaluamos el pH de ésta antes del procesamiento y después de finalizar cada ciclo, si el pH variaba 2 dígitos, entonces era necesario realizar el recambio.

Se probaron dos protocolos de descalcificación en Microondas KOS con diferentes tiempos y temperatura de cada ciclo.

3.6.2 Evaluación de la calidad de los cortes

Fue realizada por el operador, es decir, el responsable del corte de la totalidad de las muestras.

Para obtener resultados comparables establecimos criterios de evaluación de estos, dentro de los cuales se encuentran algunos artefactos de técnica como el grosor del corte y la presencia de arrugas y/o mellas. Dichos criterios son definidos en el apéndice C.1.

3.6.3 Evaluación de la Morfología Tisular

Fue llevada a cabo mediante la tinción de HE que permite evaluar la morfología de los tejidos, evaluada por dos observadores ciegos. Cada criterio se encuentra definido en el apéndice C.2.

3.6.4 Evaluación de la calidad de la coloración*3.6.4.1 Tinción de rutina Hematoxilina – Eosina*

Los evaluadores de cada técnica fueron dos observadores ciegos y cada criterio se encuentra definido en el apéndice C.3.1.

3.6.4.2 Tinción Tricrómica de Masson

Al igual que en la tinción anterior, los evaluadores de cada técnica fueron dos observadores ciegos y los criterios utilizados se encuentran descritos en el apéndice C.3.2.

3.6.4.3 Técnica de Von Kossa

Del mismo modo, los evaluadores de esta técnica fueron dos observadores ciegos y los criterios utilizados se encuentran descritos en el apéndice C.3.3.

CAPÍTULO 4 . RESULTADOS

Tal como se especifica en el capítulo 3, se trabajó con un total de 30 muestras de huesos largos de ratas Sprague Dawley, las cuales fueron destinadas en partes iguales a cada método de descalcificación.

A continuación, se describen los resultados obtenidos en la evaluación de cada parámetro contemplado en la investigación.

4.1 COMPARAR LA EFICACIA DE LA DESCALCIFICACIÓN ENTRE EL MÉTODO CONVENCIONAL Y MEDIANTE EL MICROONDAS KOS.

Tal como se describió anteriormente, la eficacia de la descalcificación se probó a través de dos parámetros, el primero fue el tiempo que tardó en completar la descalcificación y por último, el método de comprobación físico.

4.1.1 Descalcificación Convencional

El tiempo total de descalcificación para las muestras en procesamiento convencional fue de 3 semanas a la comprobación física de forma manual y con bisturí.

4.1.2 Descalcificación en microondas KOS

4.1.1.1 Descalcificación a 37°C en ciclos de 1 hora

Luego de completar 4 ciclos y realizar la comprobación física determinamos que las muestras no mostraban avance con respecto a la disminución de su dureza y al evaluar el pH de la solución éste se mantenía, estimamos necesario elevar la temperatura y el tiempo de duración de cada ciclo debido a que las únicas variables de las que dependía la disminución de la dureza del tejido eran el tiempo y la temperatura.

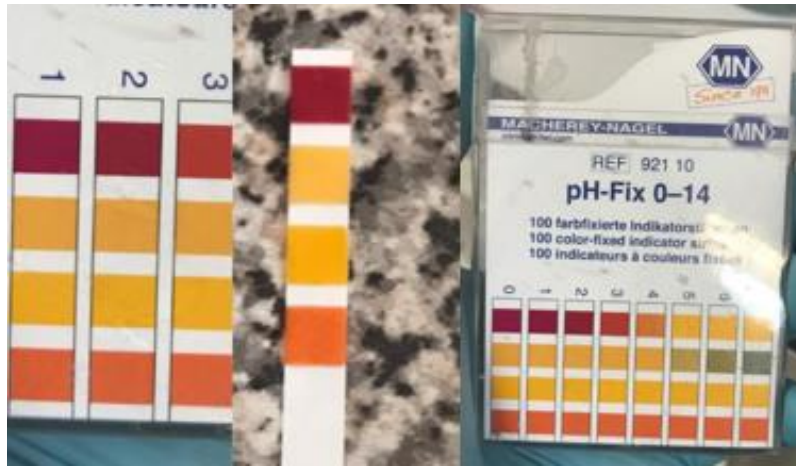


FIGURA 4.1. Evaluación del pH de la solución descalcificadora.

4.1.1.2 Descalcificación a 50°C en ciclos de 2 horas

Las muestras mostraron un avance en la descalcificación a partir del tercer ciclo, finalmente fueron necesarios un total de 7 ciclos para la descalcificación completa a la evaluación física de las muestras, completando un total de 14 horas de descalcificación.

4.2 COMPARAR LA CALIDAD DEL CORTE HISTOLÓGICO ENTRE LAS MUESTRA DESCALCIFICADAS CON EL MÉTODO CONVENCIONAL Y EN MICROONDAS KOS.

La calidad del corte histológico fue evaluada en base a la visualización de artefactos de técnica, descrito en profundidad en el apéndice C.1, los resultados de dicha evaluación se exponen en la siguiente tabla:

TABLA 4.1. Evaluación de la calidad del corte histológico.

Método de descal.	Calidad del corte histológico									
	Bueno		Satisfactorio		Insatisfactorio		No obtenido		Total	
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
Microondas	1	6,7%	9	60,0%	5	33,3%	0	0,0%	15	100,0%
Convencional	2	13,3%	10	66,7%	1	6,7%	2	13,3%	15	100,0%

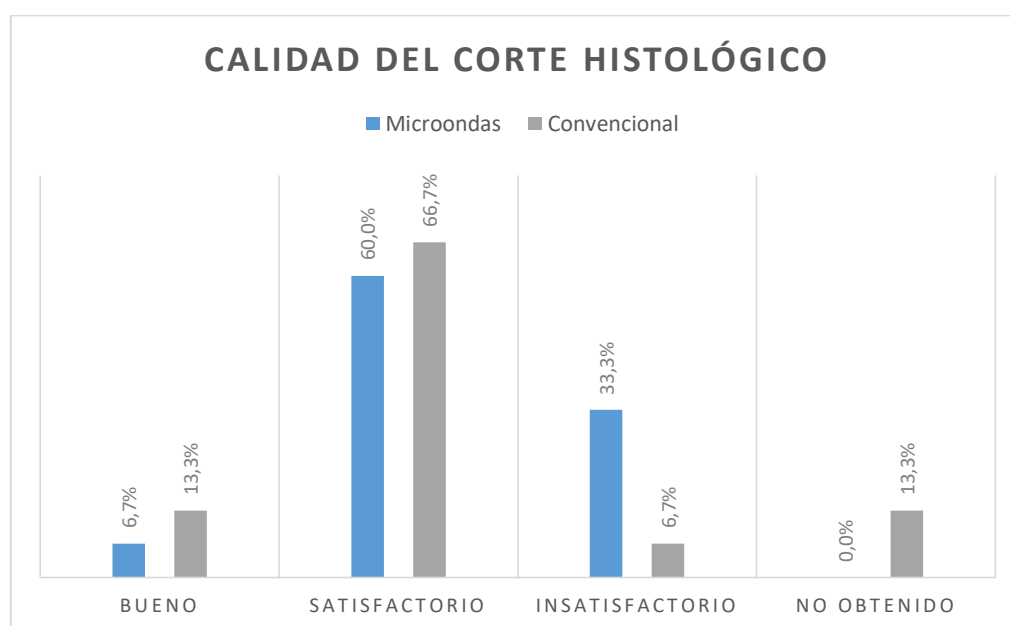


GRÁFICO 4.1. Calidad del corte histológico

Un 6,7% de los cortes de las muestras descalcificadas en microondas KOS y un 13,3% de las desmineralizadas con el método convencional fueron evaluados con una buena calidad de corte, lo que se define como un corte de grosor regular, sin arrugas ni mellas.

En segundo lugar, un 60% de los cortes de las muestras descalcificadas en microondas KOS y un 66,7% con el procedimiento convencional fueron evaluados como satisfactorio, definido como un corte de grosor regular, con arrugas o mellas que no afectan la visualización del tejido.

Luego, observamos que un 33,3% de los cortes de microondas KOS fue evaluado como insatisfactorio, mientras que un 6,7% de los cortes de muestras desmineralizadas de manera convencional fueron catalogados como insatisfactorios, el cual está definido como un corte de grosor irregular o con mellas y/o arrugas que afectan la visualización del tejido.

Finalmente, vemos que en dos casos, correspondientes al 13,3% de las muestras descalcificadas con el método convencional presentaban una resistencia al corte que, al ser piezas de volumen desigual en cada extremo de ellas, tendían a separarse en dos partes, una de ellas quedaba unida al taco y la otra se desprendía con el paso de la navaja. Al ser reincluídas en varias ocasiones el resultado seguía siendo el mismo, motivo por el cual fueron evaluadas bajo la categoría de “Corte no obtenido”.

El análisis estadístico de los resultados arrojó que no existen diferencias estadísticamente significativas entre la calidad del corte histológico de las muestras descalcificadas mediante el microondas KOS y aquellas desmineralizadas a través del método convencional (prueba exacta de Fisher= 0,195).

A continuación se presentan algunas microfotografías en las que se evidencian casos representativos de cada resultado obtenido.

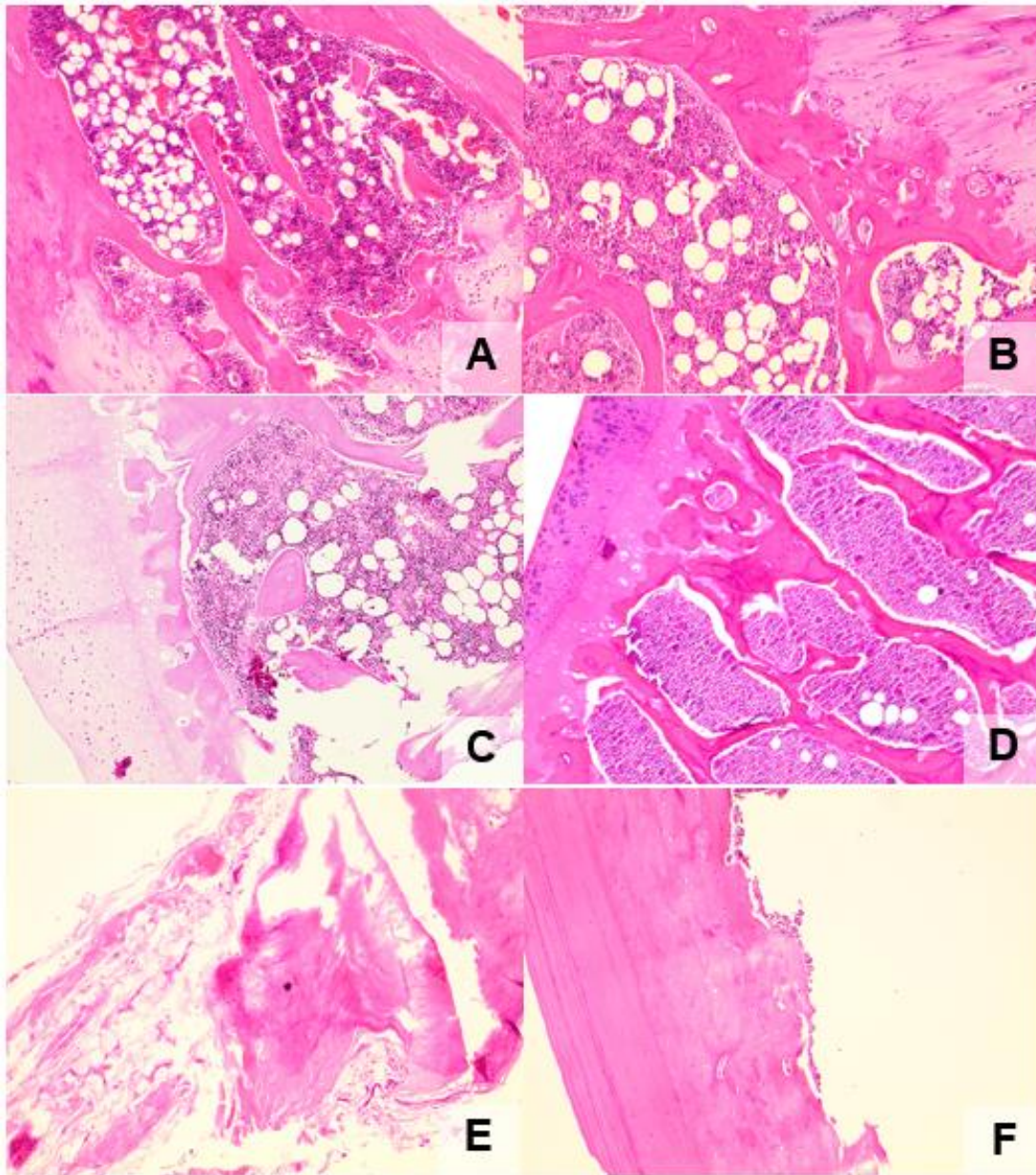


FIGURA 4.2. Calidad del corte histológico.

