

6. DECALCIFICACIÓN

• INTRODUCCIÓN

Como su nombre indica, es la eliminación de todo el calcio posible presente en el tejido. La decalcificación se realiza después de la fijación.

Es un procedimiento habitual en el procesamiento de tejidos calcificados o mineralizados como huesos y dientes, y excepcionalmente también para material anatomico-pathológico con calcificación. Dichas calcificaciones dificultan o impiden la observación microscópica de las lesiones.

La decalcificación está desaconsejada en caso de enfermedades metabólicas óseas. Cuando no se puede llevar a cabo la decalcificación la microtomía se debe realizar en microtomas motorizados que son específicos para seccionar tejidos duros incluidos en plástico.

Los principales agentes decalcificantes están formados por ácidos fuertes o débiles empleados aisladamente o en unión en distintos líquidos fijadores como el formol con ácido nítrico.

Además se han utilizado resinas de intercambio iónico, quelantes químicos, disociación electrolítica, y como aceleradores del proceso de decalcificación se emplean emisores de ultrasonidos.

• DECALCIFICADORES QUÍMICOS

Los principales compuestos químicos empleados como decalcificantes son:

- Ácidos inorgánicos fuertes como el ácido nítrico y ácido clorhídrico.
- Ácidos débiles como el ácido sulfuroso.
- Ácidos orgánicos como el fórmico, acético y tricloroacético.
- Sustancias quelantes como el EDTA.

El líquido decalcificante ideal debe reunir las siguientes características:

- Producir una eliminación completa del calcio.
- No provocar efectos indeseables o artefactos sobre los tejidos tratados.
- No interferir con los procedimientos posteriores a los que se somete el tejido.

El ácido nítrico es el agente más rápido y eficaz aunque utilizado en concentraciones altas (superiores al 6%) tiende a producir gran destrucción tisular, destrucción que se acentúa en disolución alcohólica.

Otro ácido fuerte que se utiliza es el ácido clorhídrico que no es tan rápido como el nítrico y además produce agresión tisular.

Los ácidos orgánicos, producen escasos artefactos tisulares y apenas interfieren en los resultados finales de la tinción, sin embargo actúan muy lentamente y requieren la renovación frecuente del líquido decalcificante.

Para disminuir en lo posible los efectos alterantes del decalcificador, la fijación se debe haber completado antes de iniciar dicho proceso.

Debe usarse un volumen óptimo de líquido decalcificador, mínimo en la proporción 1:20 que además será renovado con frecuencia.

Para acelerar el proceso, el tejido debe ser suspendido en el centro del recipiente que contiene el agente decalcificador, ya que en el fondo del recipiente se acumula la mayor concentración de sales cárnicas.

La temperatura ideal para este proceso es en torno a 26°C (temperatura ambiente), por encima el proceso se acelera pero también lo hace la degradación tisular. La agitación suave generalmente acelera el proceso.

Después del proceso de decalcificación (siempre que se haya realizado con ácidos químicos) se debe eliminar el ácido mediante lavados sucesivos en solución neutralizante. Se emplea una solución de carbonato de litio al 1% (P/V) ya que asegura la neutralización completa, también es válida el agua corriente. En caso de que no se neutralice bien el tejido, ésto va a repercutir en la tinción posterior del tejido.

- **SOLUCIONES DECALCIFICANTES MÁS UTILIZADAS**
- **SOLUCIONES QUE CONTIENEN ÁCIDOS FUERTES:**

- **SOLUCIONES ACUOSAS Y ALCOHÓLICAS DE ÁCIDO NÍTRICO**

En el caso de la solución acuosa se prepara al 5% y la solución alcohólica al 7,5%. Con esta solución de ácido nítrico el tiempo medio de decalcificación para un bloque de 5mm de grosor es de 12 a 24 horas.

VENTAJAS

La rápida decalcificación que produce la mínima retracción tisular originada y la óptima coloración de los núcleos.

INCONVENIENTES

En caso de que se prolongue excesivamente el tiempo de decalcificación se puede anular la fijación previa y alterar progresivamente el tejido.

- **SOLUCIÓN DE FORMALINA Y ÁCIDO NÍTRICO**

Esta solución se prepara mezclando 10ml de formalina, 10ml de ácido nítrico concentrado y 80ml de agua destilada.

El tiempo medio de decalcificación para un bloque de 5mm de grosor es de 1 a 3 días.

