



**Manual de Técnicas
para el estudio del Tejido Óseo**

**Laboratorio de Histología, Histoquímica
e Inmunohistoquímica del Tejido Óseo**

Cátedra de Histología y Embriología FOUBA

Confeción del manual:

Od Natalia Escudero

**JTP Cátedra de Histología y Embriología
FOUBA**

LABORATORIO

Dra Patricia Mandalunis
Directora

**Carolina Acuña
Mariela Lacave**
Histotecnólogas

Manual de Técnicas para el estudio del Tejido Óseo

Índice

Soluciones principales de trabajo

Formol PBS.....	1
EDTA.....	1

Protocolos de laboratorio

MEB.....	1
----------	---

Histoquímica

Fosfatasa alcalina.....	3
TRAP.....	4

Inmunohistoquímica

Pasos comunes a todas las técnicas.....	5
BrdU.....	6
Caspasa 3pAb.....	6
ED1.....	7
OPG.....	7
RANK.....	8
RANKL.....	8

Soluciones principales de trabajo

Formol PBS: 750 ml de agua destilada, 120 ml de formaldehído 40% (Biopack, Argentina), 250 ml de PBS 4X 250.

PBS 4X para histoquímica: 4.6 gr de fosfato de sodio dibásico; 0.8 gr de cloruro de potasio, 0.8 gr de fosfato de potasio monobásico y 32 gr de cloruro de sodio (todos de Biopack, Argentina) en 1000 ml de agua bidestilada.

PBS 1X 0.01M para histoquímica: 1 parte de PBS 4X en 3 de agua destilada.

PBS 1X 0.02 M para inmunohistoquímica: 1 sobre de PBS de fosfato de sodio dibásico, fosfato de sodio monobásico y cloruro de sodio (DakoCytomaton Inc, Via Real, California. Cód S 3024) en 1000 ml de agua destilada para obtener 1 litro de PBS 0.02 M de fosfato de sodio, 0.15 M de cloruro de sodio a pH 7.

EDTA (ácido etilendiaminotetracético): 100 gr de EDTA (sal disódica dihidrato; Anedra, Argentina) en 1000 ml de agua destilada. Se ajusta el pH hasta 7 con 15 a 20 ml de solución de hidróxido de sodio al 40% en agua destilada (Biopack, Argentina).

Protocolos de laboratorio

MEB (Microscopía Electrónica de Barrido)

El secado, metalizado y observación se realizaron en el Servicio de Microscopía Electrónica del Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia”.

Fijación

Se realiza en glutaraldehído 2.5%: 1 parte de la solución comercial al 25% (TYCO, Mallinckrodt Baker Inc, Phillipsburg, NJ, USA. Cas NO: 111-30-8) en 9 partes de agua destilada.

Secado de las muestras por punto crítico

Se colocan las muestras en tubos Eppendorf perforados dentro de la cámara de secado y se hace circular anhídrido carbónico para enfriar la cámara y las muestras en los recipientes hasta -5° C. Lentamente se elimina el alcohol de las muestras. Cuando las muestras están inmersas en anhídrido carbónico por la eliminación completa del alcohol, se comienza a elevar la temperatura hasta 37° C y a regular la presión hasta 1071 psi. En esa temperatura y presión se alcanza el *punto crítico* del anhídrido carbónico donde se encuentra entre el estado líquido y el estado gaseoso,

causado por la ausencia de tensión superficial entre ambas fases. Esto permite una difusión no violenta del gas, con una buena preservación de la muestra. El inconveniente de tener que reemplazar el agua de la muestra por anhídrido carbónico radica en que el punto crítico del agua es de 374° C y 3212 psi, con lo cual se destruiría la muestra.

Montaje y metalizado de las muestras

Montaje: Los soportes provistos por el servicio de MEB del MACN poseen un diámetro de 12.7 mm con un vástago inferior (Ver Fig 1) para ser colocado tanto en el aparato metalizador como en el microscopio. Los soportes poseen los laterales acanalados para la manipulación con la pinza correspondiente y evitar daños a la muestra que se coloca en la cara superior. Los portaobjetos se adhirieron a los soportes con cinta adhesiva de doble faz.



Figura 1. Soportes para MEB

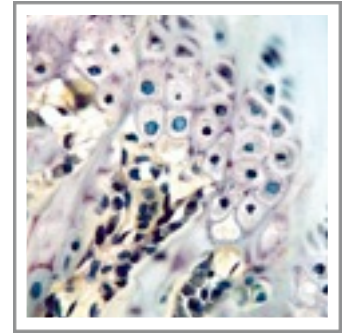
Metalizado: Se realiza con oro-paladio en un metalizador Termo VG Scientific SC 7620 (Ver Fig 2).