- A) Descalcificación KOS, calidad buena, 10x. B) Descalcificación convencional, calidad buena, 10x. C) Descalcificación KOS, calidad satisfactoria, 10x. D) Descalcificación convencional, calidad satisfactoria, 10x. E) Descalcificación KOS, calidad insatisfactoria, 10x. F) Descalcificación convencional, calidad insatisfactoria, 10x.*

4.3 MEDIR Y COMPARAR LA CONSERVACIÓN DE LA MORFOLOGÍA TISULAR LUEGO DE LA DESCALCIFICACIÓN CONVENCIONAL Y EN MICROONDAS KOS.

La calidad del tejido descalcificado fue medida a través de una pauta de evaluación, en base a la preservación de las estructuras tisulares, descrita en profundidad en el apéndice C.2.

Los resultados obtenidos se presentan en la siguiente tabla:

TABLA 4.2. Resultado evaluación morfología tisular.

Método de descal.	Morfología Tisular									
	Óptima		Moderada		Escasa		Nula		Total	
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
Microondas	3	20,0%	11	73,3%	1	6,7%	0	0,0%	15	100,0%
Convencional	2	15,4%	11	84,6%	0	0,0%	0	0,0%	13	100,0%

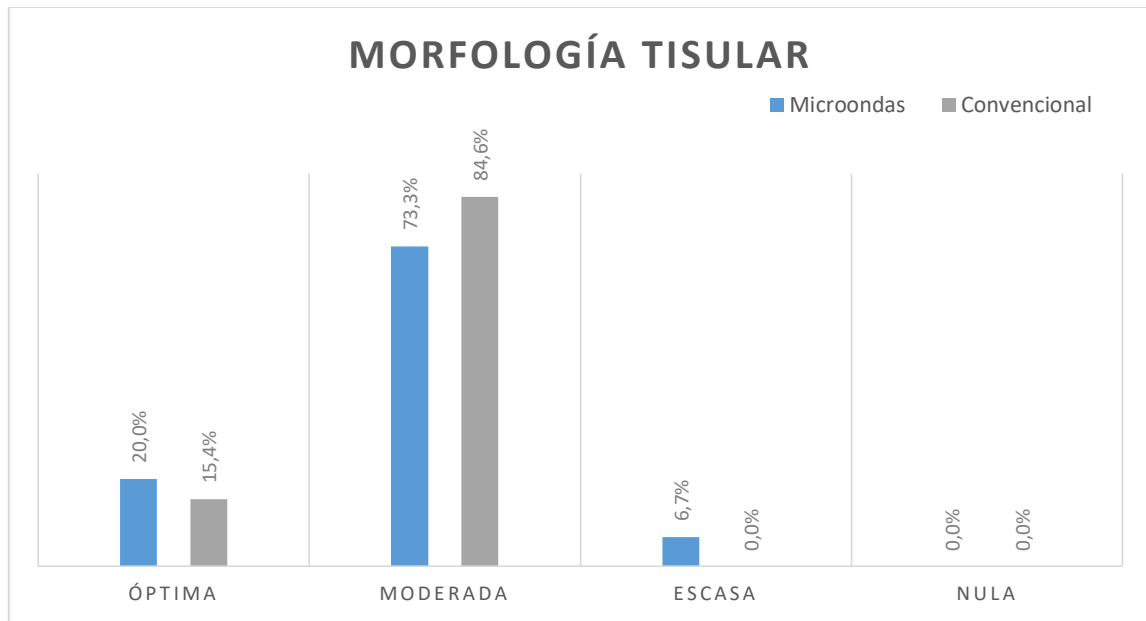


GRÁFICO 4.2. Conservación de la morfología tisular.

Tal como muestra el gráfico anterior, un 20% de las muestras descalcificadas en microondas KOS y un 15,4% con el método convencional fueron evaluadas con una óptima conservación de la morfología tisular.

Un 73,3% de las muestras desmineralizadas a través del microondas KOS y un 84,6% con el método convencional mostraron una conservación moderada de la morfología tisular.

Finalmente un 6,7% de las muestras descalcificadas con microondas KOS mostraron una escasa conservación de la morfología.

No se registró ningún caso con una nula conservación de la morfología tisular en ninguno de los dos métodos de descalcificación.

Luego de realizar el análisis estadístico de los resultados la evaluación de la morfología tisular se observó que no existen diferencias estadísticamente significativas entre cada tipo de descalcificación empleado en la investigación (prueba exacta de Fisher= 1,0).

A continuación se presentan las microfotografías que corresponden a los diferentes grados de conservación de morfología tisular observadas, de acuerdo a cada método de descalcificación.

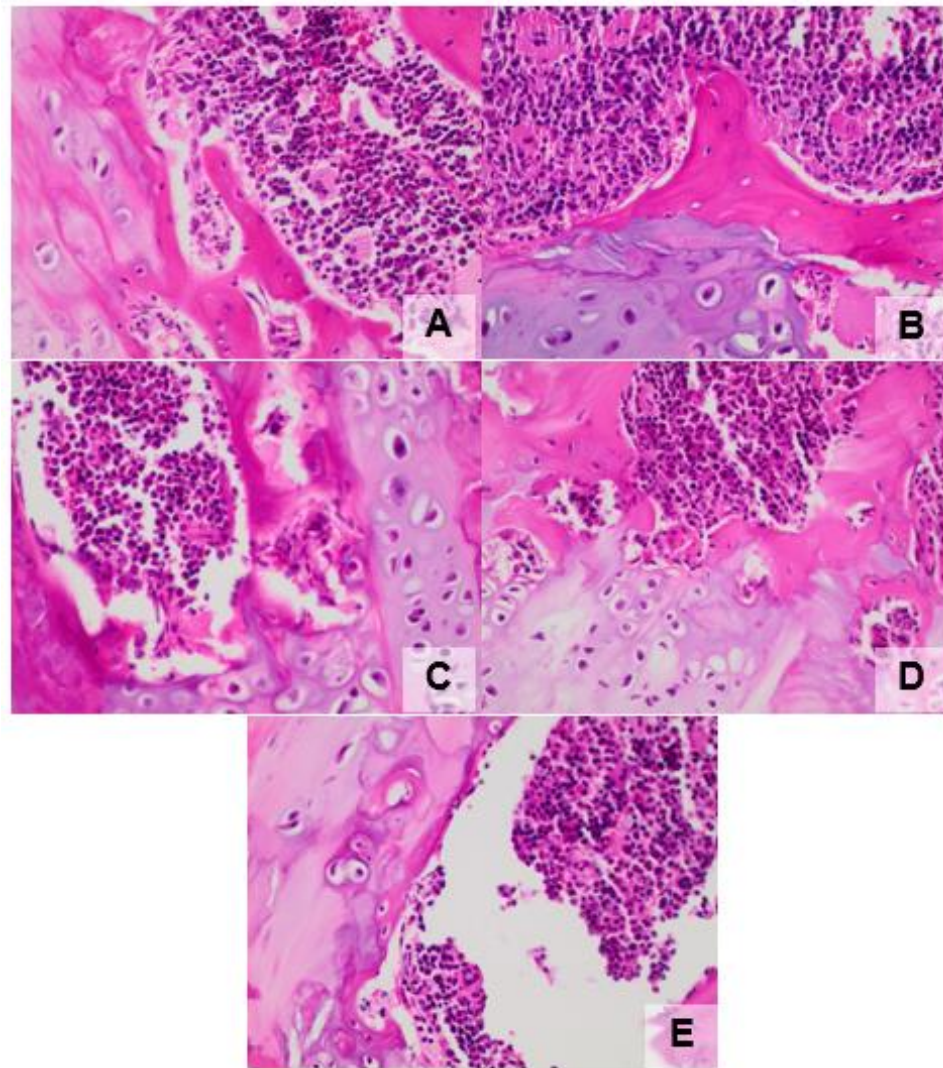


FIGURA 4.3. Conservación de la morfología tisular.

A) Descalcificación KOS, morfología óptima, 40x. B) Descalcificación convencional, morfología óptima, 40x. C) Descalcificación KOS, morfología moderada, 40x. D) Descalcificación convencional, morfología moderada, 40x. E) Descalcificación KOS, morfología escasa, 40x.

En este caso todas las muestras evaluadas presentaron al menos 4 de los 5 aspectos definidos en el apéndice antes mencionado; dentro de los cuales se encuentra la presencia de osteocitos y osteoblastos, visualización de conductos de havers y vascularización, identificación de médula ósea, núcleos preservados con detalle en la distribución de la cromatina y una buena diferenciación entre la matriz ósea y el osteoide.

4.4 COMPARAR LA CALIDAD DE LA TINCIÓN DE RUTINA (HEMATOXILINA – EOSINA) ENTRE LO TEJIDOS DESCALCIFICADOS EN MICROONDAS KOS Y EL PROCEDIMIENTO DE DESCALCIFICACIÓN CONVENCIONAL.

Fue evaluada de acuerdo a lo descrito en el apéndice C.3.1, cuyos resultados se presentan en la siguiente tabla:

TABLA 4.3. Resultados evaluación tinción de rutina (HE).

Método de descal.	Tinción de rutina (Hematoxilina – Eosina)											
	Óptima		Satisfactoria		Regular		Insatisfactoria		Escasa		Total	
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
Microondas	4	26,7	8	53,3	3	20	0	0,0	0	0,0	15	100,0
Convencional	3	23,1	5	38,5	5	38,5	0	0,0	0	0,0	13	100,0

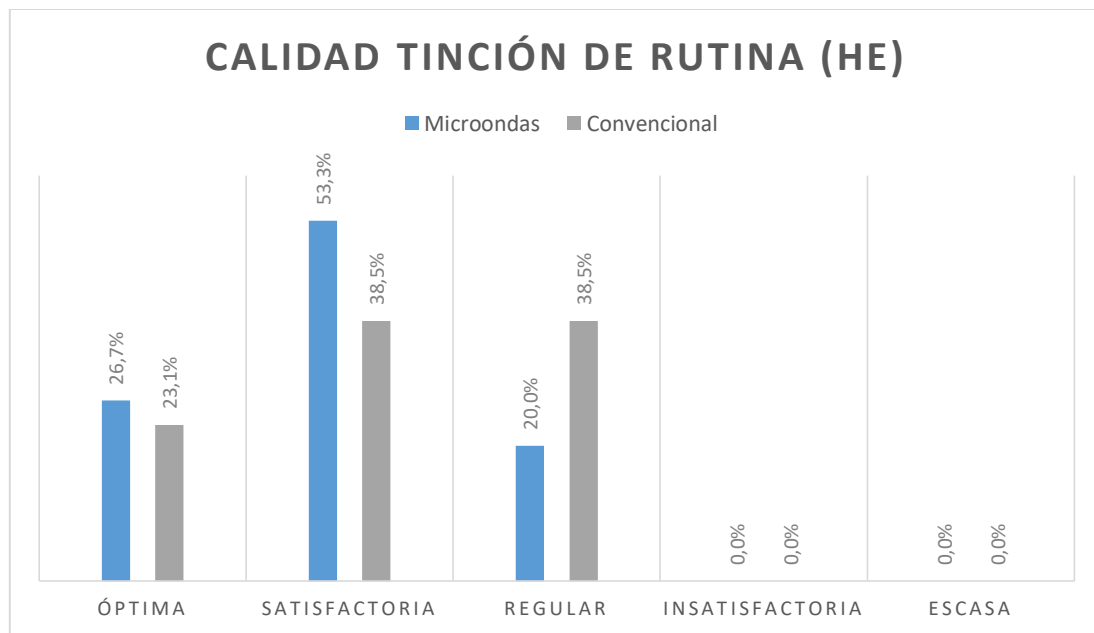


GRÁFICO 4.3. Calidad de la tinción de rutina, Hematoxilina – Eosina.

