

Tema 6: Decalcificación

1. Introducción:

Se denomina decalcificación a la completa eliminación de las sales Calcio presentes en los tejidos tras haber realizado su fijación. Éste procedimiento se realiza de forma sistemática sobre tejidos mineralizados (dientes y huesos= y esporádicamente sobre material anatomopatológico con calcificaciones que puedan dificultar o impedir la observación al microscopio. Solo está desaconsejado decalcificar el tejido en las enfermedades óseas metabólicas donde nos interesa valorar el equilibrio entre síntesis y destrucción de matriz ósea y su grado de calcificación. En éste último caso utilizaríamos un microtomo motorizado específico para tejidos duros.

2. Decalcificación química:

Los principales agentes decalcificadores están formados por ácidos fuertes o débiles empleados solos o en conjunción a distintos líquidos fijadores. Los principales reactivos que se utilizan son ácidos inorgánicos fuertes como el ácido nítrico o el clorhídrico y débiles como el ácido sulfuroso y también ácidos orgánicos como el ácido fórmico el acético y el tricloroacético. Todas estas sustancias tienen la ventaja de ser estables, baratas y de fácil disponibilidad.

Un líquido decalcificante ideal debe reunir una serie de cualidades. Estas cualidades son las siguientes:

1. Debe producir una eliminación completa de los depósitos cálcicos.
2. No debe provocar efectos indeseables o artefactos sobre los tejidos tratados.
3. No interferir con los procedimientos de tinción que se emplean posteriormente.

El agente más rápido y eficaz es el ácido nítrico y se emplea en soluciones del 5 al 7.5%. El problema que tiene es que utilizado a concentración elevada, por encima del 6% es que tiende a producir gran destrucción tisular que se atenúa en disolución alcohólica.

Ácido clorhídrico: no es tan rápido como el nítrico pero produce menor agresión tisular y no precisa lavado post-decalcificación.

Los ácidos orgánicos: producen escasos artefactos tisulares y apenas interfieren en los resultados finales de la tinción pero actúan muy lentamente y requieren la renovación frecuente del líquido decalcificante. Por eso están indicados exclusivamente cuando la muestra es tejido óseo esponjoso y contiene solo pequeñas espículas calcificadas.

En el proceso de decalcificación hay que seguir unas normas que son:

1. Para disminuir en lo posible los efectos alterativos decalcificador, la fijación debe haberse completado antes de iniciar el proceso.
2. La concentración del agente decalcificante debe ser óptima con un volumen de líquido decalcificador mínimo de 1/20 que debe ser renovado con frecuencia.
3. Para acelerar el proceso los bloques deben ser suspendidos en el centro del recipiente porque en el fondo se acumula mayor concentración de sales cálcicas.

4. La temperatura ideal para realizar la decalcificación se encuentra en torno a los 25°C. Por encima de ésta temperatura el proceso de decalcificación se acelera pero también lo hace el de descomposición del tejido.
5. La agitación suave ya sea manual o mecánica generalmente acelera el proceso.
6. A veces la adición de alguna resina de intercambio iónico. Al medio de decalcificación acelera el proceso porque atrapa los iones de Calcio liberados por el decalcificador químico.
7. Después de cualquier proceso de decalcificación química donde se haya empleado ácido, el exceso de éste último ha de ser eliminado mediante lavados en soluciones neutralizantes, lo mejor el agua corriente. A veces para disminuir el edema en las fibras colágenas, se da un lavado con una solución de sulfato sódico al 5%.
8. La coloración de tejidos decalcificados puede ser interferida por un exceso residual de los ácidos empleados para eliminar las sales cálcicas por este motivo a veces se tratan los cortes con una solución acuosa de carbonato de Litio al 1% para asegurar la neutralización completa.

3. Soluciones decalcificantes más usadas:

SOLUCIÓN ACUOSA DE ACIDO NITRICO:

Ac. Nítrico concentrado.5 mL

Agua destilada.....95 mL

El caso de que la solución sea alcohólica la proporción de ácido nítrico debe ser del 7.5%. El tiempo medio de decalcificación para un bloque óseo de 5mm de espesor es de 12 a 24 horas.

Ventajas:

1. provoca rápida decalcificación
2. Causa baja retracción tisular.
3. Mejor coloración de los núcleos que la solución de formol y nítrico
4. No es necesario neutralizar el agente decalcificante sino que puede pasar directamente el tejido a etanol de 70° para iniciar la deshidratación.

Inconvenientes:

1. La prolongación excesiva del tiempo de decalcificación suele anular la fijación previa y alterar progresivamente el tejido.

FORMULINA – ÁCIDO NÍTRICO:

Formalina.10 mL

Ác. Nítrico concentrado10 mL

Agua destilada...80 mL

Tiempo medio de calcificación para un bloque de tejido óseo de 5 mm de espesor es de 1 a 3 días.

Ventajas:

1. Es de acción relativamente rápida.
2. Provoca menos alteraciones titulares que la solución acuosa de ácido nítrico.
3. Por su facilidad de manejo es la solución decalcificante más utilizada para técnicas histológicas de rutina.

