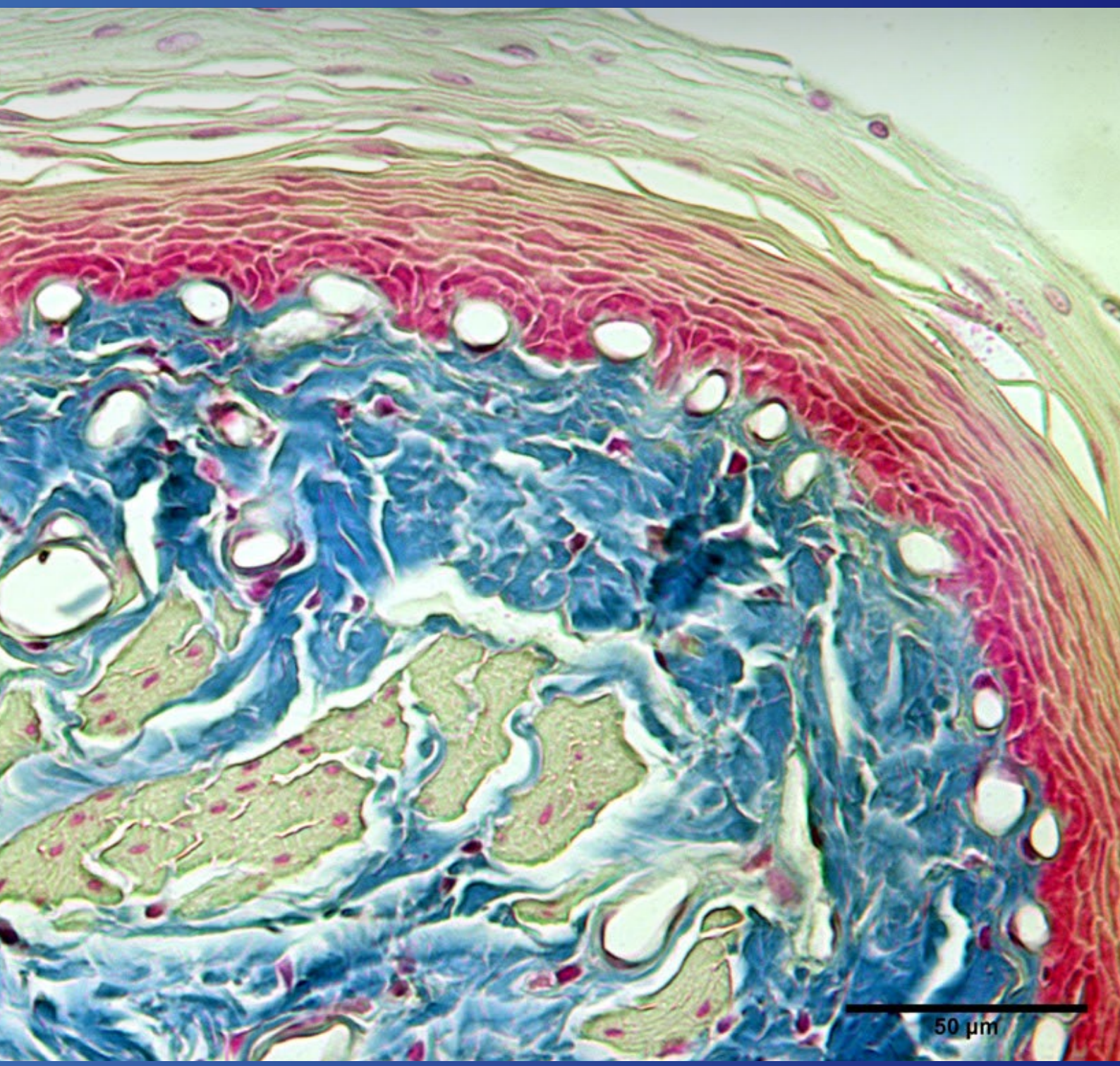
Volumen 32 . 2024

REVISTA DE LA SOCIEDADARGENTINA DE HISTOTECNOLOGÍA

ISSN1669-2713 (en línea)



SAH
SOCIEDAD ARGENTINA DE HISTOTECNOLOGÍA
/sahistotecnologia sah_histotecnologia www.ht.org.ar

Luis Marsan

Sarmiento 1967, Piso 2° Of. 21 – CABA
Buenos Aires – Argentina
Tel: +54 11 7534-2831
Cel: +54 911 6166-7629
www.luismarsan.com.ar
ventas@luismarsan.com.ar

MILESTONE
HELPING PATIENTS

Leica
BIOSYSTEMS

EVIDENT
OLYMPUS

Soluciones Integrales de Histología

Desde 1996 estamos al servicio
de la histopatología.

ÍNDICE

04/ Editorial
Carta editorial por Lic. Gabriela C. López

06/ Comisión Directiva
Objetivos y alcances

7/ 35 años de la SAH
Cartas

13/ Concurso de Imágenes
Foto ganadora del concurso de imágenes Congreso 2023

15/ Estudio urinario
Un método efectivo para el estudio del sedimento urinario en el laboratorio de histotecnología

26/ Cáncer de mama
Definición de un nuevo subgrupo en cáncer de mama pasible de tratamiento

31/ Histología
de los tejidos mineralizados

Foto de Tapa:

Corte de esófago coloreado con la técnica de coloración de Cajal Gallego. Se observa la mucosa y parte de la submucosa del órgano. Esta técnica evidencia el colágeno de la lámina propia y la submucosa de un color azul intenso que contrasta con el citoplasma de color amarillo verdoso de las células del epitelio superficial y el verde del tejido muscular. Los núcleos aparecen de color rojo por su tinción con la fucsina básica. Inmediatamente por debajo del tejido epitelial.

