

Identificación de osteoclastos en dientes replantados mediante método de tinción histoquímica.

Identification of osteoclasts in replanted teeth through histochemical staining.

Quispe-Salcedo Angela¹, Ohshima Hayato².

RESUMEN

Los osteoclastos son células resorptivas del hueso altamente especializadas derivadas de las células madres hematopoyéticas, caracterizados por la expresión de la enzima fosfatasa ácida tartrato-resistente (TRAP, por sus siglas en inglés). La tinción histoquímica TRAP es una técnica histológica que permite identificar a través de la expresión de un color rojo carmesí, la presencia de osteoclastos y las áreas de resorción en el tejido óseo. En el presente estudio se observó la reacción positiva de la tinción TRAP en los tejidos de soporte de dientes de ratón sometidos a procedimientos de reimplantación tardía y tratamiento previo con solución antibiótica 3Mix. Dos semanas después de la reimplantación se observaron áreas de anquilosis radicular coexistiendo con zonas de alta actividad osteoclástica/odontoclástica TRAP-positivas en parte del tercio medio y el tercio apical de la raíz mesial, así como en el hueso alveolar bajo la furca dental. La tinción TRAP demostró ser efectiva para la identificación de osteoclastos/odontoclastos y una buena alternativa para la evaluación de la viabilidad del periodonto en investigaciones similares.

Palabras clave: Osteoclastos, Tinción TRAP, reimplantación dental

ABSTRACT

Osteoclasts are highly specialized bone-resorptive cells derived from hematopoietic stem cells, characterized by the expression of the acid phosphatase tartrate-resistant (TRAP) enzyme. The histochemical staining TRAP is a histological technique that allows the identification of osteoclasts and the resorbed areas through the expression of a crimson red color in the affected bone tissue. In the present study, the positive reaction for TRAP staining was observed in the supporting tissues of mice molars subjected to treatment with 3Mix antibiotic solution and delayed replantation. Two weeks after replantation, areas of root ankylosis were observed coexisting with areas of intense TRAP-positive staining, which confirmed the osteoclastic (odontoclastic) activity in part of the middle third and the apical third of the mesial root; as well as in the alveolar bone under the root furcation. Hence, TRAP staining proved to be accurate for the identification of osteoclasts and an interesting option to evaluate the viability of the periodontium in parallel investigations.

Key words: Osteoclasts, TRAP staining, tooth replantation.

1. Departamento de Ciencias Básicas y Biología Craniofacial. Facultad de Odontología, Universidad de Nueva York, Estados Unidos.

2. División de Anatomía y Biología Celular de los Tejidos Duros, Facultad de Odontología, Universidad de Niigata, Japón.

Correspondencia: Dra. Angela Quispe-Salcedo **Dirección:** Departamento de Ciencias Básicas y Biología Craneofacial. Facultad de Odontología, Universidad de Nueva York, Estados Unidos **Correo electrónico:** aq9@nyu.edu

Los osteoclastos son células resortivas del hueso altamente especializadas, motiles y con capacidad migratoria; derivadas de las células madres hematopoyéticas (Bruzzaniti et al.; Bar-Shavit et al., Hienz et al.). Los precursores osteoclasticos son miembros de la familia monocito/macrófago, y aunque pueden tener diversos orígenes, sus precursores residen principalmente en la médula ósea (Udagawa et al.; Teitelbaum SL.). Las células osteoclasticas son responsables de la degradación del hueso mineralizado y son, por lo tanto, críticas para el normal crecimiento y desarrollo esquelético, del mantenimiento de la integridad ósea a lo largo de la vida, del metabolismo del calcio a través de la remodelación ósea, y del proceso de homeostasis y reparación tisular (Bruzanitti et al.; Teitelbaum SL.; Hienz et al.).

