

Artículo original

Determinación de la fosfatasa ácida tartrato resistente en muestras óseas decalcificadas de cerdo *Sus domesticus*.

Determining tartrate-resistant acid phosphatase in decalcified bone samples pig *Sus domesticus*

Carlos VALENCIA¹, Manuel FRANCO², Carolina PUSTOVRH³, Liliana SALAZAR⁴.

1. Estudiante de Doctorado Ciencias Biomédicas. Escuela de Ciencias Básicas, Facultad de Salud, Universidad del Valle (Cali, Colombia). 2. Estudiante de Maestría Ciencias Biomédicas. Escuela de Ciencias Básicas, Facultad de Salud, Universidad del Valle (Cali, Colombia). 3. Profesora Escuela de Ciencias Básicas, Facultad de Salud, Universidad del Valle (Cali, Colombia). 4. Profesora Escuela de Ciencias Básicas, Facultad de Salud, Universidad del Valle (Cali, Colombia).

RESUMEN

Introducción: Las técnicas de Inmuno-histoquímica son hoy en día una de las herramientas más importantes en el diagnóstico histopatológico, sin embargo la manipulación de las muestras y el método de procesamiento puede llevar a cambios en la estructura de las proteínas que llevan a enmascaramiento de antígenos, dificultando la identificación con anticuerpos. Entre los diferentes métodos de recuperación antigénica propuestos en la literatura, el de calor húmedo con Vaporera ha tenido gran aceptación por su simplicidad, control y bajo costo.

Objetivo: En el presente trabajo se propone un protocolo de recuperación antigénica con calor húmedo, en muestras de tejido óseo que ya habían sido previamente fijadas en formaldehído, decalcificadas con etilendiaminetetraacético (EDTA), e incluidas en parafina.

Materiales y método: Se utilizaron muestras de tejido óseo de cerdo que habían sido preparadas con técnicas convencionales,

pertenecientes a la colección del laboratorio de patología de la Universidad del Valle. Se realizó refijación en glutaraldehído y se empleó una vaporera para intensificar la exposición de antígenos. Se utilizó como anticuerpo primario el anti TRAP de DEKO®, monoclonal, originado en ratón, y como secundario el KIT UltraVision LP Large Volume Detection System HRP Polymer®.

Resultados: En todas las muestras expuestas al anticuerpo primario en diluciones 1:20 y 1:40 se observó inmunotinción de células mononucleares compatibles con pre osteoclastos, y células gigantes multinucleadas compatibles con osteoclastos.

Conclusiones: La recuperación antigénica con calor húmedo es un método confiable en la recuperación antigénica de muestras óseas fijadas con formaldehído.

Palabras claves: Inmuno-histoquímica, recuperación antigénica, anticuerpos, fosfatasa ácido tartrato resistente, TRAP.

SUMMARY

Introduction: Nowadays, Immunohistochemistry are one of the most important techniques in the histopathological diagnosis. Despite of handling and processing cautions, both of them may generate changes in the protein structure, masking antigens,

preventing antibody identification. Among different antigen retrieval methods proposed by the literature, the humid heat with Steamer has been widely accepted for its simplicity, control and low cost.

Objective: In this paper a protocol for humid heat antigen retrieval use in bone tissue samples that had been previously fixed in formaldehyde, decalcified with ethylenediaminetetraacetic (EDTA), and embedded in paraffin is proposed.

Materials and methods: Samples of pig's bone that had been prepared with conventional techniques, from the collection of the pathology laboratory of the University of Valle were used. New fixed process was performed in glutaraldehyde and a steamer was used to enhance antigen exposure. The anti-TRAP DEKOs®, mouse monoclonal antibody was used as primary antibody, and the KIT UltraVision LP Large Volume Detection System HRP Polymer® was used as a secondary antibody.

Results: In all samples exposed to primary antibody in 1:20 and 1:40 dilutions immunostaining mononuclear cells compatible with preosteoclasts were observed; immunostaining multinucleated giant cells consistent with osteoclasts were described.

Conclusions: Humid heat for antigenic recovery is a reliable method for the recovery of bone antigen samples fixed with formaldehyde.