Figura VII.2. Izquierda: Metalizador. Derecha: cámara de metalizado con espacio para 7 soportes donde se observan 3 soportes en posición.

Histoquímica

Fosfatasa alcalina



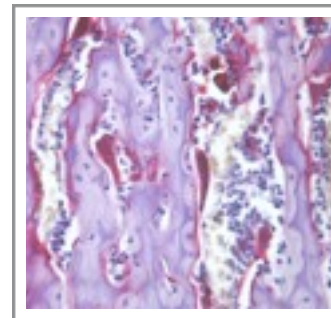
Testigo positivo sugerido: cartílago (condrocitos hipertróficos).

Los pasos 1. a 4. son a 4° C.

1. Material fijado en formol PBS no más de 24 hs.
2. Lavados de 12 hs cada uno en:
 - 5% glicerol en PBS 0.01 M.
 - 10% glicerol en PBS 0.01 M.
 - 15% glicerol en PBS 0.01 M.
3. Descalcificación en EDTA-glicerol (1.25 gr NaOH, 14.5 gr EDTA, 15 ml glicerol en 100 ml de agua destilada). Cambiar el EDTA-glicerol cada 15 días.
4. Lavados de 12 hs cada uno en:
 - PBS 0.01 M- 15% glicerol-15% sacarosa.
 - PBS 0.01 M- 10% glicerol- 20% sacarosa.
 - PBS 0.01 M- 5% glicerol- 20% sacarosa.
 - PBS 0.01 M- 20% sacarosa.
 - PBS 0.01 M- 10% sacarosa.
 - PBS 0.01 M- 5% sacarosa.
 - PBS 0.01 M.
5. Deshidratación en alcohol etílico (96°, 100°).
6. Inclusión en parafina a muy baja temperatura.
7. Corte y montaje inicial.
8. Desparafinado de los cortes en xilol.
9. Incubación 1 noche en cloruro de magnesio 1% en tris maleato.
10. Incubación 2 hs en una solución de 100 ml de tris maleato pH 9.2 + 20 mg naphthol phosphate ASMX (sustrato) + 40 mg de fast red violet (cromógeno).
11. Contraste con hematoxilina.
12. Montaje final con glicerina.

TRAP

(Fosfatasa ácida tartrato-resistente)



Testigo positivo sugerido: tejido óseo procesado de acuerdo al protocolo de la técnica.

1. Fijado en formol PBS no más de 48 hs a temperatura ambiente.
2. Descalcificación en EDTA pH 7 a temperatura ambiente.
3. Deshidratación en acetona.
4. Aclarado en xilol.
5. Inclusión en parafina.
6. Corte y montaje inicial (Se recomienda no almacenar los cortes sino realizarlos inmediatamente previo a la realización de la técnica).
7. Desparafinado en xilol.
8. Rehidratación en acetona.
9. Lavado con agua corriente.
10. Agua destilada.
11. Colocar 1 hora en estufa a 37°C la solución **C (A+B+fast red violet=C)**:
Solución **A**: naphthol phosphate AS-BI 12 mg + N-N dimetil formamida, 750 ml.
Solución **B**: 75 ml de buffer TRIS pH 5,
pH 5: 75 ml tris 0.2 M + 7 a 10 ml de hidróxido de sodio hasta llegar a pH 5.
TRIS 0.2 M: 24.5 gr de tris (hidroximetil aminometano) + 19.6 gr. de ácido maléico + 1000 ml de agua destilada.
Hidróxido de sodio 0.2 M: 8 g NaOH + 1000 ml agua destilada.
Solución **C**: solución **A** + **B** + 105 mg fast red violet.
12. Sacar la solución **C** de la estufa y agregar 3.75 gr de ácido tartárico. Filtrar la solución e incubar los preparados en la misma durante 1 hora.
13. Lavar en agua corriente y dejar virar por 1 hora.
14. Contrastar con hematoxilina.
15. Deshidratar en acetona.
16. Xilol.
17. Montaje final con bálsamo de Canadá.

Inmunohistoquímica

Se recomienda no almacenar los cortes montados en los portaobjetos, sino realizarlos inmediatamente antes de realizar la técnica de ser posible. En caso de contar sólo con cortes almacenados, realizar recuperación antigénica con métodos enzimáticos o calor.

Como control negativo se utilizaron los mismos cortes que el control positivo (ver según cada técnica). Se siguió con el protocolo omitiendo el anticuerpo primario, utilizando en su lugar PBS con una IgG no marcada (Biogenex).