Autores:

Hernández, Karina; Montero, Lucía; Leites, Ana Paula.

31 HISTOLOGÍA DE LOS TEJIDOS MINERALIZADOS

Autores: *Marina Soledad Bonanno [1]; Estefanía Magali Zeni Coronel [2]; Carola Bozal [3]; Susana Noemí Zeni [4].*

1 Licenciada en Biotecnología con especialización en genética molecular. Laboratorio de Osteopatías Metabólicas. Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires (UBA), Hospital de Clínicas José de San Martín. Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA), Argentina y Catedra de Histología y Embriología, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires.

2 Medica Veterinaria. Laboratorio de Osteopatías Metabólicas. Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires (UBA), Hospital de Clínicas José de San Martín. Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA), Argentina y Catedra de Bioestadística, Facultad de Veterinaria, Universidad de Buenos Aires.

3 Dra. en Odontología y Profesora universitaria. Catedra de Histología y Embriología, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires.

4 Dra. en Ciencias Químicas y Profesora universitaria. Laboratorio de Osteopatías Metabólicas. Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires (UBA), Hospital de Clínicas José de San Martín. Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA), Argentina.

Autor correspondiente

Lic. Marina Bonanno, Laboratorio de Osteopatías Metabólicas, Av. Córdoba 2351 8vo piso (1120) CABA, Buenos Aires, Argentina. marina.-bonanno@odontologia.uba.ar

HISTOLOGÍA DE LOS TEJIDOS MINERALIZADOS

Resumen

Existen en el cuerpo humano cuatro tejidos mineralizados. El tejido óseo es el principal componente de los huesos. El esmalte, la dentina y el cemento forman parte de las piezas dentarias.

La histotecnología y la histomorfometría de tejidos mineralizados requieren conocimientos biológicos y anatómicos básicos a nivel de órganos, tejidos, células e incluso moléculas para su correcto procesamiento, así como también equipamiento especializado dada la dureza del material. Al ser más densos que el tejido blando requieren tiempos de fijación más largos e incluso pueden requerir descalcificación dependiendo de lo que se necesite estudiar. Además, las muestras óseas y dentar-

ias son un material compuesto, es decir que una muestra determinada puede contener hueso cortical, hueso trabecular, médula ósea, esmalte, dentina y cemento.

Esta particularidad no los hace tejidos menos versátiles, ya que permiten coloraciones tradicionales así como también coloraciones especiales e incluso inmunomarcaciones.

En esta revisión se hará una actualización de las características histológicas de cada tejido mineralizado y las técnicas histológicas utilizadas para su estudio.

Palabras claves

Tejido óseo; Esmalte; Dentina; Cemento; Descalcificación, Desgaste

Introducción

A diferencia de los laboratorios destinados a estudios histológicos o patológicos de rutina, el procesamiento de muestras de tejidos mineralizados presenta características únicas entre las que se encuentran la descalcificación de las muestras para su inclusión en determinados medios, la necesidad de micrótomos de alta resistencia, sierras circulares de diamante o lijas de diferente gramaje para procesar las muestras que no sean descalcificadas.

La histología descriptiva junto con la histomorfometría juegan un papel importante en el estudio y seguimiento de los cambios en las propiedades de los huesos debido a enfermedades esqueléticas sistémicas y a la reparación de fracturas y cicatrización post-extracción de piezas dentarias, o para explorar efectos de un biomaterial, nuevos tratamientos farmacológicos o la oseintegración de implantes.1-2 La histomorfometría ósea tradicional 2D permite la valoración cuantitativa del tejido óseo mediante el recuento y medición de variables microestructurales, las que permiten obtener información acerca de los procesos de formación y reabsorción ósea, de su modelado y remodelado, de su microarquitectura y de la actividad celular dinámica y estática.1

La histotecnología y la histomorfometría requieren técnica y arte. En este sentido, se necesita paciencia y manos expertas, así como conocimientos biológicos y anatómicos básicos a nivel de órganos, tejidos, células e incluso moléculas, así como también la capacidad para procesar los tejidos mineralizados.2 Es por ello, que un laboratorio dedicado a la patología clínica ósea o la histología experimental de tejidos mineralizados, tanto esqueléticos como bucales, debe contar con equipos básicos y especializados, así como también personal capacitado para atender sus necesidades específicas.2

En esta revisión se hará una actualización de las características histológicas de cada tejido mineralizado y las técnicas histológicas utilizadas para su estudio.

Tejido óseo

El sistema esquelético humano está compuesto por 206 huesos. Los huesos son órganos endócrinos formados por un conjunto de tejidos, de los cuales el principal es el tejido óseo. El tejido óseo es un tejido conectivo especializado formado por una matriz extracelular (MEC) mineralizada. Las células presentes en el tejido óseo son: osteoblastos (Obl), osteocitos (Ot), osteoclastos (Oc), células osteoprogenitoras y células de revestimiento óseo (lining cells), provenientes de 2 progenies celulares distintas.