En primer lugar, se observa que un 26,7% de las muestras descalcificadas en microondas KOS y un 23,1% de aquellas desmineralizadas con el método convencional fueron evaluadas con una óptima calidad de la tinción de rutina.

Luego tenemos un 53,3% de las muestras procesadas en microondas KOS y un 38,5% de las muestras descalcificadas con el método convencional fueron evaluadas con una calidad de tinción de rutina satisfactoria.

Finalmente, un 20% de las muestras descalcificadas en microondas KOS posee una calidad de tinción de rutina regular, mientras que un 38,5% de las muestras desmineralizadas con el procedimiento convencional fue evaluada con una calidad de tinción de rutina regular.

No se observó en ninguno de los dos métodos de descalcificación casos evaluados con una calidad de tinción de rutina insatisfactoria o escasa.

Se realizó el análisis estadístico de los datos anteriormente mostrados y el resultado del test de Fisher mostró que no existen diferencias estadísticamente significativas respecto de la calidad de la tinción de rutina, en los dos métodos de descalcificación ejecutados ($p=0,624$).

A continuación se presentan las microfotografías de la evaluación de la calidad de la tinción de rutina, Hematoxilina – Eosina.

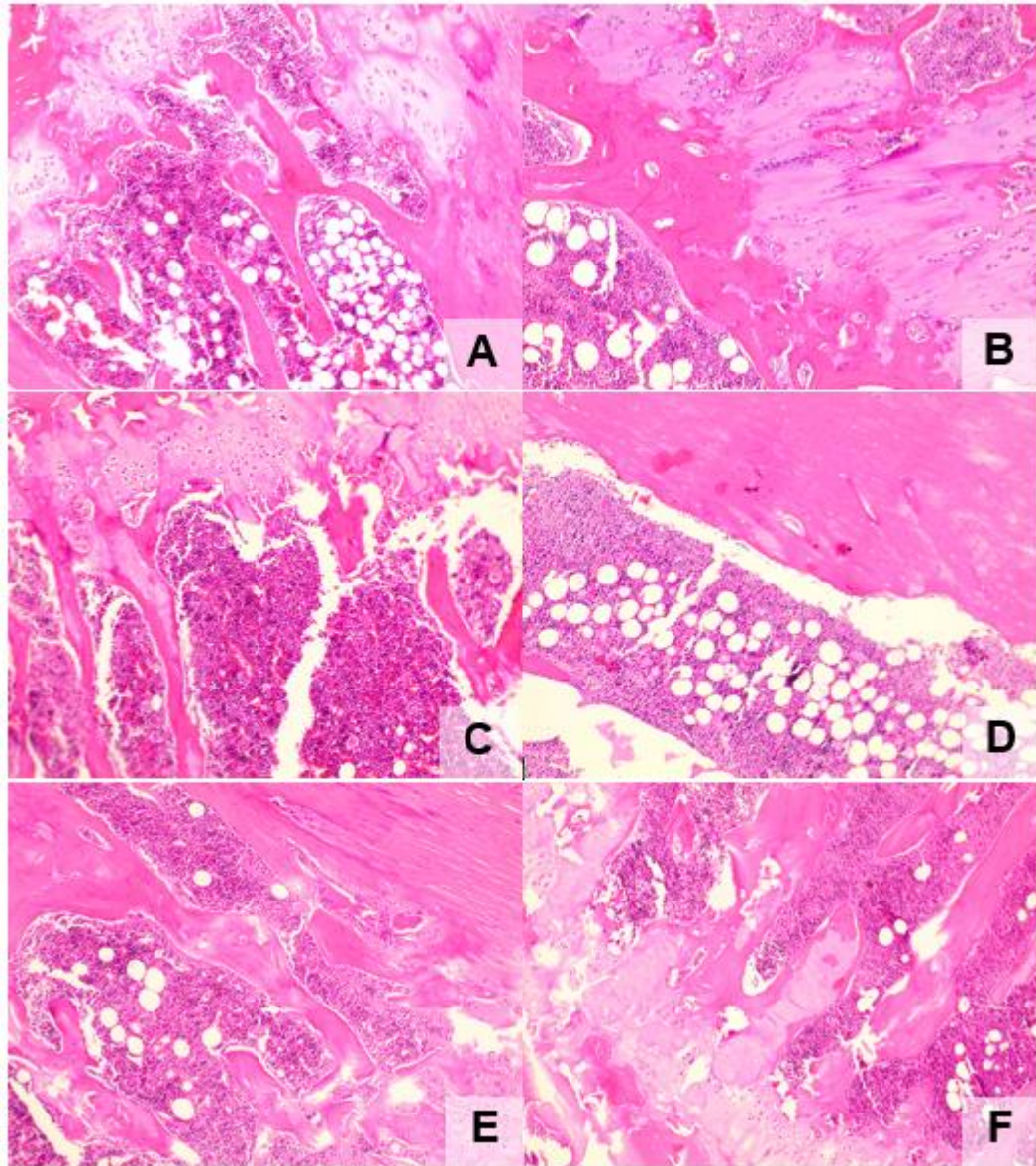


FIGURA 4.4. Calidad de tinción de rutina (HE).

- A) Descalcificación KOS, calidad óptima, 10x. B) Descalcificación convencional, calidad óptima, 10x. C) Descalcificación KOS, calidad satisfactoria, 10x. D) Descalcificación convencional, calidad satisfactoria, 10x. E) Descalcificación KOS, calidad regular, 10x. F) Descalcificación convencional, calidad regular, 10x.*

Tal como se describe en el apéndice C.3.1, se entiende por una tinción de buena calidad de hueso con la técnica de HE como aquella en que existe una buena diferenciación entre sus componentes, donde se observe claramente la característica basófila de los núcleos, con detalle de la distribución de la cromatina y la característica acidófila del osteoide, matriz calcificada y tejido conectivo alrededor del hueso.

En este caso aquellas evaluadas con una calidad satisfactoria y regular presentan en mayor o menor medida una baja diferenciación entre el osteoide y la matriz calcificada y núcleos demasiado basófilos o con falta de detalles en la distribución de la cromatina, de igual forma sucede en aquellas placas en las que se observa una sobretinción.

4.5 COMPARAR LA TINCIÓN TRICRÓMICA DE MASSON EN LAS MUESTRAS DECALCIFICADAS MEDIANTE EL PROCEDIMIENTO CONVENCIONAL Y EN MICROONDAS KOS.

La afinidad tintorial al tricrómico de Masson fue evaluada según lo descrito en el apéndice C.3.2.

Los resultados de esta medición se observan en la siguiente tabla:

TABLA 4.4. Evaluación afinidad tintorial Tricrómico de Masson.

Método de descal.	Tinción Tricrómica de Masson							
	Óptima		Regular		Insatisfactoria		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Microondas	4	28,6%	8	57,1%	2	14,3%	14	100,0%
Convencional	3	23,1%	6	46,2%	4	30,8%	13	100,0%

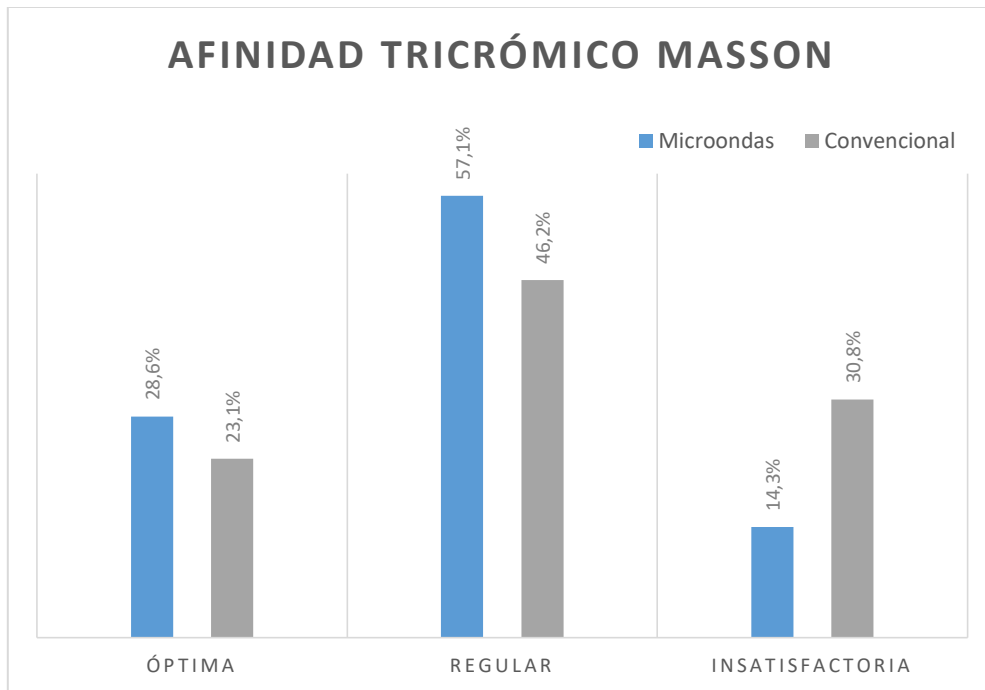


GRÁFICO 4.4. Afinidad tincional Tricrómico de Masson

De la totalidad de las muestras descalcificadas en microondas KOS, un 28,6% de ellas mostraron una óptima afinidad tincional al tricrómico de Masson, un 57,1% una afinidad tincional regular y un 14,3% una afinidad tincional insatisfactoria. Mientras que de la totalidad de las muestras desmineralizadas con el método convencional, un 23,1% de ellas presentó una óptima afinidad tincional al tricrómico de Masson, un 46,2% una afinidad tincional regular y un 30,8% una afinidad tincional insatisfactoria.

Al momento de realizar el análisis estadístico de los datos, el resultado de la prueba exacta de Fisher ($p= 0,686$) arrojó que no existen diferencias significativas respecto de la afinidad tincional al tricrómico de Masson entre cada uno de los métodos de descalcificación utilizados.

A continuación se presentan las microfotografías de la evaluación de la afinidad tintorial al Tricrómico de Masson y sus respectivos controles.

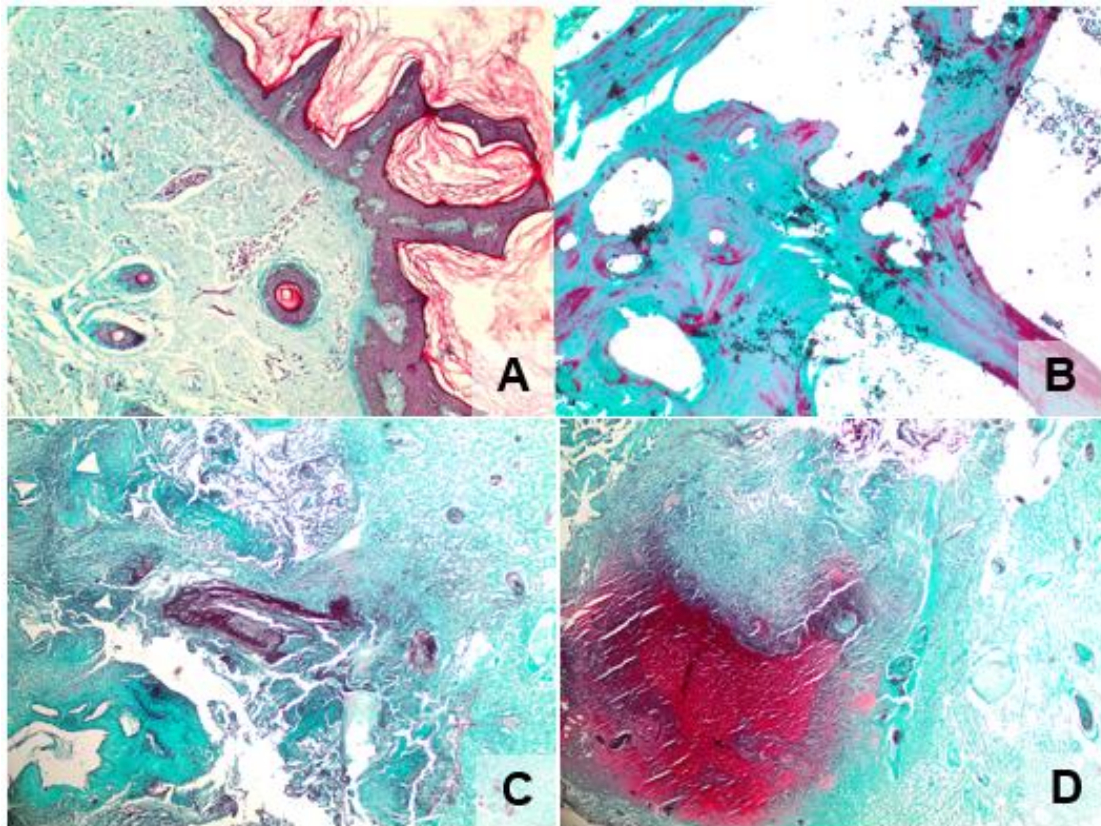


FIGURA 4.5. Controles Tricrómico de Masson.