Se calcula un volumen de 100 μ l por portaobjetos para la preparación de los anticuerpos y otras soluciones de trabajo (en la incubación del anticuerpo primario y pasos finales 2, 4, y 6.: ver siguiente punto).

Pasos iniciales comunes a todas las técnicas

1. Fijación en formol buffer pH 7.2 a 4°C por no más de 48 hs.
2. Descalcificación en EDTA pH 7.2 a 4°C.
3. Deshidratación en alcohol etílico.
4. Aclarado en xilol.
5. Inclusión en parafina.
6. Corte.
7. Montaje inicial.
8. Desparafinado del corte en xilol.

Pasos finales comunes a todas las técnicas

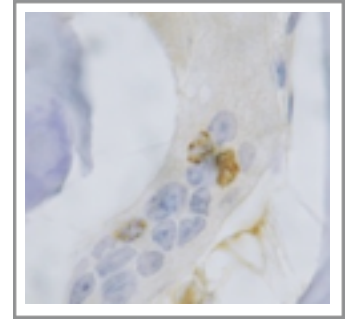
1. Lavado con PBS.
2. Incubación durante 1 hora con el anticuerpo biotinilado.
3. Lavado con PBS.
4. Incubación con complejo peroxidasa estreptavidina.
5. Lavado con PBS.
6. Revelado (1 ml peróxido de hidrógeno en 100 ml de PBS+ 100 mg de diaminobencidina) de 7 a 10 minutos (Número de catálogo del kit DAB sustrato para peroxidasa: SK-4100, Vector Laboratories Inc., CA, USA).
7. Corte de la reacción en agua fría.
8. Contraste con hematoxilina unos segundos para obtener una coloración suave.
9. Virado con carbonato de litio.
10. Deshidratación: alcohol etílico 96° y luego 100°.
11. Xilol.
12. Montaje final con bálsamo de Canadá.

BrdU (5-Bromo 2-dioxi uridina) ([AM 247-5M Biogenex](#))

Esta técnica es realizada en estrecha colaboración con la Cátedra de Anatomía Patológica, FOUBA.

(Dra. ME Itoiz, Dr MA Pérez y Ht. VH Tomasi).

Testigo positivo sugerido: cualquier tejido marcado con BrdU.



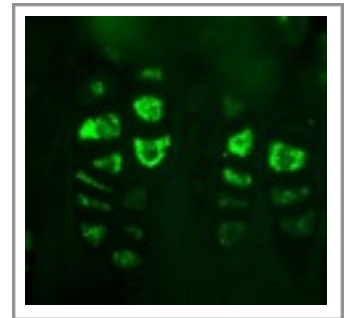
Pasos iniciales comunes, luego:

1. Pasaje por alcoholes: etanol 100°, metanol 100°.
2. Bloqueo de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno 1% en metanol 30 minutos.
3. Lavado con agua destilada.
4. Recuperación antigénica con 2 ciclos de microondas por 3 minutos cada uno a 400 W en buffer citrato pH 6. Dejar enfriar hasta temperatura ambiente durante 20 minutos.
5. Bloqueo de reacción inespecífica con albúmina 0.1% en PBS 1 hora.
6. Incubación con el anticuerpo primario prediluido (PBS pH 7.6, BSA 1% y azida sódica 0.09%) durante toda la noche a 4° C en cámara húmeda.

Pasos finales comunes.

Caspasa 3 pAb ([G7481, Promega, USA](#))

Testigo positivo sugerido: glándula mamaria post destete, embriones o cartílago de crecimiento.

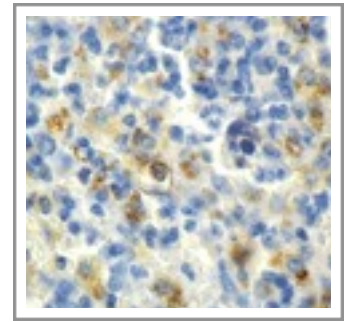


Luego del revelado con DAB de los anticuerpos anti RANK, RANKL y OPG y el contraste con hematoxilina:

1. Lavado con PBS 1X.
2. Permeabilización con Tritón 0.2% en PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente.
3. Lavado con PBS 1X 3 veces por 5 minutos en Coplin, a temperatura ambiente.
4. Incubación con el buffer de bloqueo (Tween 20 al 0.1% en PBS + 5% BSA).
5. Incubación con el anticuerpo primario diluido 1:250 en buffer de bloqueo overnight en cámara húmeda a 4°C.
6. Lavar dos veces en PBS 1X durante 10 minutos a temperatura ambiente.
7. Lavar dos veces en Tween 20 al 0.1% en PBS a temperatura ambiente.
8. Incubación con el anticuerpo secundario fluorescente DyLight 488 ([N° de producto 35552, Goat anti rabbit IgG](#), Pierce Biotechnology, Rockford, IL, California, USA) durante una hora en una dilución 1:50 en PBS al resguardo de la luz.
9. Lavar dos veces con PBS 1X durante 10 minutos.
10. Montaje con glicerol 50% en PBS.