La MEC mineralizada le otorga al tejido la dureza necesaria para llevar a cabo sus funciones clásicas de sostén, protección y locomoción.3 La trama colágena de su matriz le otorga cierta elasticidad. La combinación de ambas fases le proporciona a los huesos gran resistencia tanto a la tracción como a la compresión. Además, son el sitio de almacenamiento del calcio (Ca), fosfato (Pi) y magnesio (Mg) iónicos del organismo, por lo que cumple un rol importante en la regulación homeostática mineral.3 En el interior de los espacios y cavidades medulares, y entre sus trabéculas se ubica la médula ósea por lo que se lo considera además un órgano hematopoyético.4 Recientemente se ha demostrado que el tejido óseo también actúa como un órgano de secreción endocrina que sintetiza al menos dos hormonas: el factor de crecimiento de fibroblastos 23 (FGF-23) y la osteocalcina (OCN).5

El hueso puede ser clasificado de diferentes formas según su geometría, su grado de madurez y su organización estructural.3

Según el grado de madurez, podemos clasificarlo en hueso reticular o inmaduro y en hueso laminillar/laminar o maduro. El primero se

encuentra en el tejido embrionario, en los recién nacidos, en los callos formados durante la reparación de fracturas, en la cicatrización de los alvéolos dentarios postextracción, en las metáfisis durante el crecimiento y en patologías metabólicas óseas como la enfermedad de Paget6. Este tipo de tejido óseo se caracteriza por poseer en su MEC fibras de colágeno tipo I sin orientación definida formando un entretejido aleatorio, lo que le confiere isotropía mecánica, y un gran número de Ot por unidad de volumen, de mayor volumen y más redondeados, ubicados de forma aleatoria.3 El tejido óseo laminillar maduro deriva de la remodelación del inmaduro, pero en él las fibras de colágeno de tipo I se disponen paralelas entre sí formando laminillas que se orientan según el eje mayor del hueso, lo que le otorga anisotropía y alta resistencia mecánica. Además, posee menos número de Ot por unidad de área, de forma fusiforme, y orientados con su eje mayor paralelo a las laminillas.3

El tejido óseo laminillar maduro puede clasificarse según su estructura en esponjoso o trabecular y en compacto, cortical o Haversiano (Fig.1A). El tejido óseo trabecular está formado por trabéculas o espículas anastomosadas (de aproximadamente 200 µm de grosor) que se disponen en forma de malla; es altamente poroso o de aspecto esponjoso (lo que le da su nombre) y se ubica en el interior de los huesos (Fig.1B). En este tipo de tejido óseo las laminillas se encuentran paralelas al eje longitudinal de la trabécula; esta singular arquitectura le proporciona soporte estructural sin aumentar el peso del hueso. Entre las trabéculas de tejido óseo esponjoso queda contenida la médula ósea. Se caracteriza por ser un tejido más elástico y con mayor recambio que el hueso cortical por lo cual su microarquitectura es la primera que se afecta en patologías como la osteoporosis.7 Una de las funciones importantes del hueso trabecular es la de redirigir el estrés mecánico hacia el hueso cortical.4 El tejido óseo compacto, por su parte, es más denso, encontrándose en la superficie de los huesos y variando su espesor según su localización.3 Está compuesto por estructuras cilíndricas llamadas osteonas o sistemas de Havers (de aproximadamente 150-180 µm de grosor) dispuestas paralelas al eje mayor del hueso. Las paredes de este sistema están formadas por laminillas concéntricas alrededor del conducto central de Havers3; esta organización le permite soportar las cargas mecánicas a las cuales está sometido el esqueleto (Fig. 1C).4 Cada conducto de Havers contiene capilares, fibras nerviosas y tejido conectivo.8 Además, por medio de los conductos de Volkmann, los conductos de Havers se comunican entre sí y con las superficies externa e interna del hueso.8

La proporción entre hueso trabecular/cortical en el esqueleto total es de 1:4; sin embargo, los diferentes huesos o distintas porciones de un mismo hueso presentan proporciones diferentes entre ellos.9 La relación entre superficie y volumen es mayor en el hueso trabecular, por lo cual su actividad metabólica es 10 veces mayor que en el hueso cortical.10

El tejido óseo el único tejido capaz de repararse y renovarse a sí mismo7,10 mediante el proceso de remodelamiento óseo (del inglés bone turnover).20 El remodelamiento óseo es un proceso continuo y de por vida (que comienza en el útero y continúa hasta la muerte del individuo) mediante el cual se produce el reemplazo periódico de tejido óseo preexistente por tejido nuevo en el mismo sitio. Este proceso permite la reparación de microdaños por fatiga del material y mantenimiento de la homeostasis fosfocálcica.

Matriz Extracelular

La MEC está compuesta por dos fases, una fase orgánica rica en fibras colágenas, y una fase inorgánica representada por sales de fosfato cálcico. La porción inorgánica equivale al 65% del peso en seco del hueso4,10 y está compuesta, en su mayoría, por cristales hexagonales de hidroxiapatita de 21±9 nm de largo y 6±1,5 nm de ancho. Los principales componentes químicos de la hidroxiapatita son el Ca y el Pi, por lo cual la porción mineral del tejido contiene el 99% del Ca y el 85% del Pi del organismo.11-12 Los cristales de hidroxiapatita juegan un papel crítico no sólo en las propiedades mecánicas de soporte de peso del hueso, sino también sirven como fuente de Ca para mantener la homeostasis de los sistemas biológicos dependientes de este ión.13

La porción orgánica representa el 35% del peso del hueso seco, su parte proteica está formada en un 90% por fibras de colágeno de tipo I.9. El 10% restante de las proteínas son proteoglucanos y proteínas no colágenas entre las que

podemos citar OCN, osteonectina, osteopontina, etc y distintos factores de crecimiento como las proteínas morfogenéticas óseas (BMP).3-4 A pesar de la escasa proporción de proteínas no colágenas, estas son esenciales para el desarrollo, el crecimiento, el remodelado, la mineralización y la reparación del tejido óseo.4

