

COMUNICACIÓN CORTA

Técnica alternativa para estudios histológicos de hueso sin descalcificar por Microscopia Electrónica de Barrido

Carlos Lariot Sánchez, Sandra Rodríguez Salgueiro,* Yahima Harvey Pedroso,* Tania Valdés Prieto,* Carlos Toledo Sánchez, Eddy Sánchez Noda*** y Manuel Jacas Tornés.***

Instituto de Ciencia y Tecnología de Materiales y Reactivos, Universidad de la Habana. Correo electrónico: lariot@imre.oc.uh.cu.
*Laboratorio de Microscopia Electrónica, Dirección de Biotecnología, Centro Nacional de Investigaciones Científicas. **Laboratorio Central de Criminalística, Ministerio del Interior. ***Complejo Científico Ortopédico Internacional "Frank País".

Recibido: 29 de marzo de 2007. Aceptado: 9 de julio de 2007.

Palabras clave: hueso, histología, descalcificación, Microscopia Electrónica de Barrido, hidroxiapatita, óxido de titanio.
Key words: bone, histology, decalcification, Scanning Electron Microscopy, hidroxiapatite, titanium oxide.

Los estudios histológicos de hueso habitualmente se realizan mediante la observación de secciones finas de tejido óseo por Microscopia Óptica (MO) o Microscopia Electrónica de Transmisión (MET).¹⁻³ Dada la dificultad que representa el corte de muestras duras para el estudio histológico por inclusión y corte por lo general, se requiere que previamente el hueso sea descalcificado.^{4,5} Esto se hace más crítico cuando se trata de huesos implantados con biomateriales de dureza similar o superior a la del hueso cortical,⁶⁻⁸ donde es importante que se efectúe el corte sin alterar el tejido que rodea al biomaterial implantado.

Por otra parte, no es aconsejable descalcificar las muestras de estudio de crecimiento óseo por bioinducción, dada la gran cantidad de artefactos que la descalcificación introduce.⁹ Tampoco debe realizarse la descalcificación en huesos con implantes de biomateriales, ya que podría causar la degradación del biomaterial de implante y la descalcificación del nuevo tejido alrededor del implante.

Los materiales biocompatibles y osteoinductores más usados en la fabricación de implantes osteoarticulares o de relleno de cavidades resultantes de lesiones en el hueso son metales y cerámicas de elevada dureza. La hidroxiapatita densa sintética es un biomaterial de implante duro que ha sido empleado sistemáticamente por ser muy similar al constituyente del hueso.¹⁰ El óxido de titanio y los biomateriales metálicos en general, se utilizan en aquellas aplicaciones clínicas que requieren soportar carga, por sus propiedades mecánicas y por su resistencia a la corrosión en el organismo humano.¹¹

La Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) brinda imágenes superiores a las del microscopio óptico por su mejor resolución y mayor profundidad de foco y constituye una buena alternativa cuando se dificulta la técnica preparativa para MET.

Con estos antecedentes, se decidió realizar el estudio histológico de huesos con implantes de hidroxiapatita y de titanio por una técnica alternativa diseñada al efecto, en la cual se combinó la preparación tradicional para MET (técnica de inclusión en resinas)¹² con el montaje y recubrimiento de muestras que se realizan para MEB omitiendo el paso inicial de descalcificación.

Se emplearon fragmentos de fémur de conejos que contenían implantes y se mantuvieron congelados durante varios días. Se realizó un corte de las muestras con sierra diamantada en una zona lo suficientemente alejada de la región de interés para evitar daños en las estructuras y tejidos a estudiar. Las muestras se fijaron en glutaraldehído 5 % en una disolución reguladora de fosfato de sodio 0,1 mol/L, pH 7,4, se postfijaron en tetróxido de osmio 1 % diluido en la misma disolución reguladora, se deshidrataron en disoluciones de acetona de concentración creciente desde 30 % hasta acetona pura, se infiltraron en óxido de propileno y se incluyeron en resina Spurr.¹³ Los pasos de fijación, deshidratación e infiltración se realizaron a presiones negativas, haciendo un vacío en el recipiente para eliminar el aire ocluido en las muestras o encerrado en burbujas en las disoluciones.