A) Control (piel). B) Control hueso largo descalcificado con método convencional. C) Control calcificación distrófica. D) Control calcificación distrófica.

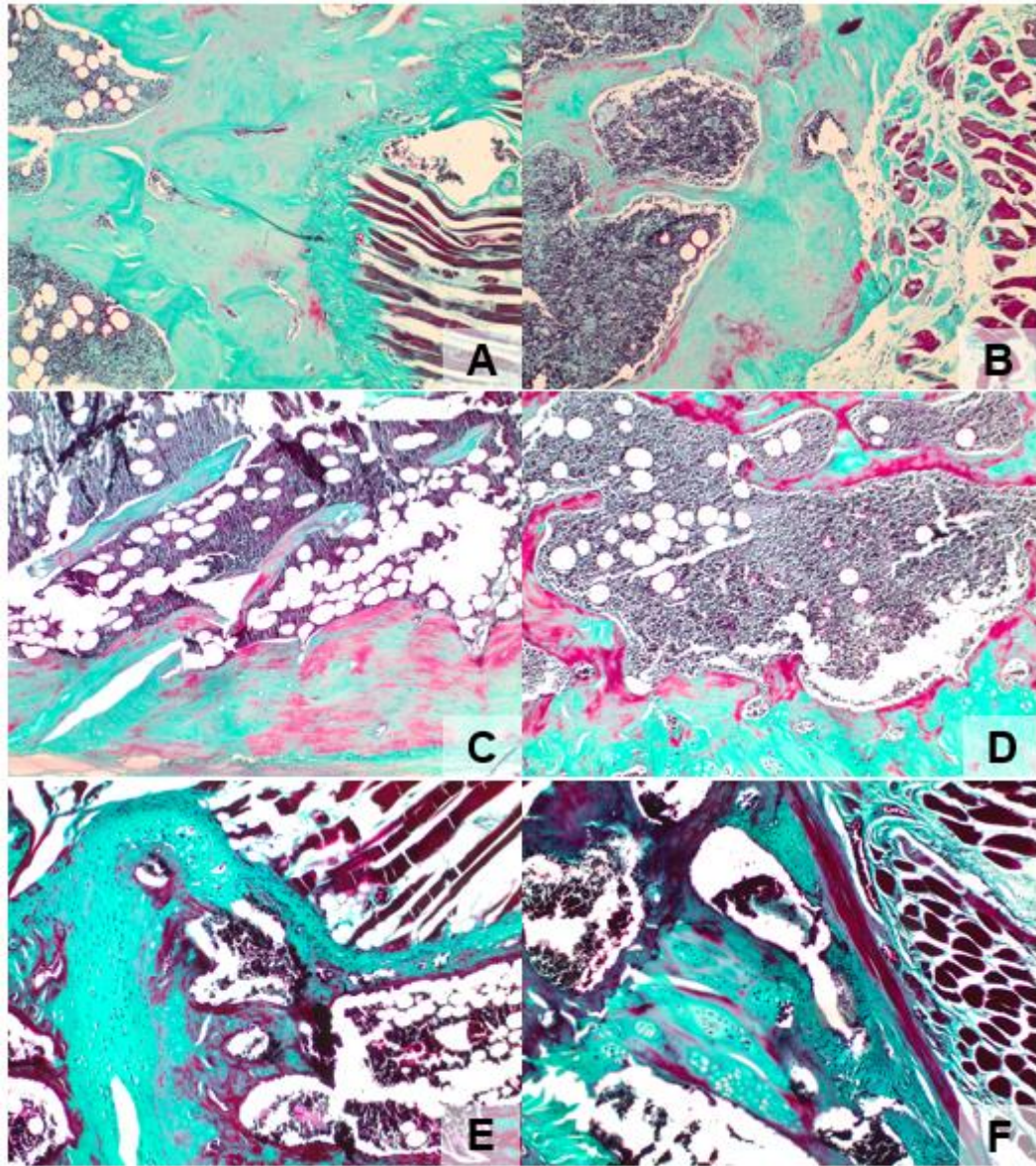


FIGURA 4.6. Afinidad tintorial Tricrómico de Masson.

- A) Descalcificación KOS, afinidad óptima, 10x. B) Descalcificación convencional, afinidad óptima. C) Descalcificación KOS, afinidad regular, 10x. D) Descalcificación convencional, afinidad regular, 10x. E) Descalcificación KOS, afinidad insatisfactoria, 10x. F) Descalcificación convencional, afinidad insatisfactoria, 10x.*

Así como se describe en el apéndice C.3.2, se entiende por una tinción de buena calidad de hueso con la técnica tricrómica de Masson como aquella en la que existe una adecuada afinidad tintorial

para cada uno de los colorantes empleados en esta técnica, en donde se observe una matriz ósea descalcificada teñida de un color verde intenso, colágeno y reticulina del mismo color pero menos intenso, células óseas con núcleos negro azulado y eritrocitos, calcificaciones y fibras musculares de color rojo.

En este caso aquellas muestras evaluadas con una afinidad tintorial regular muestran una coloración opaca por alguna posible intervención en la difusión del reactivo y precipitado de colorantes.

Aquellas evaluadas con una afinidad tintorial insatisfactoria presentan una sobretinción que altera la visualización del tejido con precipitación del colorante nuclear y áreas de desprendimiento del corte luego de la tinción.

4.6 COMPARAR LA TÉCNICA HISTOQUÍMICA DE VON KOSSA EN LAS MUESTRAS DECALCIFICADAS MEDIANTE EL PROCEDIMIENTO CONVENCIONAL Y EN MICROONDAS KOS.

La técnica histoquímica de Von Kossa fue evaluada de acuerdo a lo descrito en el apéndice C.3.3, cuyos resultados se presentan en la siguiente tabla:

TABLA 4.5. Evaluación técnica histoquímica Von Kossa.

Método de descal.	Técnica histoquímica Von Kossa											
	Completa		Moderada		Leve		Escasa		Nula		Total	
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
Microondas	0	0,0	4	26,7	4	26,7	5	33,3	2	13,3	15	100,0
Convencional	0	0,0	0	0	0	0,0	0	0,0	13	100	13	100,0

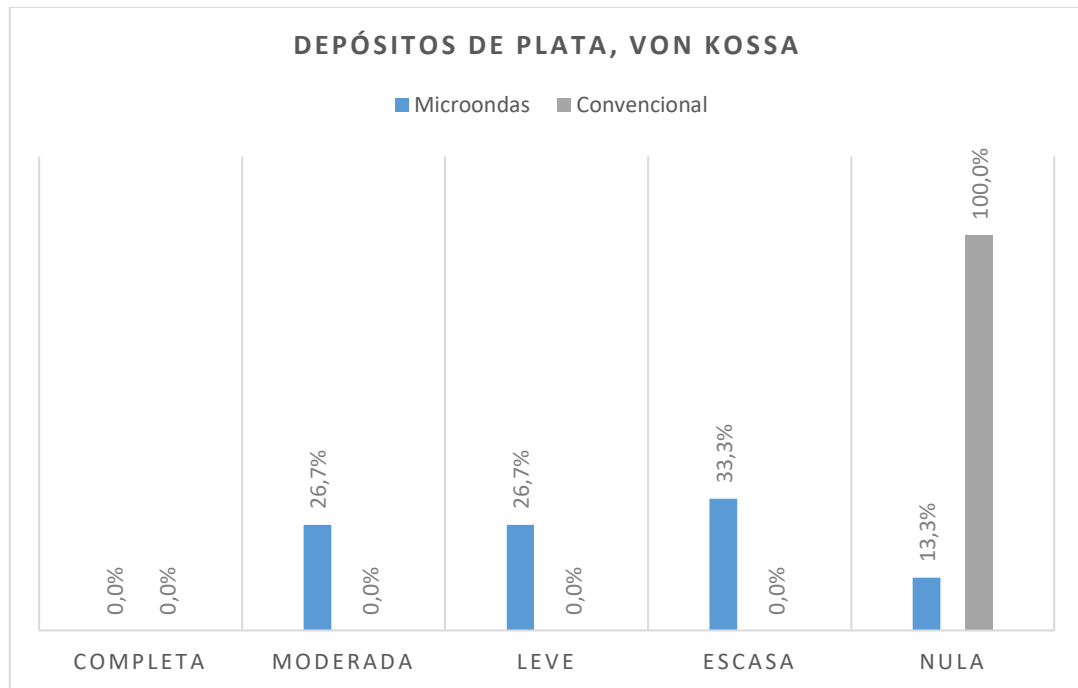


GRÁFICO 4.5. Resultados técnica de Von Kossa en términos de los depósitos de plata asociados a carbonato y fosfato de calcio.

La totalidad de las muestras descalcificadas mediante el proceso convencional fue evaluada con nulos depósitos de plata, mientras que de la totalidad de las muestras descalcificadas en microondas KOS, un 26,7% mostró depósitos de plata moderados, un 26,7% depósitos leves, un 33,3% depósitos escasos y un 13,3% nulos depósitos de plata asociados a carbonato y fosfato de calcio en el tejido.

Estos resultados se respaldan con la radiografía de las muestras tomadas antes del desgaste de los tacos presentada en la figura 4.8.

El análisis estadístico de los datos arrojó una diferencia estadísticamente significativa (prueba exacta de Fisher $<0,0001$) entre las muestras descalcificadas con microondas KOS en comparación con aquellas descalcificadas mediante el método convencional.

A continuación se presentan las microfotografías de las placas tratadas con la técnica de Von Kossa de acuerdo a cada método de descalcificación empleado:

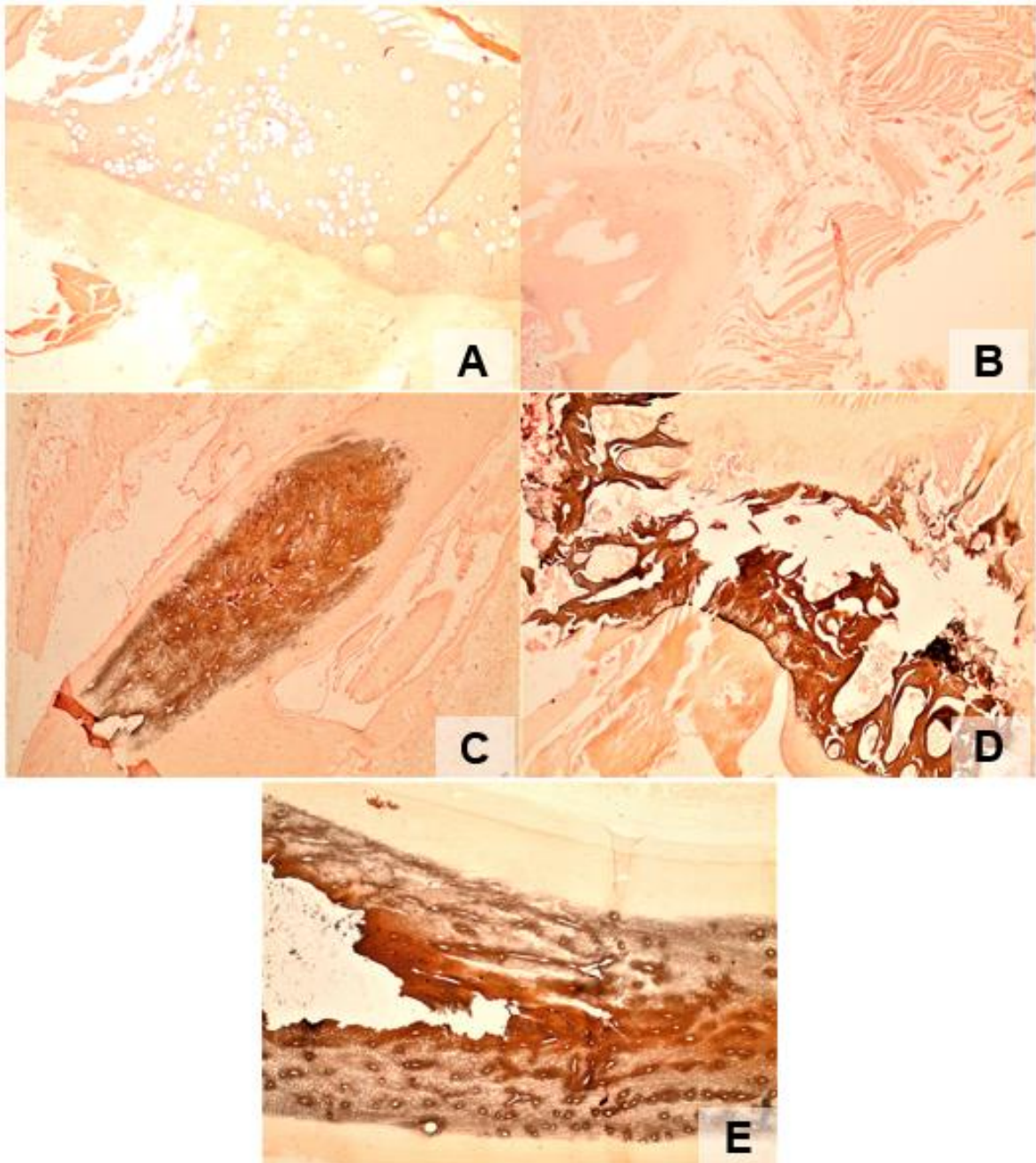


FIGURA 4.7. Depósitos de Ag^+ , asociados a carbonato y fosfato de Ca^{+2} , Von Kossa.