Durante la formación, crecimiento y remodelado óseo, el osteoide o matriz orgánica recién formada y aún no calcificada, es lo primero que se deposita y servirá de andamiaje para el subsecuente depósito de hidroxiapatita.12 Los cristales se disponen intercalados en y entre las fibras de colágeno, donde se orientan paralelos entre sí y paralelos a las fibras de colágeno.12,14-15

Células Óseas

El componente celular del hueso es el responsable del crecimiento, mantenimiento, modelado y remodelado del tejido. Las células del linaje osteoblástico derivan de las células madre pluripotentes mesenquimáticas (MSC). En cambio, el linaje osteoclástico deriva de células progenitoras hematopoyéticas mononucleares precursores de granulocitos-macrófagos (GMP, CFU-GM).12

Osteoblastos

Los Obl son las responsables del proceso de formación ósea, es decir, sintetizan todos los componentes presentes en la MEC, tanto orgánicos como inorgánicos, además de ser las responsables de la mineralización de la MEC.12 Asimismo, liberan citoquinas que regulan la diferenciación y actividad de Oc.

Histológicamente, los Obl maduros y activos se observan como células cilíndricas o cúbicas altas (20-30 µm) que presentan un citoplasma basófilo, un núcleo esférico y excéntrico ubicado contrapuesto al sitio de depósito de MEC (Fig. 2A). Como toda célula productora de proteínas de exportación, tiene un gran desarrollo del retículo endoplasmático rugoso y del aparato de Golgi.10,15

Aparecen en grupos de 100 a 400 células formando una monocapa en la superficie donde se produce la formación ósea e interaccionan entre sí, con Ot, con las células de recubrimiento óseo y con las células de la médula ósea a través de distintos tipos de uniones celulares. Estas interacciones contribuyen al acoplamiento y a la respuesta coordinada entre las distintas poblaciones celulares.12

Los Obl presentan en su superficie y en el citoplasma gran cantidad de fosfatasa alcalina tejido inespecífica, comúnmente denominada fosfatasa alcalina ósea (FAO). Esta enzima es marcadora el linaje osteoblástico. Cumple un rol importante en el proceso de mineralización ya que es la encargada de suministrar el Pi para la formación de los cristales de hidroxiapatita.8 Luego de cumplir su función, el 60-80% de los osteoblastos muere por apoptosis, y los restantes se pueden diferenciar a los otros dos tipos celulares: a Ot o a células de revestimiento óseo (Fig. 2A).12.

Osteocitos

Los Ot son las células más abundantes del tejido óseo (90%)14; constituyen la diferenciación terminal de los Obl perdiendo la capacidad de autorrenovación y quedando inmersos en la MEC ósea que ellos mismos mineralizaron (Fig. 2A y B)10. Para diferenciarse, los Obl producen una gran cantidad de MEC, cambian la expresión de genes, reducen su volumen en casi un 70%, la cantidad de organelas y desarrollan largas proyecciones dendríticas llamadas procesos citoplasmáticos que irradian del cuerpo celular.12
Histológicamente pueden observarse los cuerpos celulares (5-20 µm) con forma fusiforme y estrellada. Los Ot se encuentran dentro de espacios o lagunas osteocíticas individuales que se adaptan a la forma de las células. Los procesos citoplasmáticos (aproximadamente 50 por Ot) quedan contenidos en canalículos dentro de MEC ósea mineralizada rodeadas por líquido intersticial.8,12,16 Estos procesos citoplasmáticos comunican a los Ot con Ot vecinos pero también se comunican con Obl, con células osteoprogenitoras y células de recubrimiento óseo ubicadas en la superficie del tejido, así como también con células de la médula ósea formando un sincicio funcional.8,12,16 De este modo, los Ot pueden recibir y secretar sustancias por difusión a través de la escasa cantidad de líquido tisular que rodea las prolongaciones en los canalículos (la difusión a través de la MEC calcificada es imposible).8.

Células de revestimiento óseo

Las células de revestimiento óseo son Obl quiescentes que, luego del cese del depósito de matriz ósea, recubren la superficie ósea (interna y externa) formando una monocapa de células en reposo donde no están ocurriendo procesos de resorción ni formación ósea.12,15 Histológicamente, estas células tienen una forma aplanada, presentan un núcleo pequeño, fusiforme e hipercromático, poco citoplasma con escasas organelas (Fig. 2B).3 La función de estas células no se encuentra completamente dilucidada. Algunas, presentan procesos canaliculares y uniones con células de revestimiento óseo adyacentes y con Ot, lo que sugiere su participación en el intercambio de minerales y otros metabolitos entre el hueso y las células de la superficie ósea o la médula ósea.12 También, estas células podrían desempeñar una función importante en la señalización celular durante el proceso de remodelación ósea, y permitir la resorción ósea al remover la fina capa de osteoide que cubre la superficie ósea quiescente.12,19.

Osteoclastos

Los Oc, cuando se encuentran en actividad, son células gigantes (hasta 100µm), redondeadas, móviles y multinucleadas, con 5-10 núcleos polarizados, ubicados contrapuestos a la superficie ósea; presentan un citoplasma acidófilo con gran desarrollo del aparato de Golgi, abundantes mitocondrias y vesículas (Fig. 2B). La mayoría de las vesículas son lisosomas primarios que contienen, entre otras sustancias, proteasas ácidas como la catepsina K, metaloproteasas de la matriz (MMP) y fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP), esta última enzima es utilizada como marcador específico de estirpe osteoclástica.3 Estas enzimas le permiten digerir la matriz inorgánica y degradar la trama orgánica del tejido. Los Oc activos se encuentran anclados directamente sobre la superficie ósea.12 Una característica típica de los Oc en actividad lo constituye la presencia del borde festoneado en la zona donde la célula entra en contacto con la superficie ósea a través del cual libera enzimas lisosomales y bombea protones por medio de una bomba de protones (H^+) de membrana. En los laterales poseen una superficie de sellado hermético, a través de integrinas de membrana, que se anclan a la osteopontina de la matriz, delimitando un compartimiento subosteoclástico denominado espacio de resorción o laguna de Howship. Su región basolateral, en contacto con vasos sanguíneos, interviene en la exocitosis del material digerido.3 Después de llevar a cabo su función de resorción, todos los Oc mueren por apoptosis.12