ED1 ([MAB1435- Chemicon International](#))

Testigo positivo sugerido: bazo o tejido óseo.



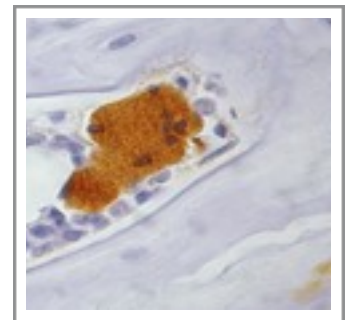
Pasos iniciales comunes, luego:

1. Rehidratación: en alcohol etílico (100° y luego 96°).
2. Lavado con PBS.
3. Recuperación antigénica con tripsina 0.1% en Tris maleato pH 7 a 37 °C.
4. Lavado con PBS.
5. Bloqueo de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno 3% en PBS por 10 minutos.
6. Lavado con albúmina 5% en PBS por 10 minutos.
7. Incubación con el anticuerpo primario 1:450 en PBS 0.01 M durante toda la noche a 4 °C.

Pasos finales comunes.

Osteoprotegerina ([BAF459 R&D Systems](#))

Testigo positivo sugerido: tejido óseo.



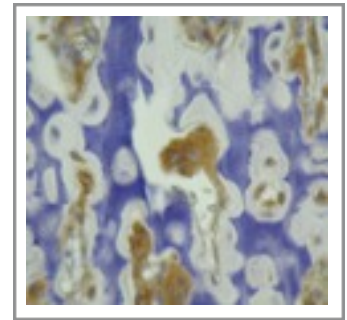
Pasos iniciales comunes, luego:

1. Rehidratación: en alcohol etílico (100° y luego 96°).
2. Lavado con PBS.
3. Recuperación antigénica con tripsina 0.1% en tris maleato pH 7 a 37°C.
4. Lavado con PBS.
5. Bloqueo de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno 3% en PBS por 10 minutos.
1. Lavado con PBS.
2. Incubación con el anticuerpo primario 1:100 en PBS 0.01 M durante toda la noche a 4° C en cámara húmeda.

Pasos finales comunes.

RANK ([H-300: sc-9072 Santa Cruz Biotechnology](#))

Testigo positivo sugerido: tejido óseo o glándula mamaria.



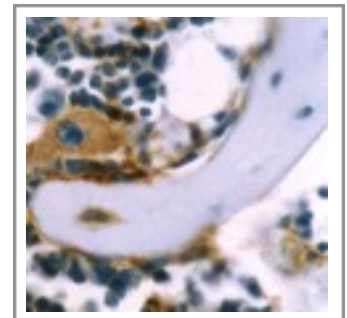
Pasos iniciales comunes, luego:

1. Pasaje por alcoholes: etanol 100°, metanol 100°.
2. Bloqueo de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno 0.3% en metanol 30 minutos.
3. Lavado con PBS.
4. Permeabilización con Tween 0.1% en PBS 0.01 M durante 30 minutos a 1 hora.
5. Lavado con PBS.
6. Incubación con el anticuerpo primario 1:500 en PBS 0.01 M con albúmina durante toda la noche a 4° C en cámara húmeda.

Pasos finales comunes.

RANKL ([Anti-mouse TRANCE/RANKL/TNFSF11 Antibody, AF462 R&D Systems](#))

Testigo positivo sugerido: tejido óseo o glándula mamaria.



Pasos iniciales comunes, luego:

1. Rehidratación: en alcohol etílico (100° y luego 96°).
2. Lavado con PBS.
3. Recuperación antigénica con tripsina 0.1% en Tris maleato pH 7 a 37°C.
4. Lavado con PBS.
5. Bloqueo de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno 3% en PBS por 10 minutos.
1. Tween 0.1% en PBS por 30 minutos.
2. Lavado con PBS.
3. Incubación con el anticuerpo primario 1:150 en PBS + albúmina durante toda la noche a 4° C en cámara húmeda.

Pasos finales comunes.