- A) Descalcificación convencional, depósitos nulos, 4x. B) Descalcificación KOS, depósitos nulos, 4x. C) Descalcificación KOS, depósitos escasos, 4x. D) Descalcificación KOS, depósitos leves, 4x. E) Descalcificación KOS, depósitos moderados, 4x.*

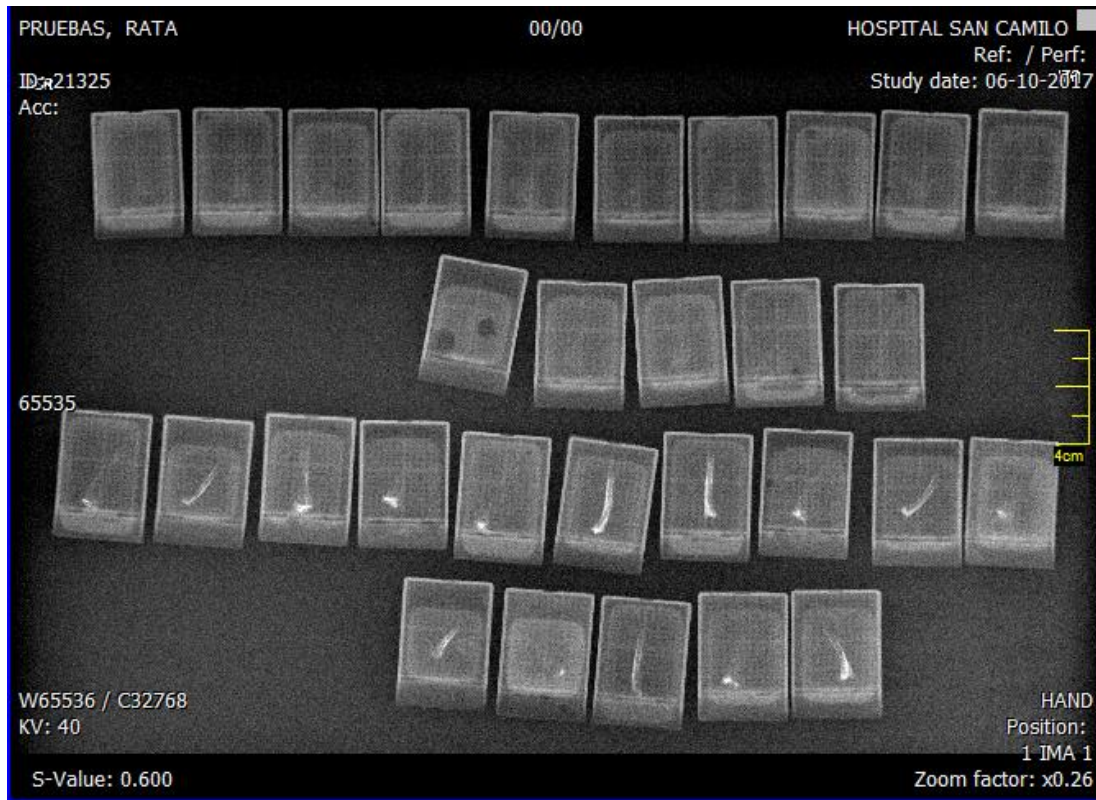


FIGURA 4.8. Radiografía muestras post descalcificación utilizada como control de la técnica histoquímica de Von Kossa.



FIGURA 4.9. Control de la radiografía anterior, corresponde a muestras sin descalcificar.

CAPÍTULO 5 DISCUSIÓN

Luego de realizar este estudio, y al igual que en los trabajos revisados previamente, observamos una reducción considerable en el tiempo de descalcificación de las muestras con el descalcificador Ana Morse a través del microondas KOS en comparación con aquellas desmineralizadas mediante el método convencional (7,8,9,10,11,12,13,14,38,39).

En este trabajo se acordó utilizar el líquido descalcificador de Ana – Morse, con el objetivo de reunir las características que entrega el ácido fórmico junto con aquellas ventajas del tampón de citrato, el cual contrarresta los efectos negativos del ácido y a su vez, actúa como agente quelante (funcionando como un intermediario entre los ácidos y el EDTA). Todo esto en búsqueda de una buena preservación de la histoarquitectura y afinidad tintorial de las muestras

Al evidenciarse tal reducción en el tiempo de descalcificación en las muestras descalcificadas en microondas KOS, consideramos que es un método que puede ser sumamente útil en aquellos casos de urgencia en los que se necesite entregar un diagnóstico rápido.

Si bien de acuerdo a los resultados obtenidos con la técnica de Von Kossa y la radiografía, las muestras que evidenciaron una descalcificación más completa fueron aquellas descalcificadas mediante el método convencional, es importante destacar que en esta investigación no se buscaba obtener una desmineralización completa, sino llegar a un punto en el cual la dureza del tejido no impida realizar un buen corte histológico. Y tal como se observó en esta investigación, un menor grado de descalcificación, como fue el caso de aquellas procesadas en microondas KOS, no afectó la calidad del corte histológico. De todas formas, es un aspecto que se puede mejorar aumentando el número de ciclos de descalcificación en el microondas KOS y aun realizando esta modificación, la reducción del tiempo de desmineralización seguiría siendo considerable.

Un aspecto importante a destacar y comparar es la forma de controlar el avance de la descalcificación utilizado en este trabajo. En este caso, se escogió el método físico en base a un acuerdo con las profesoras guías, el cual fue establecido considerando factores como los recursos disponibles y el tiempo con el que se contaba para trabajar con el equipo. No obstante, la literatura coincide en que la forma ideal para comprobar si el tejido está completamente descalcificado es el método químico y el radiográfico, tal como lo realizaron en algunos de los estudios revisados

(11,12,14); aunque en aquellos estudios en los que utilizaron el método físico de control (9,38) no se observaron diferencias en los resultados obtenidos.

Con respecto a la calidad de las muestras luego de ser sometidas a las microondas, fue evaluada en base al aspecto del corte histológico (relacionado directamente con la dureza del tejido luego de la desmineralización), a la conservación de la morfología tisular y a la afinidad tintorial a la tinción de rutina (HE) y al tricrómico de Masson.

Los resultados obtenidos revelaron que aparentemente la calidad del corte histológico era levemente mejor en las muestras descalcificadas con el método convencional que a través del procedimiento convencional. También observamos que en lo que respecta a la conservación de la morfología tisular no existen diferencias estadísticamente significativas entre un método de desmineralización y otro.

En lo que se refiere a la afinidad tintorial, tanto a la tinción de rutina como a la tinción tricrómica de Masson, al parecer existió una mejoría en aquellas muestras descalcificadas en el microondas KOS. Sin embargo, al momento de realizar el análisis estadístico, el resultado de la prueba exacta de Fisher mostró que no existen diferencias estadísticamente significativas en términos de la calidad de la muestra entre la descalcificación convencional y aquella realizada a través del microondas KOS.

Estos resultados se correlacionan con los obtenidos en las investigaciones de Madden (9), Srinivasyaiah (13), Cunningham (38), Sangeetha (14), Thirumal (11) y Rehan (12); quienes evaluaron y compararon los efectos producidos por el descalcificador y las microondas a través de la tinción de rutina y la conservación de la morfología observada. En ninguno de estos casos se evidenciaron diferencias en dichos términos, con respecto al método de descalcificación convencional.

Por su parte, Vongsavan (7), Madden (9) y Pitol (39) evaluaron la calidad de la histoarquitectura luego de la descalcificación con microondas a través de la microscopía electrónica, observándose en todos los casos, una adecuada conservación de la morfología tisular sin diferencias significativas con respecto a la desmineralización convencional.

En resumen, los resultados de este trabajo muestran que no hay diferencias significativas entre la descalcificación en microondas KOS y el método convencional, en términos de la calidad del corte

histológico, la conservación de la morfología tisular y la afinidad tintorial, por lo que sería posible implementarlo en los laboratorios de anatomía patológica.

Es importante destacar que los instrumentos de evaluación de la conservación de la morfología del tejido y la afinidad tintorial fueron confeccionados teniendo en cuenta los estudios revisados, siendo bastante similares en término de los parámetros evaluados, como lo es la preservación de los todos los componentes del tejido, la ausencia de tinción en parche, intensidad de la tinción, entre otros (11,12,13,14).

Para este estudio se contó con el microondas KOS de Milestone por disponibilidad e interés del proveedor, del que podemos destacar grandes ventajas, como su capacidad de control constante de temperatura, su sistema de agitación y de eliminación de vapores tóxicos al elevar la temperatura de las soluciones descalcificadoras, los cuales pueden provocar serias consecuencias en la salud del operador y cuyos riesgos están descritos en el apéndice D. No obstante, este método de descalcificación puede ser llevado a cabo en un microondas convencional bajo una campana de extracción, siempre y cuando se mantenga un adecuado control de la temperatura para evitar artefactos de técnica en la muestra.

Un aspecto a considerar antes de adquirir un equipo como el microondas KOS, es el valor que éste posee, siendo en el caso de la mayoría de los hospitales públicos del país, una inversión no prioritaria. Para el caso de aquellas unidades que sí pueden costear este sistema, es importante destacar que el microondas KOS también puede ser utilizado para otras funciones dentro del laboratorio, como acelerar la fijación, el procesamiento, la tinción e incluso la recuperación antigénica de las muestras sin afectar la calidad de los resultados (18,40).

Otro factor a considerar, fue la gran importancia de controlar el pH del líquido descalcificador en cada ciclo para evitar el recambio excesivo de dicha solución. En la literatura se recomienda realizar el recambio al finalizar cada ciclo (7,8,9,10,11,12,13,14,38,39). Sin embargo, en esta investigación se buscó extender la vida útil de ella, con el propósito de aprovechar al máximo los recursos disponibles.

Finalmente, es importante mencionar que en este trabajo el tipo de muestra presentaba mayor dureza y resistencia al corte, lo que se tradujo en un mayor grosor del corte histológico. Esto es un

factor que pudo interferir en el ámbito de las técnicas de tinción, en lo que respecta a la difusión de los colorantes y a la precipitación de la plata en la técnica de Von Kossa.

Esperamos que este trabajo sea el punto de inicio de nuevos estudios sobre descalcificación mediante el uso de microondas de laboratorio en Chile, pudiendo abordarse aspectos tales como el efecto que tiene el uso de las microondas sobre la afinidad tintorial para otras técnicas histoquímicas (reticulina de Gomori, técnicas de tinción de médula ósea, entre otras) y para la antigenicidad del tejido. Además de seguir investigando en búsqueda de la estandarización de este proceso, lo que permitiría en definitiva la implementación de éste a nivel nacional.

CAPÍTULO 6 CONCLUSIÓN

Este estudio es el primero en la Universidad de Valparaíso, Campus San Felipe, en el cual se utilizó el microondas KOS para evaluar el proceso de descalcificación empleando un microondas de laboratorio y compararlo con el método convencional con la solución de Ana – Morse.

