

Sensibilidad y especificidad de las tinciones histoquímicas en la evaluación de depósitos óseos de aluminio

J. L. Fernández Martín, P. Menéndez Rodríguez, M. Serrano, A. Rebollar, P. Menéndez Fraga y J. B. Cannata

Unidad de Investigación. Metabolismo Óseo y Mineral. Hospital Central de Asturias.

Introducción

La insuficiencia renal crónica, tanto por las alteraciones del metabolismo mineral que conlleva como por los tratamientos de la misma, produce una enfermedad metabólica ósea llamada enfermedad ósea renal u osteodistrofia renal (OR). Uno de los elementos implicados en la patogénesis de la OR es el aluminio (Al), conociéndose como enfermedad ósea inducida por el aluminio (EOIA) a los cambios directos o indirectos que dicho elemento produce en el hueso. Es importante señalar que, a pesar de que las formas habitualmente asociadas a este término son la osteomalacia y la enfermedad ósea adinámica, en todos los tipos histológicos pueden encontrarse depósitos de Al. Se ha comprobado que hasta en un 50 % de los pacientes con osteodistrofia mixta y en un 10-15 % de los que presentan un hiperparatiroidismo (HPT) secundario se detectan depósitos de Al en la biopsia ósea¹.

La gravedad de la EOIA obliga a profundizar en el estudio de los métodos diagnósticos que permitan su prevención y tratamiento; es requisito indispensable para su diagnóstico la demostración de depósitos de Al en el frente de mineralización. Una de las técnicas más utilizadas es el estudio histoquímico en secciones de biopsias de hueso sin descalcificar.

La tinción más empleada para detectar depósitos de Al es la que se realiza con la sal amónica del ácido aurín-tricarboxílico (aluminón)^{2,3}, pero tiene hasta un 53 % de falsos negativos⁴.

En 1984, Denton, Freemont y Ball, comparando la tinción de aluminón con la tinción de solucromo de azurina a pH 5, observan que con esta última se obtiene positividad más intensa y que se correlaciona mejor con el contenido de Al en hueso analizado mediante método de análisis por electrones⁵.

En este estudio se ha tratado de valorar la sensibilidad y especificidad de las tinciones de aluminón y solucromo

de azurina, comparando los resultados histoquímicos con el contenido de Al en hueso determinado por espectrometría de absorción atómica (EAA) con horno de grafito.

Material y métodos

Se estudiaron 41 biopsias de cresta ilíaca de pacientes en hemodiálisis crónica y 16 tibias de ratas sometidas a distintos grados de intoxicación aluminica. Según los niveles de Al en hueso, se dividieron en dos grupos, utilizando como cifra límite 20 µg/g, porque cantidades inferiores son considerada como «normales»⁶ y, sobre todo, porque no se detectan con el aluminón.

Los grupos fueron:

- Grupo I (n = 15). Concentración de Al < 20 µg/g (\bar{x} = 9,3 ± 7,0).
- Grupo II (n = 41). Concentración de Al > 20 µg/g (\bar{x} = 72,0 ± 46,5).

Del tejido obtenido en la biopsia, la tercera parte se utilizó para la determinación del contenido de Al, y el resto se procesó para estudio histológico. En las ratas, el tercio proximal de tibia izquierda se utilizó para histología, y la derecha para la cuantificación de Al.

Las muestras sin descalcificar se incluyeron en metilmetacrilato, realizándose cortes de 5 µm con un microtomo Policat 5 (Reichert-Jung), y tras desplastificarse se tiñeron con:

— Aluminón: las preparaciones se sumergieron en una solución de aluminón al 2 %, en un buffer de cloruro amónico, acetato amónico y ácido clorhídrico de pH 5,2. La tinción se realizó en un tiempo de 5 a 8 minutos a 68° C.

— Solucromo de azurina: los cortes se tiñeron en una solución de solucromo de azurina al 1 % en solución acuosa de ácido acético glacial al 25 %. El proceso de tinción duró 18 horas.

— Tinción de Perls: la muestra fue teñida con ferrocianuro potásico al 1 % en ácido clorhídrico al 1 % durante 15 minutos. Esta tinción fue realizada para detectar posibles interferencias con hierro (Fe).

Correspondencia: Jorge B. Cannata Andía.
Unidad de Investigación.
Hospital Central de Asturias.
Apto. de Correrros 243.
33080 Oviedo.