VENTAJAS

- Es relativamente rápida.
- Provocan menos alteraciones tisulares que la solución acuosa de nítrico. Por su facilidad de manejo y rapidez de acción es la solución decalcificante más utilizada en las técnicas histológicas de rutina.

INCONVENIENTE

- Dificulta la tinción nuclear en mayor grado que otras soluciones decalcificantes que contienen ácido, además antes de su procesamiento los tejidos requieren neutralización y lavado posterior en agua corriente al menos durante 2 horas.

- **SOLUCIONES QUE CONTIENEN ÁCIDOS DÉBILES**

- **SOLUCIÓN ACUOSA DE ÁCIDO FÓRMICO**

Se prepara mezclando de 5–10ml de ácido fórmico al 90% con 90–95ml de agua destilada. El tiempo medio de decalcificación para un bloque de 5mm de espesor es de 3 a 7 días.

El empleo de ácido fórmico en solución tamponada, aunque es de acción mas lenta (de 3 a 14 días) mejora notablemente la coloración nuclear y la imagen histológica global del tejido.

VENTAJA

- Fija y decalcifica simultáneamente.
- Da una coloración nuclear relativamente buena.
- Está especialmente recomendada para decalcificar dientes.

INCONVENIENTES

- Es de acción muy lenta.
- Requiere neutralización previa a la inclusión y lavado posterior en agua corriente al menos durante 18 horas.

• **SOLUCIONES FIJADORAS CON PODER DECALCIFICANTE**

El líquido de Bouin – Hollander, Bouin y Zenker poseen una débil capacidad decalcificadora y se emplean para tal fin en el caso de los cilindros de médula ósea.

• **QUELANTES QUÍMICOS**

Los quelantes químicos son sustancias capaces de combinarse con iones metálicos para formar nuevos compuestos generalmente solubles en agua. El quelante más utilizado es el EDTA (Etilendiaminotetraacético).

La sustracción de iones cálcicos que realiza el EDTA es muy lenta pero posee la ventaja de no inducir artefactos sobre los componentes tisulares.

El proceso de decalcificación puede ser acelerado mediante el empleo de

ultrasonidos. En este caso el tejido una vez inmerso en la solución decalcificante es sometido a la acción de un haz ultrasónico en el mismo baño líquido.

El empleo de ultrasonidos si bien es eficaz en la actualidad está en desuso por los grandes efectos destructivos que provoca en las estructuras celulares.

• **DECALCIFICACIÓN ELECTROLÍTICA**

Se basa en el empleo de una corriente eléctrica continua para provocar la ionización de la solución salina en la que se encuentra sumergido el tejido, así las sales insolubles de calcio, presentes en el tejido son desplazadas por influjo del campo eléctrico creado, emigrando los cationes cálcicos al electrodo negativo.

Los radicales cálcicos migran hacia el polo electropositivo, este proceso suele realizarse a temperatura entre 30 y 45°C y para muestras de tejido pequeño se completa entre 45 y 60 minutos.

• **PRUEBAS DE CONTROL SOBRE EL GRADO DE DECALCIFICACIÓN TISULAR**

El control exacto del tiempo óptimo de decalcificación tisular es absolutamente imprescindible ya que una duración mayor del proceso origina maceración y destrucción celular y su acortamiento impide obtener

secciones microtómicas adecuadas. Para ello se precisan mecanismos de control que permitan establecer el momento en que el proceso se ha completado.

Para tal fin existen tres tipos precisos de métodos:

- **MÉTODO FÍSICO**

Se basan principalmente en la experiencia del técnico de laboratorio para detectar mediante el tacto el grado de dureza y calcificación tisular.

Debido a su gran subjetividad y a la posibilidad de producir daños sobre el tejido durante estas manipulaciones éstos métodos no son aconsejables.

- **MÉTODOS RADIOLÓGICOS**

Son muy sensibles pero requieren el empleo de instrumental complejo y costoso. Se basa en irradiar mediante rayos X el tejido y observar la densidad radiológica que este presenta.

- **MÉTODOS QUÍMICOS**

Normalmente son los métodos de elección. Se basan en la detección de iones cálcicos en el líquido decalcificador. Cuando en los sucesivos recambios del líquido dejan de encontrarse iones cálcicos se considera que el proceso ha finalizado.

La prueba química más utilizada es la del ácido oxálico que en presencia de iones cálcicos precipita en forma de oxalato cálcico.