Adicionalmente a las propiedades ya mencionadas, los osteoclastos están caracterizados por la expresión de la enzima fosfatasa ácida tartrato-resistente (TRAP, por sus siglas en inglés). TRAP es una enzima glicosilada, monomérica y metaloproteína que se expresa en mamíferos (Baumbach et al.) y se diferencia de otras fosfatasas ácidas en mamíferos por su resistencia a la inhibición por el tartrato y por su peso molecular. Usando técnicas histológicas esta enzima es detectada en áreas con alta actividad osteoclastica, usualmente mediante el método histoquímico e inmunohistoquímico para microscopia de luz (Filgueira L; Baumbach et al.). Por lo tanto, la técnica de tinción histoquímica TRAP es una herramienta útil para evaluar la respuesta del hueso alveolar y/o tejidos de soporte del diente frente a determinadas situaciones, tales como modelos experimentales de periodontitis agresiva inducida, implantes dentales, o en casos de reimplantación dental en animales de experimentación. Dado que en nuestro país no se han realizado estudios donde se emplee esta técnica histológica, este artículo tiene como objetivo reconocer su utilidad en una muestra histológica correspondiente a un modelo de reimplantación dental en ratones.

MATERIALES Y METODOS

2.1. Procedimiento de reimplantación dental y procesamiento de las muestras.

Los experimentos descritos en el presente estudio se realizaron de acuerdo a los lineamientos y recomendaciones del Comité de Ética en Experimentación Animal de la Universidad de

Niigata, Japón. Los detalles respecto a la organización de los grupos experimentales y la distribución de los animales de experimentación (Ratones machos del tipo Crlj:CD1/ ICR) se encuentran descritos en una publicación anterior (Quispe-Salcedo et al.). En el grupo experimental se utilizó la solución antibiótica 3Mix en la siguiente concentración: Ciprofloxacina 0,025 mg., Metronidazol 0,05 mg, y Minociclina 0,025 mg. diluidos en 10 ml. de agua destilada. Los procedimientos de reimplantación dental se llevaron a cabo con la ayuda de un microscopio endodóntico y bajo anestesia profunda (Hidrato de cloral, inyección intraperitoneal, dosis máxima de 350 mg/kg.) para facilitar la extracción de la primera molar superior de cada animal. Las piezas fueron sumergidas inmediatamente luego de la extracción en la solución antibiótica 3Mix por 30 minutos y reposicionadas en sus respectivos alveolos sin necesidad de tratamientos adicionales en la pieza y/o en el alveolo. Las muestras fueron recolectadas a los 7 y 14 días luego del procedimiento de reimplantación, y procesadas para cortes histológicos en parafina de acuerdo descrito anteriormente (Saito et al.).

2.2. Tinción histoquímica.

Para la demostración histoquímica de la actividad de la enzima fosfatasa ácida tartrato-resistente en los tejidos dentales y de soporte se utilizó el método "Azo-dye" con pequeñas modificaciones (Takamori et al.). Las láminas conteniendo los cortes en parafina fueron desparafinizadas con Xileno y sumergidas en una serie de alcoholes, para luego ser incubadas en una solución formada por los siguientes componentes: 0.01% de naftol AS- Bi fosfato (Sigma Chemical, St. Louis, Missouri, USA), 0.06% Fast red violet LB salt (Sigma Chemical, St. Louis, Missouri, USA), y 50 mM de L-(b)-ácido tartárico disuelto en 0.2 M de búfer de acetato (pH 5.3). El tiempo máximo de incubación fue de 60 minutos y la temperatura usada fue de 45 °C. Una vez comprobada la tinción en las zonas de interés, las láminas fueron sumergidas en una solución de verde de metileno al 0.5% por 40 segundos con el fin de completar la coloración de contraste.

RESULTADOS

Análisis histoquímico.

La tinción TRAP demostró ser efectiva para la identificación de las zonas con mayor actividad osteoclastica en las muestras de dientes de ratones sometidas a un modelo experimental de