Los bloques de inclusión polimerizados se cortaron con una sierra diamantada y se pulieron usando papel de esmeril en gradación ascendente y paño con pasta de diamante para pulido fino. El desbaste de la muestra hasta la zona de interés se realizó puliendo por etapas en papeles de esmeril de granos cada vez más finos hasta el grado 600, sin aplicar gran presión contra el esmeril y usando agua como líquido refrigerante y limpiador. El pulido fino se hizo en paño cargado con pasta de diamante para pulido metalográfico fino, usando un lubricante oleoso. Los bloques pulidos se montaron en portaobjetos metálicos pegándolos mediante pintura

Correspondencia:

Carlos Lariot Sánchez

Instituto de Ciencia y Tecnología de Materiales y Reactivos, Universidad de la Habana, Calzada de Zapata y Calle G, El Vedado, Plaza de la Revolución, Ciudad de La Habana, Código Postal 10 400, Cuba. Correo electrónico: lariot@imre.oc.uh.cu

de plata coloidal y se recubrieron con una fina capa de oro (40 nm). Las muestras se observaron en un Microscopio Electrónico de Barrido Tescan Vega TS 5130 SB mediante las modalidades de electrones secundarios y electrones retrodispersados. Se obtuvieron imágenes digitales de las muestras que fueron procesadas con fines cosméticos.

En esta técnica alternativa la muestra se incluye en una resina epóxica de gran poder de infiltración (Spurr) a presiones inferiores a la atmosférica para lograr extraer el aire contenido en el tejido durante este proceso y llenar con resina todos los espacios resultantes. El pulido final con pasta de diamante brinda una superficie lisa del corte transversal de la muestra y sirve de ataque preferencial a las zonas más blandas de ella resultando en una extracción selectiva de material. Esto permite conformar un relieve en función de la dureza de las partes presentes en cada lugar de la muestra. La muy fina capa conductora de oro, con que se recubre la zona pulida para la observación al MEB, hizo posible la buena definición de las estructuras histológicas en las imágenes por emisión secundaria de electrones y permitió hacer el estudio contando con una buena resolución.

Las micrografías muestran imágenes de la sección transversal del hueso en la que aparecen muy bien definidos el hueso duro cortical y el canal medular con gránulos de hidroxiapatita implantados (Fig. 1).

La figura 2 muestra un fragmento de hueso de conejo con el implante de un pedazo de varilla de titanio. Esta técnica permite además, hacer análisis de las muestras por energía dispersiva de rayos X (EDX) y es aplicable a huesos provenientes de necropsias o a biopsias de hueso que contengan cualquier biomaterial implantado, incluyendo biomateriales metálicos de alta dureza.

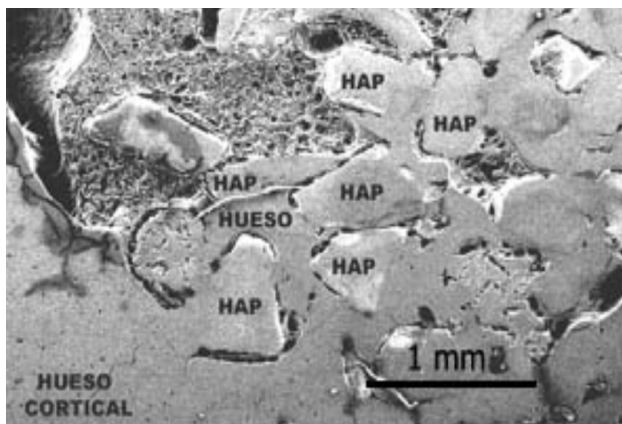


Fig. 1. Imagen de electrones secundarios de la sección transversal de fémur de conejo. El canal medular va siendo ocupado por el desarrollo de las trabéculas de hueso cortical alrededor de los gránulos de hidroxiapatita (HAP) implantados.

Como técnica alternativa es muy adecuada al estudio de las propiedades osteoconductoras y osteoinductoras de los materiales de implante, ya que permite analizar la integración ósea lograda en implantes de diferentes biomateriales tan o más duros que el propio hueso sin necesidad de descalcificar.

No se conocen antecedentes de esta variante preparativa para MEB en la que el estudio morfológico se lleva a cabo analizando la superficie atacada por el propio pulido. En esta técnica se produce, de acuerdo con la dureza y disolución relativa de los componentes de la muestra, un grabado selectivo mediante el pulido en paño con pasta de diamante, el cual descubre el relieve de la muestra que permite su estudio morfológico.