Tejidos Dentarios Generalidades

Los dientes son órganos duros, pequeños, de color blanco amarillento y con formas variables (Fig. 3A). Se disponen en la cavidad oral y componen, en su conjunto, el sistema dentario.27 La dentición normal de un adulto (dentición permanente) está compuesta de 8 incisivos, 4 caninos, 8 premolares y 12 molares, mientras que la dentición de un niño (dentición temporaria) está compuesta por 20 piezas, carece de premolares y solo tienen 8 molares.

Desde el punto de vista anatómico y funcional, los dientes cuentan con una corona y una raíz conectadas a la altura del cuello anatómico dentario o línea cervical. La corona es la porción de la pieza dentaria que emerge en la cavidad bucal.27 La porción radicular se encuentra inserta en el alvéolo dentario, una cavidad en los huesos maxilares.27 El hueso que forma el alvéolo se denomina hueso alveolar y es una estructura odonto-dependiente ya que se forma junto con el germen dental en formación, los ancla dentro de las arcadas dentarias y desaparece una vez producida la pérdida de dichos dientes. Histológicamente, la corona del diente está revestida por un tejido inerte, altamente mineralizado, el esmalte; que recubre a un tejido conectivo menos mineralizado que es la dentina. La porción radicular también está compuesta por dentina y revestida por otro tejido conectivo mineralizado que es el cemento. En el interior de la pieza dentaria, tanto en la corona como en la porción radicular, encontramos una cavidad que aloja al único tejido no mineralizado del diente que es la pulpa dental. El cemento asegura la permanente relación del diente con la porción cortical del hueso alveolar en el que se aloja y, entre ambos, se dispone el ligamento periodontal que actúa como tejido de unión o soporte.27 Debido a la multiplicidad de estructuras dentarias, quienes trabajan con biopsias o muestras de tejidos dentarios in situ tienen la complejidad de trabajar con los 4 tejidos mineralizados del organismo.

Esmalte

El esmalte es un tejido inerte de características únicas dentro de los tejidos mineralizados. Se encuentra expuesto a la cavidad oral y protege, en forma de casquete, a la dentina y a la pulpa coronaria (Fig. 3A y C). Es el tejido mineralizado de mayor dureza, ya que en su MEC posee sólo un 1-2% de componentes orgánicos y 95% de componentes minerales.28,29 El componente mineral está formado por cristales de hidroxiapatita dispuestos en forma de varilla o prismas. Cada prisma tiene 3-10 µm de diámetro y se extiende a lo largo de todo el grosor del esmalte, con orientación oblicua y trayectoria ondulada.28 Los prismas se agrupan, paralelos unos a los otros, en fascículos, rodeadas por una escasa vaina de materia orgánica.29 La orientación y asociación de los prismas produce la microestructura única que confiere al esmalte sus propiedades mecánicas, haciéndolo el tejido más duro del cuerpo de los vertebrados.29

Los ameloblastos son las células encargadas de elaborar, secretar y, posteriormente, mineralizar la matriz proteica del esmalte.30 Completada la amelogénesis, o formación del esmalte, los ameloblastos involucionan y forman una monocapa protectora en la superficie de la corona. Cuando el diente es exfoliado, es decir emerge en la cavidad bucal, esta monocapa se pierde.28 Es por ello que, el esmalte, una vez formado, no puede repararse ni reemplazarse biológicamente ante los daños, ya que es acelular y no se encuentra vascularizado ni inervado.30

La alta dureza del esmalte lo hace a su vez muy frágil, es por eso por lo que para mantener su integridad necesariamente descansa sobre un tejido más resiliente y elástico como es la dentina.

Dentina

La dentina es el tejido conectivo especializado mineralizado más abundante de la pieza dentaria y forma su eje estructural (Fig. 3).28 En su interior delimita una cavidad que aloja la pulpa, llamada cámara pulpar a nivel de la corona, y conductos radiculares a nivel de las raíces.

La composición química de la dentina es de un 70% de materia inorgánica en forma de cristales de hidroxiapatita, 18-20% de materia orgánica principalmente compuesta por colágeno tipo I, y 10% de agua.28 Aunque se describe la estructura de la dentina de forma general, se han detectado distintos tipos de dentina en una misma pieza dentaria (dentina del manto, circumpulpar, intertubular y peritubular).32 La dentina en condiciones de normalidad no está expuesta a la cavidad bucal, sino que en la porción coronal se encuentra recubierta, en forma de casquete por el esmalte, mientras que la dentina radicular se encuentra recubierta por el cemento.