Recibido para publicación: Noviembre 11 de 2013
Aceptado para publicación: Mayo 21 de 2014
Correspondencia:
C. Valencia, Universidad del Valle
carvalenc@gmail.com

Key words: Immunohistochemistry, antigenic recovery, antibodies, tartrate resistant acid phosphatase, TRAP

INTRODUCCIÓN

Las técnicas de Inmunohistoquímica se han convertido en una herramienta de diagnóstico importante en histopatología, sin embargo en proceso de fijación, deshidratación, y embebido se producen modificaciones moleculares que a menudo afectan la antigenicidad de las proteínas y pueden llevar a resultados errados (1).

El procesamiento normal para obtener muestras tejido óseo incluye la fijación en formaldehído al 5 %, y la decalcificación por largos periodos, en ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), el cual al actuar como quelante facilita el corte de las mismas. El formaldehído ha sido reconocido como uno de los principales causantes de fallas en estudios inmuno histoquímicos por alteración en la estructura proteica, y se ha propuesto la técnica de recuperación antigénica para revertir este proceso mediante la eliminación de enlaces cruzados, restauración de epitopes, y eliminación de iones calcio (1,2).

La recuperación antigénica puede incrementar significativamente la sensibilidad de la detección inmunológica, conservando un buen detalle morfológico (1), y puede obtenerse con métodos químicos, físicos o combinación de ambos. La mayoría de los métodos físicos se basan en la exposición de las muestras al calor, lo cual puede conseguirse por calor seco (hornos y microondas), o por calor húmedo (baños serológicos, y vaporeras) (2,3).

Como fosfatasa ácido tartrato resistente se considera a una familia de isoenzimas que son expresadas en diversos tejidos como próstata, hueso, hígado, riñón, bazo, y tonsila, entre otros. La mayor parte de las fosfatasas ácidas son inhibidas por L(+)-tartrato, con excepción de la banda 5 que se denomina fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP) (4).

Existen dos subtipos conocidos de TRAP, la 5a y la 5b que se diferencian en que la 5a contiene ácido siálico, y la 5b No. 4.

El subtipo TRAP 5b, es específica de los osteoclastos y ha llegado a ser considerado como uno de los mejores marcadores de metabolismo óseo, ya que no es afectado por la disfunción renal (5). Se cree que el TRAP-5a podría ser expresado por los macrófagos, en el proceso de osteoclastogénesis, y su nivel representaría más el número y actividad de los osteoclastos que el mismo nivel de degradación ósea, aun teniendo en cuenta que la concentración en suero aumenta en condiciones clínicas en que el remodelamiento se encuentra aumentado (4).

Los osteoclastos son las células encargadas de la resorción de la matriz extracelular, y participan tanto en el proceso del reemplazo de tejido óseo en sus primeras etapas de formación, como en las etapas finales de remodelado. El origen de los osteoclastos es hematopoyético, son células grandes, multi-nucleadas, formadas por la fusión de células precursoras del linaje monocito-macrófago (6). En el desarrollo de su función de resorción los osteoclastos degradan la matriz extracelular mediante mecanismos de decalcificación ácida y degradación proteolítica, en los que participan la fosfatasa ácido tartrato resistente, la cathepsina k, y la metaloproteínasa (9,7).

La fosfatasa ácido tartrato resistente es producida por el osteoclasto y transportada al espacio de resorción para el desempeño de su función, pero también se ha propuesto que podría encontrarse en las vesículas transcitóticas de resorción osteoclastica, donde podría realizar una función de degradación de los productos de la matriz (7).

En el presente trabajo se propone un protocolo de recuperación antigénica con calor húmedo (vaporera), que parte de una refijación inicial con glutaraldehído al 2,5 %, y se espera exponer los antígenos de la fosfatasa ácido tartrato resistente como un método para identificar osteoclastos.

MATERIALES Y MÉTODO

Anticuerpo primario

Se utilizó Tartrate - Resistant Acid Phosphatase mouse monoclonal antibody, producido por Vector Laboratories®.

Anticuerpo secundario

Se utilizó el "Primary antibody enhancer" del Kit UltraVision LP Large Volume Detection System HRP Polymer®.