reimplantación dental tardía (Quispe-Salcedo et al.). Dos semanas después de la operación, la pieza tratada con solución antibiótica 3Mix por 30 minutos muestra reparación parcial de la pulpa dental, con áreas de tejido fibrótico y áreas de formación de dentina terciaria, especialmente en el tercio medio y apical de la pulpa radicular. Por otro lado, los tejidos de soporte, tales como el periodontio y el hueso alveolar se encuentran comprometidos al presentar áreas anquilosadas especialmente en la cara interna de ambas raíces y en la furca radicular (Fig. 1a). La reacción histoquímica evidencia zonas con actividad osteoclástica, representadas por un color rojo carmesí en las zonas reabsorbidas localizadas en parte del tercio medio radicular y en la totalidad del tercio apical de la raíz mesial (Fig. 1, flechas). Algunas zonas de la tabla interna del hueso alveolar bajo la furca radicular se muestran positivas para la tinción TRAP (Fig. 1, flechas). A mayor aumento se aprecia con mayor claridad la zona de resorción radicular que afecta no solo el hueso de soporte sino también el cemento radicular (Fig. 1b).

Quispe-Salcedo et al. evaluaron el efecto de la solución antibiótica 3Mix en piezas sometidas a reimplantación tardía, y observaron que esta afecta negativamente la sobrevivencia del periodonto; aunque favorece la reparación del tejido pulpar. Esta afirmación fue demostrada mediante la cuantificación de las zonas positivas para la tinción TRAP en ambas raíces. A mayor número de áreas positivas para la tinción TRAP, mayor la actividad osteoclástica en la primera semana luego de la operación de reimplantación. Consecuentemente, dos semanas después de la operación, amplias zonas de anquilosis fueron vistas en la superficie radicular. En el presente estudio se obtuvo resultados similares al artículo antes mencionado a las dos semanas luego de la operación; sin embargo, no se observó anquilosis completa de las raíces, posiblemente porque se empleó una concentración menor de la solución antibiótica 3Mix. La tinción TRAP demostró que la mayor actividad osteoclástica estuvo localizada en el tercio apical y en parte del tercio medio radicular. Este hecho sugiere que el proceso de resorción externa no

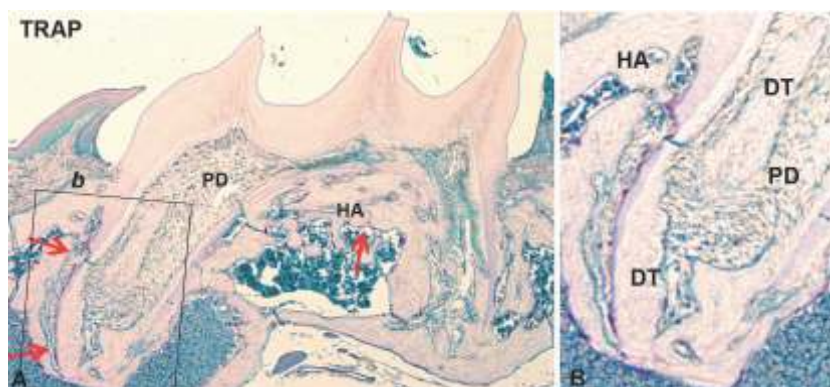


Figura 1. Pieza molar superior sometida a procedimiento experimental de reimplantación tardía y tratada con solución antibiótica 3Mix previo a su reimplantación en el alveolo. La tinción TRAP (áreas en color rojo) muestran las zonas con mayor actividad osteoclástica.

DISCUSIÓN

Las tinciones histoquímicas son herramientas que nos permiten identificar, con cierto grado de facilidad, determinados componentes tales como: enzimas, ácidos nucleicos, metales, entre otros, ya sea en células o tejidos (Neira et al.). En el presente artículo, hemos utilizado la tinción histoquímica TRAP para identificar las zonas con mayor actividad osteoclástica en tejidos dentales y hueso de soporte luego de procedimientos de reimplantación tardía y tratamiento previo con solución antibiótica 3Mix.

ha terminado aún, y que la anquilosis total podría presentarse a la tercera o cuarta semana luego de la operación. Lamentablemente, ningún estudio ha evaluado la viabilidad del periodonto luego del tratamiento con la solución antibacteriana 3Mix más allá de la segunda semana luego de la reimplantación dental.