En la estructura de la dentina se pueden distinguir dos componentes: la matriz mineralizada y los túbulos dentinarios. Estos túbulos recorren todo el espesor de la dentina, presentando una morfología en forma de S itálica que se aplana en la zona del cuello de la pieza, y alojan a los procesos odontoblásticos, que son largas proyecciones que emiten los odontoblastos.28 Los odontoblastos son las células que producen, secretan y mineralizan la MEC de la dentina. Presentan una morfología columnar más alta en la zona coronal y disminuyendo su altura hacia el ápice de la pieza. Los cuerpos celulares de los odontoblastos se sitúan en el límite con la pulpa y emiten un único proceso citoplasmático por célula hacia el interior de la dentina que transcurre por dichos canalículos y cuyo largo es del espesor de la dentina e incluso puede incluirse en el esmalte.28 Es por ello que la pulpa y la dentina forman el complejo dentino-pulpar que constituye una unidad estructural, fisiológica y funcional.28 Entre la dentina y el cuerpo de los odontoblastos se encuentra la predentina, que es una capa de dentina no mineralizada.

La dentina proporciona soporte al esmalte, previniendo fracturas durante la carga oclusal. También protege la pulpa de agentes microbianos y otros estímulos potencialmente dañinos.33

Luego de su formación, la dentina en condiciones fisiológicas es un tejido relativamente estable que no sufre remodelado constante como el tejido óseo.34 Sin embargo, sí pueden observarse reabsorciones dentinarias ante condiciones patológicas.34 Una particularidad es que la dentina se forma durante toda la vida de la pieza dentaria produciendo la obstrucción de la cámara pulpar y conductos radiculares (dentina secundaria) o en respuesta a determinadas injurias (dentina terciaria).33.

Cemento

El cemento también es un tejido conectivo especializado y mineralizado que, junto con el ligamento periodontal y el hueso alveolar, forman el periodonto de inserción de la pieza dentaria (Fig. 3A, D y E). La MEC está formada por un 50% de compuestos inorgánicos en forma de cristales de hidroxiapatita y 20% de componentes orgánicos principalmente colágeno tipo I.28 Los cristales minerales alcanzan un tamaño maduro similar al de los cristales minerales del tejido óseo y de la dentina.31

En los dientes completamente formados y funcionales, el cemento recubre la totalidad de la dentina radicular.31 Es un tejido que no se encuentra inervado ni vascularizado y carece de remodelado constante aunque continúa creciendo en espesor a lo largo de la vida.31 Es producido, secretado y mineralizado por células denominadas cementoblastos.28

Existen dos tipos de cemento: el cemento acelular, de formación más lenta que ocupa 2/3 de la porción radicular y el cemento celular que se ubica en el tercio inferior de la pieza dentaria y se caracteriza por la presencia de cementoblastos que quedaron incluidos en la MEC mineralizada denominados cementocitos (Fig. 3D y E). Al igual que los Ot, los cementocitos tienen forma fusiforme, permanecen en sus lagunas y emiten largas prolongaciones pero únicamente hacia la superficie del tejido para nutrición, sin establecer contacto con cementocitos vecinos.31

Técnicas Histológicas para Tejidos Mineralizados

Como para cualquier muestra biológica, el proceso de fijación es determinante para conservar las estructuras. En patología clínica, así como en investigación, la fijación con formol buffer neutro al 10% es el método de elección para el procesamiento posterior en parafina y coloración de hematoxilina-eosina.2

Es importante recordar que los tejidos mineralizados son mucho más densos que el tejido blando y los tiempos de fijación deben ajustarse en consecuencia. Además, el hueso es un material compuesto, es decir que una muestra determinada puede contener hueso cortical y hueso trabecular así como también médula ósea que es un tejido blando. Para muestras que contienen hueso trabecular y médula ósea, una regla general es que el formol al 10% tiene una penetración de 10 mm cada 24 hs a presión y temperatura ambiente. Una muestra con hueso cortical tendrá una tasa de fijación mucho más lenta, de aproximadamente 2-3 mm cada 24 hs.2 Tanto para una buena fijación como para una buena decalcificación el tamaño de la muestra de tejidos mineralizados no debe superar los 4-6 mm.

A grandes rasgos, existen dos técnicas histológicas para poder estudiar los tejidos mineralizados: por desgaste y por descalcificación, las cuales describiremos a continuación.

Técnica histológica por descalcificación

La descalcificación de las muestras mineralizadas permite tratar el material como cualquier tejido blando. Para ello se requiere la eliminación del componente inorgánico de las muestras mineralizadas, es decir, disolver el complejo de hidroxiapatita. Una vez eliminados, la matriz de componentes orgánicos queda intacta así como también las células y se continúa con el procesamiento de rutina, embebiendo el material en parafina.2

Para descalcificar estas muestras se requiere de la inmersión de la muestra en una solución ácida, una solución quelante de calcio o una solución que conste de un complejo ácido-quelante. El ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) es el quelante más utilizado para la descalcificación en concentraciones de hasta el 14%, siendo las formulaciones más usadas la solución al 5% con pH 7.0 y la solución al 10% con pH 7.0-7.4.2 Los ácidos inorgánicos fuertes, como el ácido clorhídrico o el ácido nítrico, proporcionan una descalcificación rápida pero podrían causar daños tisulares graves y/o alterar los resultados de la tinción. Por el contrario, los ácidos orgánicos débiles, como el ácido fórmico, el ácido pícrico o el ácido acético y los agentes quelantes, no son tan agresivos para los tejidos y preservan su integridad. Sin embargo, su uso requiere un tiempo de descalcificación considerable; por ejemplo, la descalcificación con EDTA podría llevar semanas o meses, incluso para muestras de tamaño pequeño.35

Las ventajas de esta técnica es que permite el procesamiento posterior sin equipamientos especiales. Permite coloraciones clásicas como hematoxilina-eosina, tricrómicos o especiales dependiendo lo que se requiera estudiar. (Fig.1B, Fig 2 y Fig. 3B y D) Además, permite realizar inmunohistoquímica de

tejidos adaptando los protocolos a las especificaciones del fabricante de cada anticuerpo, en particular el método de fijación y de descalcificación que permita mantener intacta la inmunoreactividad y evitar el enmascaramiento antigénico.2