Muestras

Las muestras utilizadas corresponden a seis series de cinco cortes cada una de tejido óseo de mandíbula de cerdos, machos, de dos meses de edad, los cuales fueron suministrados por el Laboratorio de patología de la Escuela de Ciencias Básicas de la Universidad del Valle, pertenecientes a la colección de bloques sobrantes de investigaciones anteriores.

Estas muestras habían sido fijadas en glutaraldehído al 2,5 %, decalcificadas en EDTA por 30 días, incluidas en parafina, cortadas a 5 micrómetros, y fijados al portaobjetos con Poli-L-Lisina.

Control positivo

Se contó con una muestra de tejido de tonsila, también perteneciente a la colección del laboratorio de patología.

Control negativo

Se dejaron dos muestras del mismo tejido óseo, las cuales no fueron expuestas al anticuerpo primario.

Preparación de las muestras para recuperación antigénica

Desparafinado, eliminación del Xilol e hidratación:

Las muestras fueron tratados dos veces con Xilol por 5 minutos, lavadas con agua destilada, e hidratadas con alcohol al 100 %, 95 %, y 70 %, por 5 minutos cada vez.

Técnica de recuperación antigénica con calor húmedo:

Se utilizó una Vaporera, precalentada a 95 grados centígrados, como solución de recuperación se empleó Tris- EDTA, Se permitió que las muestras permanecieran expuestas al calor por 20 minutos.

Inhibición de la peroxidasa endógena:

Se lavaron las muestras cuatro veces por tres minutos con búfer PBS. Se incubaron por 10 minutos con bloqueador de peroxidasa. Se lavó nuevamente cuatro veces por tres minutos con búfer PBS

Bloqueo de uniones no específicas:

Se utilizó el componente “Ultra Block” del kit UltraVision LP Large Volume Detection System HRP Polymer®, por cinco minutos, seguido de lavado con PBS.

Aplicación del anticuerpo primario:

Se secaron suavemente las placas, se demarcaron las áreas a exponer con el marcador hidrofóbico PAN PEN®, y se aplicó en la placa de control, y en dos cortes el anticuerpo primario en dilución 1:20, y en otros 2 cortes en dilución 1:40.

Se dejaron dos cortes sin aplicación, los cuales actuaron como control negativo.

Se dejó incubar el anticuerpo primario por 20 horas en cámara humidificadora, a 4 grados centígrados.

Aplicación del anticuerpo secundario:

Se utilizó el componente “Primary antibody enhancer” del Kit UltraVision LP Large Volume Detection System HRP Polymer®. Se incubó por 10 minutos y se lava con PBS. A continuación se aplicó el componente “HRP Polymer” del mismo kit, incubando por 15 minutos en cámara oscura, para posteriormente lavar con PBS, tres veces por cinco minutos cada vez.

Aplicación del cromógeno (DAB):

Se llevaron las placas al microscopio óptico y se aplicó la Diamino bencidina, (preparada a partir del componente “DAB plus substrate” del Kit UltraVision LP Large Vo-

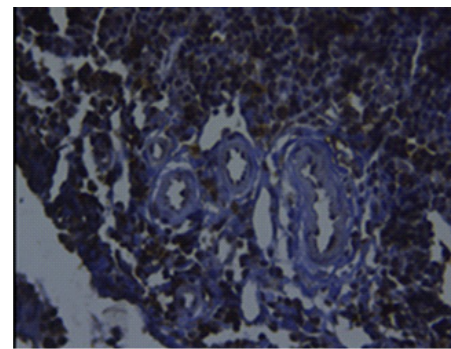
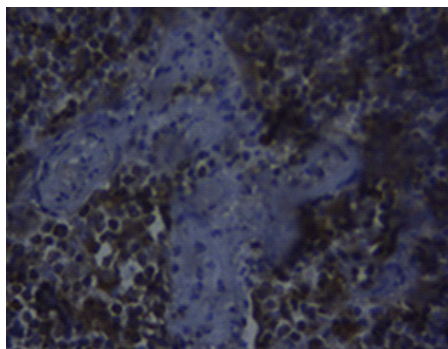


Figura 1. Control positivo. Tonsila humana. Inmunotinción para TRAP. Imagen a 40 X. Se observan numerosas células positivas a TRAP que podrían corresponder a Linfocitos y Macrófagos.