Dado que las células multinucleadas positivas para la tinción TRAP se ubicaron en el lado externo de la raíz mesial, específicamente en el cemento dental de las muestras observadas en la presente investigación, estas células deben ser denominadas como

odontoclastos (también llamados cementoclastos). Los odontoclastos presentan las mismas características citomorfológicas que los osteoclastos, y participan activamente en los procesos de resorción externa pieza dental bajo condiciones patológicas. Takanori et al. usaron la tinción TRAP en piezas dentales trasplantadas hacia la zona sub-lingual y observaron la presencia de células multinucleadas en la cámara pulpar. La presencia de células positivas para tinción TRAP en la cámara pulpar se relaciona también con la diferenciación de células progenitoras hacia un linaje osteogénico bajo condiciones patológicas. En nuestro estudio no pudimos detectar la presencia de células multinucleadas TRAP-positivas dado que la pulpa dental completo su proceso de reparación natural con la formación de dentina de reparación. Por lo tanto, este método histoquímica se presenta como una herramienta útil y de bajo costo para evaluar el impacto de ciertas sustancias experimentales en modelos de reimplantación dental similares u orientados a replicar patologías pulpares.

CONCLUSIÓN

La tinción histoquímica TRAP evidenció la presencia de zonas con alta actividad osteoclástica en piezas molares replantadas de ratón tratadas con la solución antibiótica 3Mix, demostrando que este método es una herramienta de detección útil que puede ser utilizada en futuras investigaciones no solo para evaluar la condición de los tejidos periodontales sino también para evaluar el tejido pulpar bajo condiciones patológicas.

REFERENCIAS

1. Bruzzaniti A, Baron R. Molecular regulation of osteoclast activity. *Rev Endocr Metab Disord*. 2006; 7(1-2):123-139.
2. Hienz SA, Paliwal S, Ivanovski S. Mechanisms of Bone Resorption in Periodontitis. *J Histochem and Cytochem*. 2008; 56(12):1075-1086.
3. Bar-Shavit Z. The osteoclast: a multinucleated, hematopoietic-origin, bone-resorbing osteoimmune cell. *J Cell Biochem*. 2007; 102(5):1130-1139.
4. Teitelbaum SL. Osteoclasts: what do they do and how do they do it?. *Am J Pathol*. 2007; 170(2):427-435.
5. Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, Tanaka H, Sasaki T, Nishihara T, Koga T, Martin TJ, Suda T. Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; 87:7260-7264.
6. Filgueira L. Fluorescence-based Staining for Tartrate-resistant Acidic Phosphatase (TRAP) in Osteoclasts Combined with Other Fluorescent Dyes and Protocols. *J Histochem and Cytochem*. 2004; 52(3):411-414.
7. Baumbach GA, Saunders PT, Ketcham CM, Bazer FW, Roberts RM. Uteroferrin contains complex and high mannose-type oligosaccharides when synthesized in vitro. *Mol Cell Biochem*. 1991; 105(2):107-117.
8. Hayman AR, Bune AJ, Bradley JR, Rashbass R, Cox TM. Osteoclastic Tartrate-resistant Acid Phosphatase (Acp 5): Its Localization to Dendritic Cells and Diverse Murine Tissues. *J Histochem Cytochem*. 2001; 48(2):219-227.
9. Quispe-Salcedo A, Ida-Yonemochi H, Ohshima H. Use of a triple antibiotic solution affects the healing process of intentionally delayed replanted teeth in mice. *J Oral Biosci*. 2013; 55(2):91-100.
10. Saito K, Nakatomi M, Ida-Yonemochi H, Kenmotsu S, Ohshima H. The expression of GM-CSF and osteopontin in immunocompetent cells precedes the odontoblast differentiation following allogenic tooth transplantation in mice. *J Histochem Cytochem*. 2011; 59(5):518-529.
11. Neira CR, Sedano E, Vilcarromero ME. Técnicas microscópicas. Capítulo 1. Texto de Histología. Facultad de Medicina- UNMSM. 2008.
12. Takamori Y, Suzuki H, Nakakura-Ohshima K, Cai J, Cho SW, Jung HS, Ohshima H. Capacity of Dental Pulp Differentiation in Mouse Molars as Demonstrated by Allogenic Tooth Transplantation. *J Histochem Cytochem*. 2008; 56(12):1075-1086.