Inconvenientes:

1. Dificulta la tinción nuclear
2. Antes de su procesamiento los tejidos requieren neutralización en sulfato sódico al 5% y un lavado posterior en agua corriente al menos durante 2 horas.

SOLUCIÓN ACUOSA DE ÁCIDO FÓRMICO:

Ácido fórmico al 90%.....5–10 mL

Agua destilada.90–95 mL

Tiempo medio para un bloque óseo de 5 mm de espesor es de 3 a 7 días.

Ventajas:

1. Fija y descalcifica simultáneamente.
2. No dificulta demasiado la coloración nuclear.
3. esta especialmente recomendado para decalcificar bien

Inconvenientes:

1. Acción muy lenta.
2. Requiere neutralización previa a la inclusión en sulfato sódico al 5%
3. Lavado en agua posteriormente durante 18 horas.

Existen también soluciones fijadoras con poder decalcificante. Entre los más utilizados son los de los líquidos de Bouin, Bouin Hollander, y Zenker. Todo ellos poseen una débil capacidad decalcificadora por la cual se emplea casi exclusivamente como decalcificantes de los cilindros biopsicos de medulas óseas, están constituidos sobre todo por esponjas y para eliminar pequeñas calcificaciones distróficas.

4. Decalcificación con quelantes químicos

Los quelantes químicos son sustancias capaces de combinarse con iones metálicos en solución o estabilizados en forma de sales o constituir nuevos compuestos generalmente solubles en agua.

El quelante que se utiliza normalmente que es el ácido etilén–dianinotetracético.

La sustracción de iones cálcicos que procura el EDTA se realiza de forma muy lenta pero posee la ventaja de

no inducir artefactos. Esta solución se comercializa y se prepara:

Sal disódica de EDTA.5.5 gr.

Formalina neutra al 10%.....100.0 mL

El tiempo medio de decalcificación para un bloque de 5mm de espesor de esponjosa ósea de 1 a 3 semanas y para un bloque de hueso cortical entre 6 y 8 semanas.

La decalcificación química, puede acelerarse con el empleo de ultrasonidos. El método se fundamenta en someter el aumento una vez inmerso en la solución decalcificación a la acción de ondas ultrasónicas en un baño líquido. De esta forma se induce una vibración molecular sobre el material calificado favorece la formación de sales entre los iones desprendidos y los ácidos o querantes usados durante el proceso.

5. Decalcificación electrolítica

Se basa en el empleo de una corriente eléctrica para provocar la ionización de la solución salina o decalcificante en que se encuentra sumergido el tejido de esta manera las sales insolubles de calcio presentes en el tejido son desplazadas hacia el electrodo negativo y los radicales ácidos hacia el polo electropositivo. Este proceso suele realizarse entre 30 y 45°C y para especímenes pequeños.

Se completa entre 45 y 60 minutos a pesar de las ventajas del procedimiento no se utiliza de forma rutinario en la mayoría de los laboratorios de anatomía patológica.

6. Pruebas de control sobre el grado de decalcificación tisular

El control exacto del tiempo óptimo de decalcificación tisular es importante porque una duración mayor provoca maceración y destrucción celular y un acortamiento provoca el que no se puedan secciones microtómicas adecuadas. Por eso se precisan mecanismo de control que permitan establecer el control en el que el proceso sea el completado.

Existen 3 tipos de métodos:

1. Físicos: que se basan en la experiencia del técnico para detectar mediante el tacto el grado de dureza y calcificación tisular, Histológicamente es muy subjetivo y puede dañar el tejido durante la manipulación por lo cual no son aconsejables.
2. Radiológicas: bastante sensibles pero requieren instrumento complejo y son costosos.
3. Químicos: son normalmente de elección y se basan en la detección de iones cálcicos en el líquido de calcificante. Cuando en los sucesivos recambios de líquido dejan de encontrarse iones cálcicos se considera que el proceso ha finalizado.

La prueba mas utilizada es el Oxalato Cálcico.

7. Decalcificación de bloques titulares incluidos en parafina.

Durante el proceso de corte de los bloques incluidos en parafina, aparecen a menudo calcificaciones no detectadas.

En estos casos graves desperfectos en la cuchilla que pueden llegar a impedir que se realicen las secciones necesarias. Este problema puede subsanarse sumergiendo el bloque en líquido de PERENYI o en el ácido

fórmico al 50%. Antes de realizar el corte o bien empleando el método de LENDRUM que consiste en exponer la superficie de corte a la acción de una solución de ácido clorhídrico al 2% durante varias horas.

Ácido nítrico al 10%.....40 mL

Etanol absoluto...30 mL

Ácido crómico al 0.5% en agua destilada..30 mL

Centrar inmediatamente antes de su uso, el tiempo medio de decalcificación para un bloque óseo de 5 mm de espesor es de 2 a 6 días.

Ventajas:

- Prepara adecuadamente la tinción nuclear.
- Apenas provoca maceración tisular.
- No requiere neutralización previa a la intrusión tisular.

Inconvenientes:

1. Actúa lentamente, por lo que no puede emplearse para trabajos de urgencia.