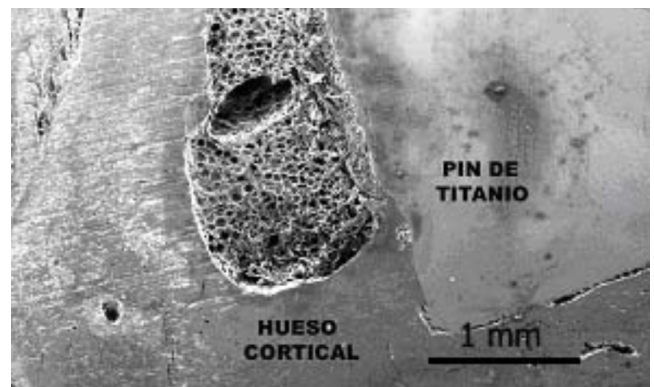


Fig. 2. Imagen de electrones secundarios de la sección transversal de un fragmento de fémur de conejo implantado con una varilla fijadora de titanio. El titanio limita el crecimiento del hueso cortical, el cual crece hasta contactar el metal.

BIBLIOGRAFÍA

- Coathup M.J., Bates P., Cool P., Walker P.S., Blumenthal N., Cobb J.P. and Blunn G.W. Osseo-mechanical induction of extra-cortical plates with referente to their surface properties and geometric designs. **Biomaterials**, **20**, 793-800, 1999.
- Huang Y.H., Xiropaidis A.V., Sorensen R.G., Albandar J.M. and Hall J., Wikesjö U.M.E. Bone formation at titanium porous oxide (TiUnite™) oral implants in type IV bone Bone formation at titanium porous oxide (TiUnite™) oral implants in type IV bone. **Clin. Oral Impl. Res.**, **16**, 105-111, 2005.
- Porter A.E., Nalla R.K., Minora A., Jinschek J.R., Kisielowska C., Radmilovic V., Kinney J.H., Tomsia A.P. and Ritchie R.O. A transmission electron microscopy study of mineralization in age-induced transparent dentin. **Biomaterials**, **26**, 7650-7660, 2005.
- Reddy P.N., Lakshmana M. and Udupa U.V. Effect of Praval bhasma (Coral calx), a natural source of rich calcium on bone mineralization in rats. **Pharmacol. Res.**, **48**, 593-9, 2003.
- Skinner R.A. Decalcification of Bone Tissue. In: Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage. Part III. Tissue harvesting, Fixation and Preparation. Yuehuei H. A, Kylie L. M (ed.), Humana Press, Totowa, Estados Unidos, 167-84, 2003.
- Matthew I.R. and Frame J.W. Ultrastructural analysis of metal particles released from stainless steel and titanium miniplate components in an animal model. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, **56**, 45-50, 1998.
- De Aza P.N., Luklinska Z.B., Anseau M.R., Guitian F. and De Aza S. Transmission Electron Microscopy of the interface between bone and pseudowollastonite implant. **J. Microscopy**, **201**, 33-43, 2001.
- Kusakabe H., Sakamaki T., Nihei K., Oyama Y., Yanagimoto S., MasaruIchimiya C., Kimurad J. and Toyama Y. Osseo-integration of a hydroxyapatite-coated multilayered mesh stem. **Biomaterials**, **25**, 2957-2969, 2004.
- Hedberg E.L. Kroese-Deutman H.C., Shih C.K., Lemoine J.J., Liebschner M.A., Miller M.J., Yasko A.W., Crowther R.S., Carney D.H., Mikos A.G. and Jansen J.A. Methods: A comparative analysis of radiography, microcomputed tomography, and histology for bone tissue engineering. **Tissue Eng.**, **11**, 1356-67, 2005.
- LeGeros R.Z. Properties of Osteoconductive Biomaterials: Calcium Phosphates. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, **395**, 81-98, 2002.
- Giavaresia G., Ambrosio L., Battiston G.A., Casellato U., Gerbasi R., Finia M., Aldini N., Martini L., Rimondini L. and Giardino R. Histomorphometric, ultrastructural and microhardness evaluation of the osseointegration of a nanostructured titanium oxide coating by metal-organic chemical vapour deposition: an *in vivo* study. **Biomaterials**, **25**, 5583-5591, 2004.
- Porter A.E., Taaka P., Hobbbs L.W., Coathup M.J., Blunn G.W. and Spectord M. Bone bonding to hydroxyapatite and titanium surfaces on femoral stems retrieved from human subjects at autopsy. **Biomaterials**, **25**, 5199-5208, 2004.
- Spurr A.R. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. **J. Ultrastruct. Res.**, **26**, 31, 1969