- El microondas KOS permite una disminución considerable del tiempo que toma el proceso de descalcificación en comparación con el método convencional de desmineralización.
- Es imperativo a la hora de trabajar con microondas la estandarización del proceso, teniendo en cuenta la temperatura y duración de cada ciclo antes de comenzar a realizar las pruebas con la totalidad de las muestras ya que, como vimos en los resultados, estos pueden no ser suficientes o bien, ser excesivos para las muestras, pudiendo resultar en consecuencias incorregibles posteriormente.
- Es de gran importancia tener en cuenta la adecuada selección del método de control del avance de la descalcificación, especialmente en aquellos casos en los que se busca una descalcificación completa de las piezas.
- A pesar de que la descalcificación más completa se logró con el método convencional, el nivel de desmineralización de las muestras procesadas en microondas KOS permitió de igual forma obtener un buen corte histológico de ellas, sin diferencias significativas en su calidad.
- Con respecto a la conservación de la morfología tisular se evidenciaron similares resultados en ambos procesos, obteniendo en ambos casos una conservación satisfactoria de los tejidos.

- En lo que se refiere a la afinidad tintorial de las muestras, tanto a la técnica de rutina, Hematoxilina – Eosina, como al tricrómico de Masson; no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre un método de descalcificación y el otro. Observándose una disminución en el tiempo de desmineralización sin alteración de los resultados.

- El grosor del corte pudo generar artefactos de técnica, al afectar la difusión de los colorantes.

- Luego de analizar los resultados de la técnica histoquímica de Von Kossa, empleada para detectar de manera indirecta la presencia de calcio en el tejido y compararlos con las radiografías de las muestras sin desgastar, observamos que el método de descalcificación convencional entregó una desmineralización más completa, pero en un mayor tiempo, a diferencia de aquellas procesadas en el microondas KOS. Sin embargo, esto no afectó la calidad del corte histológico.

CAPÍTULO 7 BIBLIOGRAFÍA

1. Moral RGd. Fundamentos del proceso de fijación tisular. In Moral RGc. Laboratorio de anatomía patológica.: McGraw Hill; 1993. p. 27 - 54.
2. Lynch MJ. Técnicas Histológicas. In Lynch MJ. Métodos de Laboratorio.: Interamericana p. 1099 - 1181.
3. M. José García EBMPDGDMLSMdCCARJAOOJCEPÁV. Técnico Especialista en Anatomía Patológica del Servicio Gallego de Salud. Primera ed.: Editorial Mad, S.L.; 2006.
4. Moral RGd. Descalcificación y reblandecimiento tisular. Conservación de tejidos y piezas quirúrgicas. In Primera , editor. Laboratorio de anatomía patológica.: McGraw Hill; 1993. p. 55 - 64.
5. Bancroft's. Theory and Practice of Histological Techniques. Séptima ed.: Elsevier; 2013.
6. Pathol A. Accelerated decalcification using microwaves. ScienceDirect. 1981.
7. Vongsavan N. Decalcification of teeth in a microwave oven. Histochemical Journal. 1990 Enero; 22.
8. Callis G. Decalcification of Bone: Literature Review and Practical Study of Various Decalcifying Agents, Methods, and Their Effects on Bone Histology. The Journal of Histotechnology. 1998 Marzo; XXI(1).
9. Madden VJ. Rapid decalcification of temporal bones with preservation of ultrastructure. Elsevier. 1997.
10. Viennet G. Essais de Décalcification Accélérée par le rapid décalcifiant osseux et les micro-ondes. Rev. Fr. Histotechnol. 1994;(1).
11. Raj AT. A Comparison of Conventional and Microwave Decalcification and Processing of Tooth and Mandibular Bone Specimens. Journal of Clinical an Diagnostic Research. 2016 Octubre.
12. Rehan AD. Comparison of microwave decalcification with convetional decalcification method by using different decalcifying agents. Internation Journal of Research in Medical Sciences. 2017 Mayo; V(7).

13. Srinivasyaiah A. Comparison of Microwave Versus Conventional Decalcification of Teeth using Three Different Decalcifying Solutions. *Journal of Laboratory Physicians*. 2017 Febrero.
14. Ramu S. Comparison of routine decalcification methods with microwave decalcification of bone and teeth. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*. 2013 Septiembre; XVII.
15. CONICYT Explora. Explora. [Online].; 2013 [cited 2017 Diciembre 8. Available from: <http://www.explora.cl/333-sabias-que/sabias-ingenieria/941-que-onda-con-el-microondas>.
16. Organización Mundial de la Salud. Organización Mundial de la Salud. [Online].; 2005 [cited 2017 Diciembre 8. Available from: http://www.who.int/peh-emf/publications/facts/info_microwaves/es/.
17. Astromía. Astromía. [Online]. [cited 2017 Diciembre 08. Available from: <http://www.astromia.com/glosario/micronondas.htm>.
18. Kroff P. Aplicación de las microondas en los laboratorios de anatomía patológica. Tesis de Grado. Universidad de Valparaíso, Tecnología Médica; 2006.
19. Milestone. Kos Sistema multifuncional de procesamiento rápido con microondas, Manual de instrucciones. 2015..
20. Chacín B. Curso Básico de Técnicas Histológicas. Santiago de Chile: Universidad de Los Andes, Departamento de Ciencias Morfológicas, Unidad Académica de Histología.
21. Arenas CM. Técnica Histológica. UNAM, Departamento de Biología Celular y Tisular; 2010.
22. Moral RGd. Fundamentos generales sobre procesamiento histológico de los tejidos. In Moral RGd. Laboratorio de anatomía patológica.: McGraw Hill; 1993. p. 15 - 26.
23. Arenas CM. Técnica Histológica. UNAM, Departamento de Biología Celular y Tisular; 2010.
24. Arenas CM. Técnica Histológica. UNAM, Departamento de Biología Celular y Tisular; 2010.
25. Moral RGd. Coloraciones histopatológicas rutinarias de mayor interés. In Moral RGd. Laboratorio de anatomía patológica.: McGraw Hill; 1993. p. 155 - 157.
26. Moral RGd. Fundamentos generales de coloración. In Moral RGd. Laboratorio de anatomía patológica.: McGraw Hill; 1993. p. 119 - 142.
27. Geneser F. Histología. Tercera ed. Copenhague: Panamericana; 1999.

28. Moral RGd. Coloraciones para fibras colágenas y elásticas del tejido conjuntivo. Coloraciones para sustancia amiloidea. In Moral RGd. Laboratorio de anatomía patológica.: McGraw Hill; 1993. p. 175 - 179.
29. Kiernan JA. Histological & Histochemical Methods, Theory and Practice. Quinta ed.
30. Du B. Angiogenesis and bone regeneration of porous nano-hydroxyapatite/coralline blocks coated with rhVEGF165 in critical-size alveolar bone defects in vivo. International Journal of Nanomedicine. 2015;(10).
31. Universitat de València. Universitat de València. [Online]. [cited 2018 Enero 3. Available from: <https://www.uv.es/histomed/practicas/05-hueso/05-hueso.htm>.
32. Moral RGd. Métodos para la identificación y tinción de pigmentos e iones metálicos. In Moral RGd. Laboratorio de anatomía patológica.: McGraw Hill; 1993. p. 265 - 280.
33. Abcam. Abcam. [Online]. [cited 2018 Enero 10. Available from: http://www.abcam.com/von-kossa-calcium-stain-ab150687.html#description_images_1.
34. Garbayo AJ. Enfermedad metastásica ósea. Diagnóstico y tratamiento. Anales del Sistema Sanitario de Navarra. 2004; 27(3).
35. Vizcaíno M. Guía de atención integral para la detección oportuna, diagnóstico, tratamiento y seguimiento de leucemia linfocítica aguda en niños, niñas y adolescentes. Revista Colombiana de Cancerología. 2015.
36. Almaraz RL. Detección y derivación precoz de niños con sospecha de cáncer. Canarias Pediátrica y el Boletín de Pediatría. 2007 Enero; 31(1).
37. Sampieri RH. Metodología de la investigación: Interamericana; 2006.
38. III CDC. Microwave Decalcification of Human Temporal Bones. The Laryngoscope. 2001 Febrero.
39. Pitol D. Microwave-Induced Fast Decalcification of Rat Bone for Electron Microscopic Analysis: An Ultra-estructural and Cytochemical Study. Braz Dent J. 2007.
40. Katoh K. Microwave-Assisted Tissue Preparation for Rapid Fixation, Decalcification, Antigen Retrieval, Cryosectioning and immunostaining. International Journal of Cell Biology. 2016 Octubre.

41. Hernández RR. Vigencia de los Postulados de Koch en la reproducción de *Trichinella spiralis* en modelo experimental. *RedVet*. 2014; 15(5).
42. Jerome C. Skeletal System. In Cristopher Jerome BH. *Comparative Anatomy and Histology*. Seattle: Elsevier; 2012. p. 53 - 70.
43. Vargas AA. Determinación de la afinidad tintorial del colorante Tricrómico de Masson en el estudio histológico de cerebro y cerebelo de conejo (*Oryctolagus cuniculus*). Tesis de grado. Universidad Nacional de Cajamarca, Escuela académico profesional de medicina veterinaria; 2014.
44. National Academy of Sciences. *Assessment of Exposure-Response Functions for Rocket-Emission Toxicants* Washington DC: National Academy Press; 1998.
45. RD Natural Salusvir. rdnatural. [Online].; 2012 [cited 2017 Diciembre 25. Available from: <http://www.rdnatural.es/blog/acido-formico/>.
46. PubChem. PubChem. [Online]. [cited 2017 Diciembre 25. Available from: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sodium_citrate#section=Top.
47. Oxiquim S.A. Hoja de datos de seguridad de productos. 2007..
48. Leiva S. *Métodos histoquímicos*; 1982.
49. Liu Zj. Icarine stimulates proliferation and differentiation of humans osteoblasts by increasing production of bone. *Chinese Medical Journal*. 2007 Febrero.

CAPÍTULO 8 APÉNDICES

APÉNDICE A. RATA SPRAGUE DAWLEY.

La rata Sprague Dawley es utilizada ampliamente en la investigación médica. Su principal ventaja es su tranquilidad y facilidad de manejo. Esta cepa de rata fue la primera producida por las Granjas Sprague Dawley (para luego convertirse en Compañía de Animales Sprague Dawley) en Madison, Wisconsin. Las instalaciones de cría se adquirieron por primera vez por Gibco y luego por Harlan, ahora Harlan Sprague Dawley, en enero de 1980. El tamaño promedio de la camada de la rata Sprague Dawley es de 10,5. El peso corporal del adultos es de 250 – 300 g para las hembras, y 450 – 520 g para los machos. La vida útil típica es 2,5 – 3,5 años (41).

A.1. Esqueleto ratas:

Las funciones principales del esqueleto son proporcionar soporte estructural, mantener la homeostasis del calcio y reemplazar el hueso viejo o comprometido con el fin de mantener la integridad estructural en condiciones normales de carga (42).

El esqueleto contiene el 99% del calcio del cuerpo y es crucial para mantener los niveles de calcio extracelular dentro de los límites esenciales para la vida. Mientras que la resorción ósea y los procesos de formación desempeñan un papel en liberar y secuestrar calcio para mantener la homeostasis del éste (42).

Los huesos del esqueleto se clasifican de varias maneras. El esqueleto axial comprende el cráneo, la espina dorsal y las costillas, y el esqueleto apendicular comprende las extremidades y sus uniones al esqueleto axial (42).

a) Características de sistema óseo de ratas: Muchas características esqueléticas son notablemente similares entre la rata y el ser humano (42).