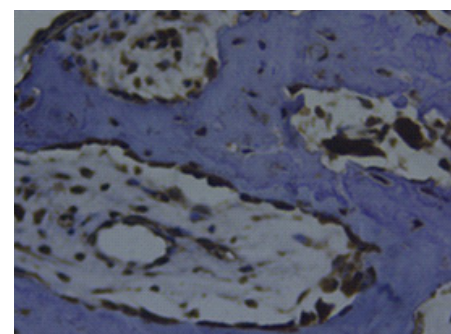
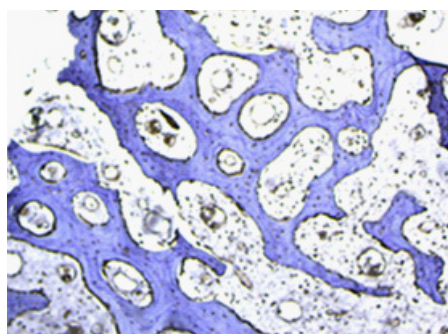


Figura 2. Células positivas a TRAP dilución 1:20. Tejido óseo cerdo. Anti TRAP 1:20. Imagen izquierda a 10 X, Imagen derecha 40X.

lume Detection System HRP Polymer®), evidenciándose reacción a los tres minutos. Se lavó con PBS tres veces por 5 minutos.

Aplicación del contraste:

Se contrastó con hematoxilina de Harris por un minuto y se lavó con agua corriente.

Montaje de las placas:

Se montan las placas con Consul-mount®, y se revisan al microscopio óptico

RESULTADOS

Placa de control positivo

Se tomó como control positivo el tejido de tonsila, ya que presenta alta expresión de fosfatasa ácida tartrato resistente.

En las imágenes de inmunohistoquímica, se aprecia fuerte inmunotinción (Figura 1).

Muestras positivas a TRAP, en dilución 1:20 y 1:40

Se aplicó el anticuerpo en dilución 1:20 y 1:40 se observa numerosas células positivas a TRAP (Figuras 2 y 3).

Control negativo

Se dejaron algunos de los cortes del tejido óseo sin aplicación del anticuerpo primario, se observa ausencia de inmunotinción (Figura 4).

DISCUSIÓN

La fijación con formaldehído es una técnica usada rutinariamente en la preparación de muestras histológicas, pero cuando se desea utilizar estas muestras con fines Inmunohistoquímicas a menudo se observan artefactos, siendo el principal de ellos el

enmascaramiento de los epitopes lo que puede llevar a falsos negativos (8).

En la literatura especializada se ha reportado diferentes métodos como re-fijaciones, digestión enzimática y calor, entre otros, que permiten romper los enlaces cruzados, responsables del enmascaramiento buscando que la porción de interés (epitope) quede expuesta a la acción del anticuerpo (9-16). Sin embargo la recuperación antigénica por si misma también puede modificar estructuras proteicas en los tejidos lo que podría crear también otros artefactos, y adicionalmente un sobre tratamiento puede causar tinción inespecífica, causante de falsos positivos (8,17,18).

Los métodos de recuperación antigénica basados en calor, solos o combinados con otros métodos parece ser una técnica apropiada, siempre y cuando se sigan las recomendaciones establecidos para cada variación de la técnica (calor seco, calor húmedo, micro ondas, etc.), y se determinen unos protocolos estandarizados (19).

La fosfatasa ácida tartrato resistente es expresada en el tejido óseo por los osteoclastos como componente importante de su actividad resorptiva, todos los cortes expuestos al anticuerpo primario muestran fuerte inmunotinción en un patrón difuso que se localiza en el espacio citoplasmático y posiblemente en el espacio extracelular, lo cual estaría dentro de lo esperado ya que esta enzima se encuentra en lisosomas citoplasmáticos, pero además es depositado en el compartimento de resorción ósea, y en las vesículas transcitóticas de resorción osteoclasticos, según lo reportado por *Kalervo et al* (7).