Entre las coloraciones especiales podemos destacar el tricrómico de Masson-Goldner que permiten determinar osteoide de la matriz mineralizada. Distinguiendo la matriz ósea madura de verde, el osteoide de rojo y el cartílago calcificado de verde muy pálido. La impregnación argéntica de Von Kossa se utiliza para la detección de iones fosfato y carbonatos que se encuentran ligados a Ca, distinguiendo el material mineralizado en negro y osteoide en rojo. Otros métodos de tinción comunes para la histología ósea incluyen azul de metileno, fucsina, azul de toluidina, Giemsa y tricrómico de Masson. El azul de toluidina permite la identificación de matriz ósea mineralizada, osteoide y tejidos blandos.2

Una desventaja de esta técnica cuando se trabaja con piezas dentarias es que perdemos completamente el esmalte ya que es un tejido compuesto por 95% de componentes minerales. Además, perdemos las estructuras secundarias formadas por la matriz mineralizada. Es por ello que, dependiendo lo que se desee estudiar puede no ser la técnica adecuada.

Técnica histológica por desgaste

Esta técnica permite trabajar con las muestras sin descalcificar, por lo que requiere que se trabaje con sierras y micrótomos especiales con cuchillas de vidrio, diamante o con filo de carburo de tugsteno; o que se lije el material con lijas al agua de tamaño de grano creciente, lo que resulta muy laborioso. (Fig.1C y Fig. 3C y D)

Una ventaja de esta técnica es que mantiene intacta la estructura mineralizada. Las desventajas son que, cuando trabajamos con lijas, no permite tinciones de ningún tipo y el material normalmente es más grueso y perdemos los componentes orgánicos y células en el proceso.

Una técnica que me permite utilizar los métodos de coloración convencionales para tejidos embebidos en parafina incluso realizar inmunohistoquímica e histomorfometría dinámica trabajando con el tejido no descalcificado es la inclusión del material en resinas plásticas. Los medios de inclusión de resina más comunes son el metacrilato de glicol, el metacrilato de metilo y las resinas epóxicas.2 El procesamiento técnico de estos tacos difiere poco de los embebidos en parafina los tiempos de coloración son más prolongados y requieren optimización. Este procesamiento permite la observación tanto del hueso mineralizado como del osteoide no mineralizado, conservando los componentes celulares, además de proporcionar información esencial sobre la formación y resorción ósea.35 Además, permite procesar muestras que contienen implantes hechos de materiales muy duros, como metales, cerámicas y polímeros que no se pueden trabajar por descalcificación permitiendo la evaluación de la interfaz hueso-implante en secciones no descalcificadas.35

Técnica para el estudio de formación y remodelamiento dinámico

El marcado del tejido óseo con sustancias marcadoras intravitales permite la medición cuantitativa de la formación ósea y de la dinámica de remodelación ósea. Se utilizan fluorocromos que se unen al Ca y pueden visualizarse en muestras histológicas por su fluorescencia bajo excitación con luz ultravioleta (UV). Luego de administrados, se unen a sitios de formación de nuevo tejido óseo, dentina, esmalte en formación y cemento, dejando una marca en forma de banda fluorescente. Ya que los fluorocromos forman complejos con el Ca de los tejidos, la histología ósea no descalcificada es requisito para su procesamiento. Los fluorocromos más utilizados son la tetraciclina (verde amarillento) y sus derivados, alizarina (rojo), calceína (verde) y naranja de xilenol (naranja).2 Los fluorocromos deben administrarse en intervalos de tiempo conocidos para poder cuantificar la cantidad de tejido mineralizado formado y su tasa de remodelamiento.

Conclusiones

La aplicación de técnicas de tinción histoquímica e inmunohistoquímica es fundamental para el análisis de cambios fisiológicos y patológicos en los tejidos. Aunque el procesamiento de tejidos mineralizados es más trabajoso, requiere equipamiento especial y una orientación particular a la

hora de realizar los cortes, no los hace tejidos menos versátiles. Permiten coloraciones especiales e incluso inmunomarcaciones, dependiendo de lo que se quiera estudiar. Es esencial realizar de antemano protocolos teniendo en cuenta sus requerimientos especiales que incluyan, dependiendo el tipo de técnica, el tipo de descalcificación, el tipo de inclusión, la elección de las técnicas de tinción o la selección de anticuerpos apropiados para la inmunomarcación.

Conflicto de interes

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Financiamiento

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

Agradecimientos

A la Cátedra de Histología y Embriología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Buenos Aires (FOUBA) por formarme en este apasionante mundo y por concederme el uso de las imágenes de tejido óseo y diente por desgaste. A las histotecnólogas Mariela Lacave y Paula Rocha por su constante enseñanza, paciencia y ardua labor.

Bibliografia

1. Malhan D, Muelke M, Rosch S, et al. An optimized approach to perform bone histomorphometry. Front Endocrinol. 2018; 9:666.

2. An YH, Martin KL. Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage. Humana Press; 2003. doi:10.1007/978-1-59259-417-7

3. Ross MH, Pawlina W. Chapter 8. Bone Tissue. Histology: A Text and Atlas. 7ma ed. Wolters Kluwer; 2015:233-274.

4. Burr DB, Akkus O. Chapter 1. Bone Morphology and Organization. In: Basic and Applied Bone Biology. Second Edition. Elsevier; 2019:3-25.