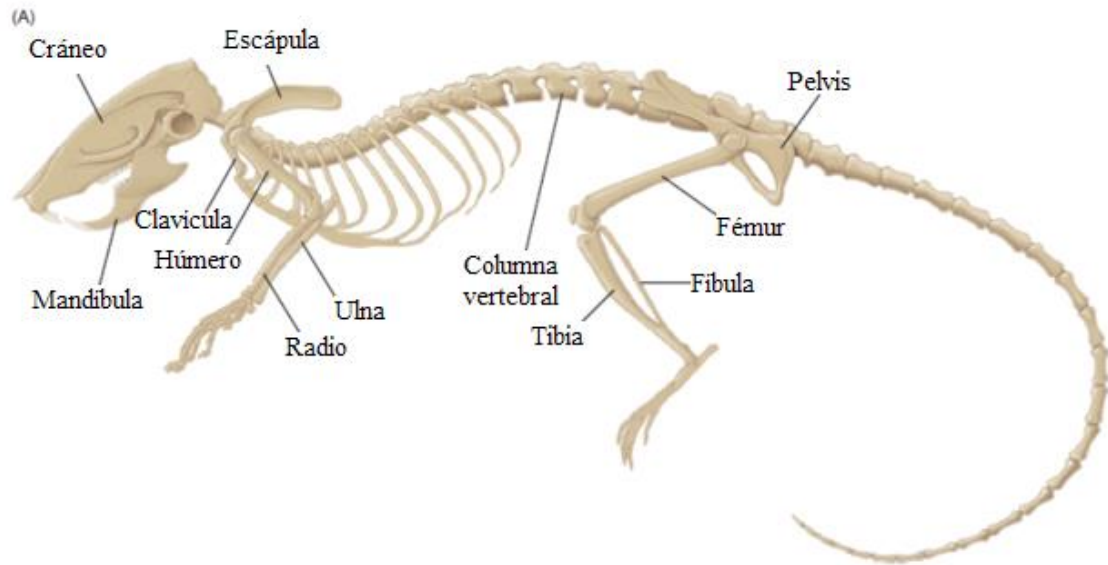


FIGURA 8.1. Anatomía regional de todo el esqueleto.

La estructura esquelética del ratón refleja cuadripedalismo (42).

- **Formación de hueso:** Tanto en humanos como en ratones, el hueso se forma inicialmente como tejido óseo, inmaduro o fibroso, durante el desarrollo en la osificación endocondral e intramembranosa o en respuesta a una lesión. El tejido óseo tiene una matriz de colágeno que se caracteriza por un patrón dispuesto irregularmente similar a la tela tejida, y tiene una población celular de osteoblastos activados. Posteriormente, el hueso tejido se remodela en hueso laminar maduro mediante remodelación ósea. El hueso laminar maduro es menos celular que el tejido óseo y está compuesto por una matriz de colágeno dispuesta en capas. Dentro de cada capa, los paquetes de colágeno se encuentran paralelos entre sí. Esta estructura laminar es análoga a las capas de madera contrachapada y proporciona una resistencia mucho mayor que el tejido óseo, pero no se puede formar con la misma rapidez (42).

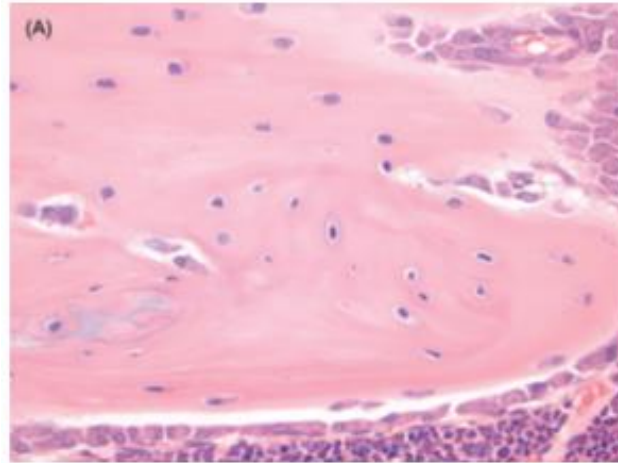


FIGURA 8.2. Imagen histológica de un ratón de 6 semanas de edad.

Se observa un paquete de hueso laminar sobre un cartílago y un núcleo trabecular de hueso (42).

- **Cráneo:** Adaptación del cráneo a un cerebro pequeño, el cual refleja la importancia del olfato y el tamaño de los dientes mostrando predominio de la cavidad nasal y mandíbulas (42).

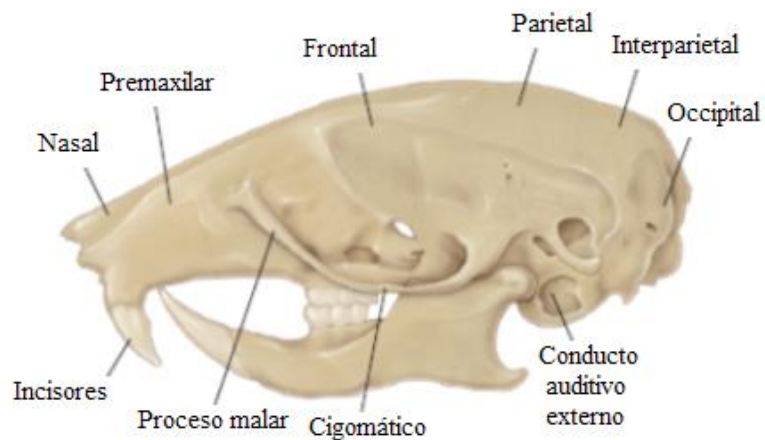


FIGURA 8.3. Anatomía regional del cráneo (42).

- **Vertebras:** La columna del ratón posee un mayor número de vértebras torácicas, lumbares y coccígeas que los humanos (42).

El número total de vértebras pre-coccígeas rara vez varía dentro de una especie, pero no es raro observar sacralización o fusión de la última vértebra lumbar con el sacro o tener una vértebra torácica adicional acompañada de la pérdida de una vértebra lumbar. La vértebra lumbar del ratón tiene un cuerpo vertebral relativamente pequeño (42).

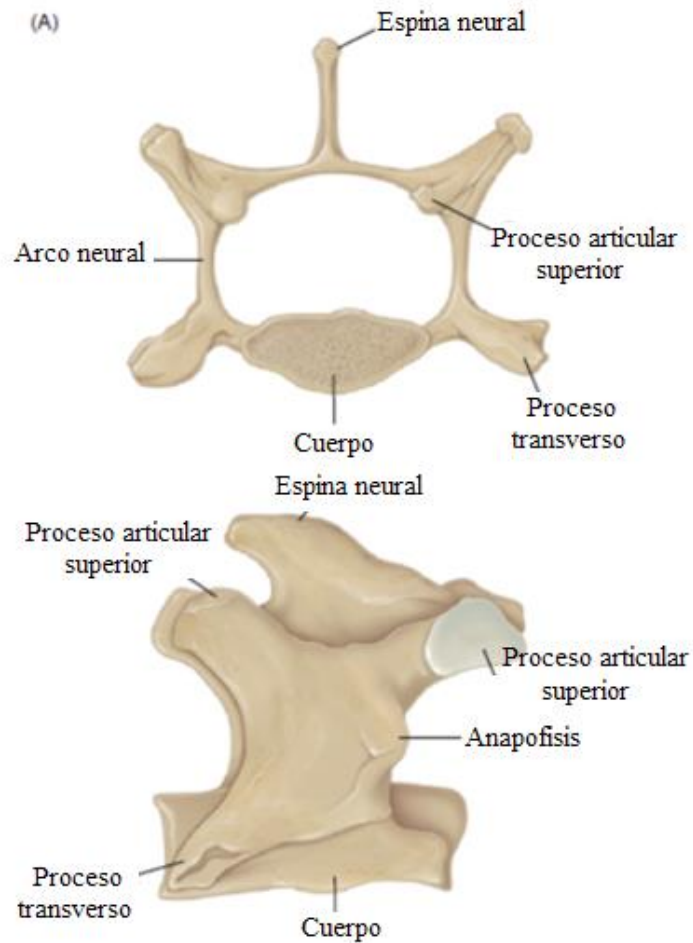


FIGURA 8.4. Anatomía regional de la vértebra lumbar (42).

- **Huesos largos:** En ambas especies, los huesos largos tienen tres regiones principales: la epífisis (extremo del hueso), la diáfisis (eje del hueso) y la metáfisis (región ensanchada entre la epífisis y la diáfisis). Cada hueso tiene una capa exterior, la corteza, que encierra una red de placas y varillas

de hueso conocidas como esponjosas o trabeculares. El eje de los huesos largos, como el fémur, está compuesto casi por completo de hueso cortical (42).

En los huesos largos, la corteza es más gruesa en la diáfisis, en la que predominan las fuerzas de flexión. En la metáfisis y la epífisis, la corteza es delgada y el hueso esponjoso forma más hueso para soportar las fuerzas compresivas de las articulaciones (42).

En los ratones, el peroné se fusiona con la tibia justo debajo del eje central en lugar de extenderse distalmente para articularse con el tobillo como lo hace en los humanos (42).

- **Huesos sesamoideos:** Estos huesos sesamoideos son comunes en ratones, en la fabella (un pequeño hueso sesamoideo se encuentra en algunos mamíferos incrustados en el tendón de la cabeza lateral del músculo gastrocnemio detrás del cóndilo lateral del fémur) (42).

- **Menisco:** El menisco humano es fibrocartilago compuesto principalmente de colágeno y una pequeña proporción de proteoglicanos. La orientación de las fibras de colágeno es predominantemente circunferencial para resistir las fuerzas de carga sobre el menisco. El ratón tiene un menisco menos fibroso con un cartilago articular mucho más delgado con menos capas celulares que el humano (42).

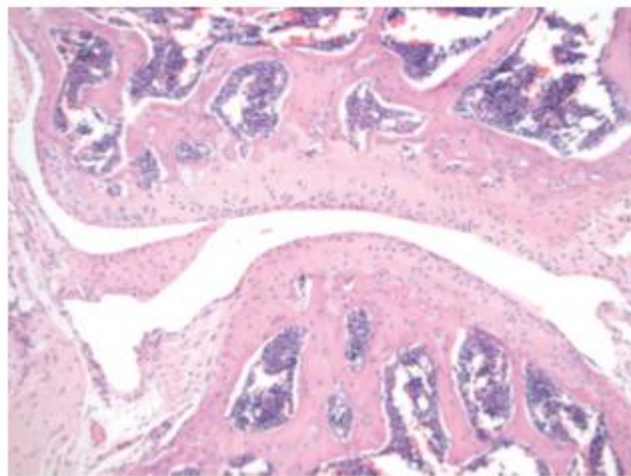


FIGURA 8.5. Articulación de la rodilla, HE.

Las principales estructuras de los tejidos blandos de las articulaciones sinoviales son similares entre humanos y ratones (42).

- **Médula:** En los ratones de 3 – 4 meses, hay médula hematopoyética en los huesos largos, con adipocitos ocasionales. Sin embargo, hay más tejido adiposo en otros sitios de la médula, como la epífisis distal del radio y el cúbito y las cavidades medulares de los miembros y vértebras distales. En humanos adultos, la médula hematopoyética reside en el esqueleto axial (vértebras y huesos pélvicos) y ocasionalmente en el húmero y el fémur proximales. El resto del esqueleto apendicular contiene médula grasa (42).

APÉNDICE B. PROTOCOLOS EMPLEADOS DURANTE LA INVESTIGACIÓN

B.1 Preparación de solución de Ana – Morse

TABLA 8.1. Preparación de solución descalcificadora Ana – Morse.

Solución	Cantidad
A. Ácido fórmico al 45% en agua destilada	500 ml
B. Citrato de sodio al 20%	500 ml

Mezclar partes iguales de la solución A y la solución B.

B.2 Hematoxilina Eosina

TABLA 8.2. Protocolo HE teñidor automático Medite modelo TST 44 200.

Paso	Reactivo	Tiempo
1	Xilol	5 minutos
2	Xilol	4 minutos
3	Xilol	3 minutos
4	Alcohol 100%	2.5 minutos
5	Alcohol 100%	2 minutos

6	Alcohol 96%	2 minutos
7	Alcohol 96%	2 minutos
8	Alcohol 70%	1 minuto
9	Lavado en agua corriente	30 segundos
10	Hematoxilina de Harris	7 minutos
11	Lavado en agua corriente	30 segundos
12	Diferenciación en alcohol ácido	1 segundo
13	Lavado en agua corriente	30 segundos
14	Viraje en borato	30 segundos
15	Lavado en agua corriente	30 segundos
16	Eosina	3.5 minutos
17	Lavado en agua corriente	5 segundos
18	Alcohol 96%	5 segundos
19	Alcohol 100%	5 segundos
20	Alcohol 100%	5 segundos
21	Alcohol 100%	30 segundos
22	Alcohol 100%	1 minuto
23	Xilol	2 minutos
24	Xilol	2 minutos

25	Montaje	
----	---------	--

B.3 Tricrómico de Masson

TABLA 8.3. Protocolo tinción tricrómica de Masson.