Las muestras utilizadas corresponden a mandíbulas de cerdo de dos meses de edad, y muestran un tejido óseo en formación, (Figuras 2-4), los diferentes cortes estudiados mostraron la presencia tanto de células unicelulares como multicelulares que presentan fuerte inmunotinción, aunque está reportado en la literatura que en el tejido óseo la fosfatasa ácido tartrato resistente es

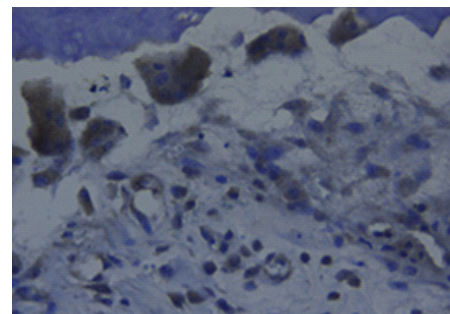
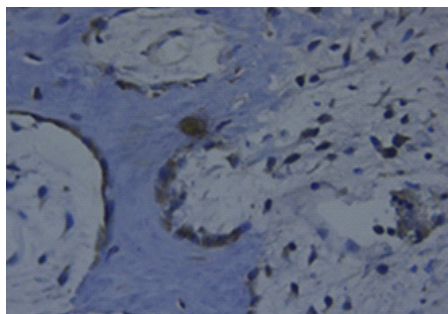


Figura 3. Células positivas a TRAP. Dilución 1:40. Tejido óseo de cerdo. Tinción anti TRAP 1:40. Imagen a 20 X y 40X. Se observan Osteoblastos y Osteocitos (color azul), células multinucleadas TRAP positivas compatibles con osteoclastos (tinción marrón, con núcleos azules en la periferia del tejido), y células color marrón que podrían corresponder a pre osteoclastos).

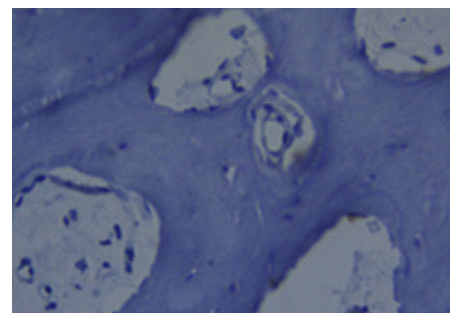
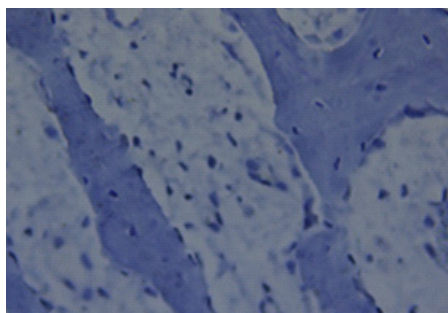


Figura 4. Control negativo. Tejido óseo cerdo. Imagen a 40 X. Se observan células compatibles con osteoblastos y Osteocitos. No se aprecia tinción para TRAP.

considerado un marcador de osteoclastos, la presencia de células mononucleares positivas a TRAP, en muestras de tejido óseo correspondiente a hueso en formación podría corresponder a pre osteoclastos o macrófagos activados, lo cual estaría de acuerdo con la observación de *Reynaga et al* (4) que la TRAP 5b, podría expresarse tempranamente en el proceso de Osteoclastogenesis. Las células gigantes multinucleadas positivas a TRAP que se observan en la imagen 3 tienen rasgos morfológicos y ubicación periférica compatibles con lo esperado en osteoclastos.

CONCLUSIONES

El protocolo propuesto para recuperación antigénica e inmunotinción permitió la expresión de la proteína TRAP.

Se encuentra inmunoreacción en diluciones

de 1:20 y de 1:40

Se observan células mononucleares TRAP positivas que podrían corresponder a pre osteoclastos

Se observan células gigantes multinucleares TRAP positivas que podrían corresponder a osteoclastos.