5. Nikolai J, Sipos W, Hofbauer LC, Rachner TD, Martina R. Skeletal endocrinology: where evolutionary advantage meets disease. Bone Res. 2021; 9(1). https://doi.org/10.1038/s41413-021-00149-x

6. del Pino Montes J, Gudino LC, Sánchez MD, Calero I, Carranco TE, Moreno AQ. Enfermedad ósea de Paget, osteomalacia y sarcopenia. Med-Programa Form Médica Contin Acreditado. 2014; 11(60):3555-3566.

7. Mallorie A, Shine B. Normal bone physiology, remodelling and its hormonal regulation. Surg Oxf. 2022; 40(3):163-168. https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2021.12.001

8. Brüel A, Christensen E, Tranum-Jenesen J, Qvortrup K, Geneser F. Geneser Histología. 4ta ed. Editorial Médica Panamericana; 2015: 261-280.

9. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. Clin J Am Soc Nephrol. 2008; 3(3):S131-S139.

10. Fernández Tresguerres I, Gracia A, Canto Pingarrón MD, Blanco Jérez L. Physiological bases of bone regeneration I: Histology and physiology of bone tissue. 2006; 11:E47-51.

11. Unal M, Creecy A, Nyman JS. The role of matrix composition in the mechanical behavior of bone. Curr Osteoporos Rep. 2018; 16:205-215.

12. Bellido TM, Plotkin LI, Bruzzaniti A. Chapter 3. Bone Cells. In: Basic and Applied Bone Biology. Second Edition. Elsevier; 2019: 27-45.

13. Goltzman D, Mannstadt M, Marcocci C. Physiology of the calcium-parathyroid hormone-vitamin D axis. Vitam Clin Med. 2018; 50:1-13.

14. Bailey AJ, Wotton SF, Sims TJ, Thompson PW. Biochemical changes in the collagen of human osteoporotic bone matrix. Connect Tissue Res. 1993; 29(2):119-132.

15. Arnett T. Manual Práctico de Osteoporosis y Enfermedades del Metabolismo Mineral. Capítulo 1. Estructura y remodelado del hueso. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Universidad de CantabriaSantander; 2004.

16. Schaffler MB, Cheung WY, Majeska R, Kennedy O. Osteocytes: master orchestrators of bone. Calcif Tissue Int. 2014; 94(1):5-24.

17. Bozal CB. Los osteocitos como mecanosensores del hueso. Actual Osteol. 2013; 9(2): 176-193.

18. Naot D, Musson DS, Cornish J. The activity of peptides of the calcitonin family in bone. Physiol Rev. 2019; 99(1):781-805.

19. Streicher C, Heyny A, Andrukhova O, et al. Estrogen regulates bone turnover by targeting RANKL expression in bone lining cells. Sci Rep. 2017; 7(1):1-14.

20. Reynaga Montecinos B, Zeni SN. Marcadores bioquímicos del remodelamiento óseo: Utilidad clínica. Acta Bioquímica Clínica Latinoam. 2009; 43(2):177-193.

21. Hardy E, Fernandez-Patron C. Destroy to rebuild: the connection between bone tissue remodeling and matrix metalloproteinases. Front Physiol. 2020; 11:47.

22. Malluche HH, Mawad H, Monier-Faugere MC. Bone biopsy in patients with osteoporosis. Curr Osteoporos Rep. 2007; 5(4):146-152. doi:10.1007/s11914-007-0009-x

23. Porras O. Osteopetrosis. Rev Médica Hosp Nac Niños Dr Carlos Sáenz Herrera. 1999; 34:69-75.

24. Arboleya L, Braña I, Pardo E, Loredo M, Queiro R. Osteomalacia in Adults: A Practical Insight for Clinicians. J Clin Med. 2023; 12(7):2714.

25. Miller WL, Imel EA. Rickets, vitamin D, and Ca/P metabolism. Horm Res Paediatr. 2022; 95(6):579-592.

26. Whyte MP, Thakker RV. Rickets and osteomalacia. Medicine (Baltimore). 2013; 41(10):594-599.

27. Figún ME, Garino RR. Anatomía Odontológica funcional y aplicada. 2nd ed. El Ateneo; 2017.

28. Gómez de Ferraris ME, Campos Muñoz A. Histología y Embriología Bucodental. 2da ed. Panamericana; 2002.

29. Vaissier Welborn V. Enamel synthesis explained. Proc Natl Acad Sci. 2020; 117(36):21847-21848. doi:10.1073/pnas.2014394117

30. Farooq I, Bugshan A. The role of salivary contents and modern technologies in the remineralization of dental enamel: a narrative review. F1000Research. 2020; 9:171. doi: 10.12688/f1000research.22499.3.

31. Selvig KA. Dental cementum: the dynamic tissue covering of the root. Periodontol 2000. 1997; 13:41-75.

32. Goldberg M, Kulkarni AB, Young M, Boskey A. Dentin: Structure, Composition and Mineralization: The role of dentin ECM in dentin formation and mineralization. Front Biosci Elite Ed. 2011; 3(2):711-35. doi: 10.2741/e281.

33. Tjäderhane L. Dentin Basic Structure, Composition, and Function. In: Versiani MA, Basrani B, Sousa-Neto MD, eds. The Root Canal Anatomy in Permanent Dentition. Springer International Publishing; 2019:17-27. doi:10.1007/978-3-319-73444-6_2

34. Kim SG. Biological molecules for the regeneration of the pulp-dentin complex. Dent Clin. 2017; 61(1):127-141.

35. Peev S, Parushev I, Yotsova R. A Modified Protocol for Staining of Undecalcified Bone Samples Using Toluidine Blue. A Histological Study in Rabbit Models. Appl Sci. 2024; 14(1):461.