Paso	Reactivo	Tiempo
1	Agua destilada	
2	Hematoxilina de Weigert	15 minutos
3	Lavado en agua corriente	
4	Viraje en borato	25 segundos
5	Fucsina ácida 1% – Ponceau Xilidina 1%	10 minutos
6	Lavar en agua acética	Por arrastre
7	Ácido Fosfotúngstico – Fosfomolibdico	5 minutos
8	Lavar en agua acética	Por arrastre
9	Verde Luz	25 segundos
10	Lavar en alcohol 95°	
11	Deshidratar, aclarar y montar	

B.4 Von Kossa

TABLA 8.4. Protocolo Von Kossa.

Paso	Reactivo	Tiempo
1	Agua destilada	5 minutos
2	Nitrato de plata a la luz solar	30 minutos
3	Lavar en agua destilada	5 minutos
4	Tratar con tiosulfato de sodio al 5%	2 – 3 minutos
5	Lavar en agua corriente	30 segundos
6	Lavar en agua destilada	30 segundos
7	Contrastar con rojo neutro al 0,1%	25 segundos
8	Deshidratar, aclarar y montar	

APÉNDICE C. EVALUACIONES DE LAS VARIABLES ESTABLECIDAS

C.1 Calidad del corte histológico

Fue realizada por el responsable del corte histológico, es decir, el operador.

Para obtener resultados comparables establecimos criterios de evaluación de estos, dentro de los cuales se encuentran algunos artefactos de técnica como el grosor del corte y la presencia de arrugas y/o mellas.

El grosor del corte debe ser de 3 a 5 μm , un corte de mayor grosor a éste se visualiza teñido con una mayor intensidad de la esperada y uno de menor grosor se observa teñido más pálidamente. Además un corte con grosor irregular se manifiesta como áreas teñidas más intensamente y otras más pálidamente y es común al trabajar con tejidos que ofrecen una mayor resistencia al corte, como lo son la próstata, tiroides, útero, hueso, etc.

Las arrugas se observan como pliegues en el tejido y se pueden originar debido a que la cuchilla o el bloque están demasiado calientes, la cuchilla está orientada en un ángulo demasiado vertical, cortes demasiado delgados, tornillos flojos o cuchilla mellada.

Las mellas se visualizan como una línea o corte vertical en tejido que puede estar acompañado de un agujero y son ocasionados por una navaja dañada, partículas de suciedad en la navaja o la presencia de sustancias duras dentro del tejido, como cálculos, microcalcificaciones, corchetes, etc.

Calidad del Corte	Descripción del Parámetro
Bueno	Corte de grosor uniforme, sin arrugas ni mellas.
Satisfactorio	Corte de grosor uniforme, con mellas o arrugas que no afectan la visualización del tejido, es decir, que el artefacto de técnica no ocupe más del 30% del tejido.

Insatisfactorio	Corte de grosor irregular, con mellas o arrugas que afectan la visualización del tejido, es decir, que el artefacto de técnica ocupe más del 30% del tejido.
No obtenido	No fue posible obtener un corte en el cual logre visualizarse el tejido.

TABLA 8.5. Calidad del corte histológico.

Muestra	Calidad del corte histológico			
	Bueno	Satisfactorio	Insatisfactorio	No obtenido
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				

13				
14				
15				
16				
17				
18				
19				
20				
21				
22				
23				
24				
25				
26				
27				
28				
29				
30				

C.2 Evaluación de la morfología tisular

Fue llevada a cabo mediante la tinción de HE que permite evaluar la morfología de los tejidos, evaluada por dos observadores ciegos.

La observación de cada una de las siguientes características representara un porcentaje, el cual es sumado para obtener el total, lo que corresponde al porcentaje de preservación de la morfología tisular.

- 1.- Se observan osteocitos y osteoblastos: 20%
- 2.- Se observa matriz ósea y osteoide bien diferenciados entre sí, es decir, que ambas estructuras estén bien delimitadas: 20%
- 3.- Se observan conductos de havers y vascularización: 20%
- 4.- Núcleos preservados, lo que se refiere a que estos presenten una carioteca claramente visible y un detalle de la distribución de la cromatina: 20%
- 5.- Se observa médula ósea: 20%

Se determinaron los siguientes grados de conservación del tejido:

- a) Conservación óptima (+ + +):** Correspondiente al 81 – 100%
- b) Conservación moderada (+ +):** Correspondiente al 61 – 80%
- c) Conservación escasa (+):** Correspondiente al 21 – 60 %
- d) Conservación nula (-):** Correspondiente al 0 – 20%

TABLA 8.6. Conservación de la morfología tisular.

Muestra	Conservación de la morfología tisular			
	Óptima	Moderada	Escasa	Nula
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				
13				
14				
15				
16				

17				
18				
19				
20				
21				
22				
23				
24				
25				
26				
27				
28				

C.3 Evaluación de la calidad de la coloración

C.3.1. Tinción de rutina Hematoxilina – Eosina:

Los evaluadores de cada técnica fueron dos observadores ciegos.

Se entiende por una tinción de buena calidad de hueso con la técnica de HE como aquella en que existe una buena diferenciación entre sus componentes, donde se observe claramente la característica basófila de los núcleos, con detalle de la distribución de la cromatina y la característica acidófila intensa de la matriz calcificada, del tejido conectivo alrededor del hueso y acidófila pálida en el caso osteoide.

Se entiende como 100% aquella tinción en la que se presenten las características antes descritas.

Se descontó 20% cada vez que se evidencie claramente alguna de las siguientes características y 10% cuando la visualización de las mismas sea mínima.

1.- Núcleos demasiado basófilos, con falta de detalles morfológicos de la membrana nuclear y la distribución de la cromatina.

2.- Baja diferenciación de osteoide y matriz calcificada.

3.- Alteración de la característica basófila del osteoide o núcleos.

4.- Alteración de la característica acidófila de la matriz calcificada o el tejido conectivo.

Calidad de la tinción:

a) Óptima (+ + +): Correspondiente al 90 – 100%

b) Satisfactoria (+ +): Correspondiente al 70 – 89%

c) Regular (+): Correspondiente al 50 – 69 %

d) Insatisfactoria (-): Correspondiente al 30 – 49%

e) Escasa (--): Correspondiente al 0 – 29%

TABLA 8.7. Calidad de la coloración HE.

Muestra	Calidad de la Coloración HE				
	Óptima	Satisfactoria	Regular	Insatisfactoria	Escasa
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					

17					
18					
19					
20					
21					
22					
23					
24					
25					
26					
27					
28					

C.3.2 Tinción Tricrómica de Masson

Al igual que en la tinción anterior, los evaluadores de cada técnica fueron observadores ciegos.

Se entiende por una tinción de buena calidad de hueso con la técnica tricrómica de Masson como aquella en la que existe una adecuada afinidad tintorial para cada uno de los colorantes empleados en esta técnica, en donde se observe una matriz ósea descalcificada teñida de un color verde intenso, colágeno y reticulina del mismo color pero menos intenso, células óseas con núcleos negro azulado y eritrocitos, calcificaciones y fibras musculares de color rojo. La pauta de evaluación fue confeccionada en base a un trabajo de la Universidad Nacional de Cajamarca (43).

Se definieron los siguientes niveles de calidad de coloración:

a) Óptima:

- 1.- Coloración homogénea, es decir sin tinción en parche (áreas con coloración y áreas sin coloración).
- 2.- Sin presencia de precipitados de colorante, que se observa como gránulos coloreados sobre el tejido.
- 3.- Nitidez notable, lo que facilita la identificación de los diferentes componentes y estructuras histológicas.

b) Regular:

- 1.- Moderada afinidad del tejido hacia el colorante
- 2.- Estructuras histológicas poco visibles.
- 3.- Coloración opaca, lo que dificulta la identificación de estructuras histológicas.

c) Insatisfactoria:

- 1.- Leve grado de afinidad del tejido hacia el colorante o sobretinción, por lo que las estructuras histológicas no son muy visibles.
- 2.- Estructuras histológicas no identificables.
- 3.- Desprendimiento del corte.

TABLA 8.8. Calidad Tinción tricrómica de Masson.

Muestra	Calidad Tinción T. Masson		
	Óptima	Regular	Insatisfactoria
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			

17			
18			
19			
20			
21			
22			
23			
24			
25			
26			
27			
28			

C.3.3 Método de Von Kossa

Se entiende como buena detección de los iones fosfato y carbonato (asociados al calcio en tejidos calcificados normales y patológicos) como aquella lámina en la que se observe este contenido de color negro, aportado por el depósito de nitrato de plata asociado a dichos iones, mientras que el osteoide y núcleos se observen de color rojo y el citoplasma de color rosado claro (1,20).

Se establecieron 5 grados de mineralización:

a) Completa (+ + + +): Correspondiente al 100% – La mayor parte del tejido corresponde a depósitos de plata asociada a fosfato y carbonato.

b) Moderada (+ + +): Correspondiente al 80 – 99% – Se observan grandes depósitos generalizados de plata asociada a fosfato y carbonato

c) Leve (+ +): Correspondiente al 50 – 79 % – Se observan depósitos moderados de plata asociada a fosfato y carbonato de localización múltiple.

d) Escasa (+): Correspondiente al 20 – 49% – Se observan pequeños depósitos localizados de plata asociada a carbonato y fosfato.

e) Nula (-): Correspondiente al 0 – 19% – No se observa depósito de plata asociada a fosfato y carbonato.

TABLA 8.9. Depósitos de plata asociado a fosfato y carbonato de calcio, Von Kossa.

Muestra	Depósitos de plata, Von Kossa				
	Completa	Moderada	Leve	Escasa	Nula
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					

8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					
21					
22					
23					
24					
25					
26					

27					
28					

APÉNDICE D. TOXICIDAD DE LOS AGENTES DESCALCIFICADORES MÁS UTILIZADOS.

D.1 Toxicidad del Ácido nítrico:

El ácido nítrico es un ácido altamente corrosivo y fuertemente oxidante. Formulaciones comerciales del compuesto contienen aproximadamente 56-68% de ácido nítrico. La exposición a la luz causa la formación de dióxido de nitrógeno, que le da al líquido un color amarillo. El ácido nítrico concentrado que contiene dióxido de nitrógeno disuelto se denomina ácido nítrico humeante, que produce humos sofocantes y venenosos de dióxido de nitrógeno y tetróxido de nitrógeno (44).

El ácido nítrico puede existir en el aire como un gas, vapor, neblina, humo o aerosol. Es probable que la niebla de ácido nítrico se frote en la boca o los conductos nasales, el gas y el vapor en el tracto respiratorio superior y el humo y el aerosol en la región alveolar de los pulmones. La toxicidad después de la exposición a la inhalación de ácido nítrico es similar en humanos y animales. Los vapores de ácido nítrico pueden causar irritación inmediata del tracto respiratorio, dolor y disnea, seguida de un período de recuperación que puede durar varias semanas. Puede ocurrir una recaída que ocasione la muerte por bronconeumonía y fibrosis pulmonar. En concentraciones no letales, las personas alérgicas o asmáticas parecen ser sensible a las atmósferas ácidas (44).

D.2 Toxicidad del Ácido fórmico:

El ácido fórmico, es un ácido orgánico de un solo átomo de carbono, y por lo tanto el más simple de los ácidos orgánicos. Su fórmula es H-COOH (CH_2O_2) (45).

La exposición prolongada puede causar edema pulmonar, shock y muerte por fallo respiratorio. Algunos síntomas derivados de su inhalación incluyen: Irritación de la nariz, ojos, garganta, tos, flujo nasal, lagrimeo y dificultad respiratoria (45).

Su ingestión puede provocar: Salivación, vómitos en ocasiones acompañado por sangrado, dolor abdominal, quemaduras, ardor intenso en la boca, labios y esófago, diarrea y posiblemente la muerte (45).

Se absorbe rápidamente produciendo efectos tóxicos serios. Su absorción a través de la piel produce (45):

- Dolor.
- Enrojecimiento.
- Quemaduras.

La solución concentrada causa irritación y ampollas. En los ojos produce (28):

- Irritación.
- Daño a los tejidos.
- En forma de rocío puede producir corrosión de los tejidos y daño permanente de la córnea.

D.3 Toxicidad del Citrato de sodio:

El citrato de sodio es la sal de sodio del ácido cítrico. Es blanco, polvo cristalino o blanco, cristales granulares, ligeramente delicuescente en aire húmedo, libremente soluble en agua, prácticamente insoluble en alcohol (46).

La sustancia es levemente irritante de la piel y las mucosas (47).

Efectos de una sobreexposición aguda: Irritación de las mucosas, irritación suave de la piel y los ojos (46,47).