REFERENCIAS

1. D' Amico F, Skarmoutson E, Stivala F. State of the art in antigen retrieval for immunohistochemistry. *Journal of Immunological Methods* XXX (2008). XXX-XXX. (JIM-10849).
2. IHC Staining Methods. Fifth Edition. 2009. Education Guide. DAKO
3. Antigen Retrieval-Steamer Method (Citrate Buffer). <http://www.ihcworld.com/smf/index.php?topic=155.0>

4. Reynaga B, Zeni SN. Marcadores bioquímicos del remodelamiento óseo. Utilidad clínica. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2009; 43 (2):177-93.
5. Kaori S, Masaaki I, Senji O. Serum Levels of TRAP5b, a New Bone Resorption Marker Unaffected by Renal Dysfunction, as a Useful Marker of Cortical Bone Loss in Hemodialysis Patients. *Calcif Tissue Int.* 2008; 82: 278-87.
6. Masahiro S, Hiroshi T. Novel Osteoclast Signaling Mechanisms. *Current Osteoporosis Reports* 2007; 5:67-72.
7. Kalervo V, Zhao H, Mulari M, Halleen J. The cell biology of osteoclast function. *Journal of Cell Science.* 2000; 113:377-81.
8. Ezaki T. Antigen retrieval on formaldehyde-fixed paraffin sections: Its potential drawbacks and optimization for double immunostaining. *Micron* 2000; 31:639-49.
9. Baas IO, Van den Berg FM, Mulder JW, Clement MJ, Slebos RJ, Curran RC, Gregory J. The unmasking of antigen in paraffin sections of tissue by trypsin. *Experientia* 1977; 33:1400-01.
10. Cattoretto G, Pileri S, Parravicini C, Becker MHG, Poggi S, Bifulco Battifora, Kopinski M. The influence of protease digestion and duration of fixation on the immunostaining of keratins. A comparison of formalin and ethanol fixation. *J. Histochem. Cytochem.* 1986; 34: 1095-100.
11. Leong ASY, Gilham PN. The effects of progressive formaldehyde fixation on the preservation of tissue antigens. *Pathology* 1989; 21:266-8.
12. Abbondanzo SL, Allred DC, Lampkin S, Banks PM. Enhancement of immunoreactivity among lymphoid malignant neoplasms in paraffin-embedded tissues by refixation in zinc sulfate-formalin. *Arch. Pathol. Lab. Med* 1991; 115:31-3.
13. Allison RT, Best T. p53, PCNA and Ki-67 expression in oral squamous cell carcinomas: the vagaries of fixation and microwave enhancement of immunocytochemistry. *J. Oral Pathol* 1998; 27:434-40.
14. Key G, D'Amato L, Sabbatini E, Feudale E, Reynolds F, Gerdes J, Rilke F. Antigen unmasking on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. *J. Pathol.* 1993; 171:83-98.
15. Kawai K, Umemura S, Tsutsumi Y. Antigen retrieval by heating treatment. *Saibo (Cell)* 1994; 26:152-7.
16. Kawai K, Serizawa A, Hamana T, Tsutsumi Y. Heat-induced antigen retrieval of proliferating cell nuclear antigen and p53 protein in formalin-fixed, paraffin-embedded sections. *Pathol. Int.* 1994; 44: 759-64.
17. Hamilton SR, Offerhaus GJ. Potential false-positive results with antigen enhancement for immunohistochemistry of the p53 gene product in colorectal neoplasms. *J. Pathol.* 1996; 178:264-7.
18. Ezaki T. Antigen retrieval: its significance and drawbacks in immunohistochemistry. *Kaibogaku Zasshi (Acta Anatomica Nipponica)* 1996; 71:615-28.
19. Yamashita S. Heat-induced antigen retrieval: Mechanisms and application to histochemistry. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry* 2007; 41:141-200.

Citar este artículo de la siguiente forma de acuerdo a las Normas Vancouver:

Valencia C, Franco M, Pustovrh C, Salazar L. Determinación de la fosfatasa ácida tartrato resistente en muestras óseas descalcificadas de cerdo *Sus domesticus*. *Rev. estomatol.* 2014; 22(1):15-19.