El estudio histológico se realizó mediante valoración cualitativa, interpretándose los depósitos como negativos cuando no se apreciaron y una cruz (+) o dos cruces (++) según la intensidad y distribución de los mismos.

La determinación de Al se realizó disolviendo el hueso con HNO₃ concentrado (Suprapur, Merck) en bombas de teflón a alta presión o en reactores de teflón de media presión y digestión en horno de microondas. Una vez disuelto el tejido, se llevó a 25 ml en matraces de plástico, con todas las precauciones necesarias para evitar la contaminación de las muestras. La determinación en sí misma se llevó a cabo mediante EAA con horno de grafito (Perkin Elmer Zeeman-3030), según el método descrito en trabajos previos⁷.

Resultados

Grupo I (n = 15) (Al <20 µg/g): La tinción de aluminón fue positiva únicamente en 3 muestras con contenido muy bajo de Al. Creemos que la positividad fue debida a la interferencia con depósitos de Fe, como comprobamos con la tinción de Perls. Con solucromo de azurina fueron positivas 5 muestras, todas con Al > a 17 µg/g, excepto una cuyo contenido era de 1,5 µg/g. Esta última también fue positiva con la tinción de Perls.

La especificidad del aluminón fue del 80 %, y la del solucromo de azurina, del 66 %, pero aumenta hasta un 91 % si se hubieran considerado 17 µg/g como cifra límite a partir de la cual es posible detectar depósitos de este metal. Con este límite, la especificidad del aluminón desciende al 73 %.

Grupo II (n = 41) (Al > 20 µg/g): El aluminón fue positivo en todas, excepto en 8, a pesar de que 6 de ellas tenían concentraciones de Al en hueso superiores a 55 µg/g. La tinción de solucromo de azurina fue positiva en todas las muestras, observándose depósitos no sólo en el frente de mineralización, sino también en líneas de cemento y depósito difuso en el hueso.

La tinción de aluminón mostró una sensibilidad del 80 %, y la de solucromo de azurina, del 100 %. Con el límite de 17 µg/g, la sensibilidad para el aluminón sería sólo del 73 %.

Discusión

El análisis de estos resultados demuestra que ambas técnicas (histoquímicas y cuantificación) son necesarias y complementarias para valorar la patología que está produciendo el Al al depositarse en el hueso. La medición del Al por EAA es una de las técnicas más sensibles para descartar depósitos de este metal⁸, pero no nos indica el lugar exacto donde se encuentra y no es accesible a todos los que estudian esta patología.

Respecto a las tinciones utilizadas en el estudio histológico, en nuestra experiencia la tinción de solucromo de

azurina fue capaz de detectar depósitos en todas las muestras con Al > 17 µg/g, mostrando una mayor sensibilidad que el aluminón. Probablemente —como refieren otros autores^{5,9}— se produce una mayor descalcificación con el solucromo de azurina, haciendo más accesibles los depósitos de Al. Nos parece que la interpretación histológica de los depósitos es también más fácil por la diferencia de coloración entre los depósitos y el resto de tejido.

La tinción de aluminón no fue capaz de detectar la presencia de depósitos en 8 muestras del grupo II, 6 de las cuales correspondían a pacientes con un HPT secundario en los que, probablemente por tener un alto turnover, existiría una redistribución ósea del Al, no concentrándose a ningún nivel en cantidades suficientes como para ser detectadas mediante dicha tinción. Creemos que esto tiene serias complicaciones terapéuticas, como puede ser la decisión de realizar una paratiroidectomía médica o quirúrgica que podría conllevar el desarrollo ulterior de EOIA si previamente no se ha realizado una disminución de los depósitos óseos de aluminio con tratamiento quelante, y, como hemos visto en nuestro caso, esto podría ocurrir en un 25 % de los pacientes con una concentración de Al en hueso mayor de 17 µg/g.

Ambas tinciones tienen un inconveniente, que es la reacción cruzada con otros metales, fundamentalmente el Fe. Hemos observado que en las muestras del grupo I con bajo contenido óseo de Al, el aluminón fue positivo en 3 de ellas y el solucromo de azurina en una, a pesar de tener Al inferior a 2 µg/g. Esto puede inducir a errores diagnósticos, por lo que debe realizarse siempre la tinción de Perls.

En conclusión, en nuestra experiencia, y de acuerdo con lo referido por otros autores^{5,9,10}, ambas tinciones, aluminón y solucromo de azurina, son válidas y de interés clínico para demostrar depósitos de Al en biopsias de hueso sin descalcificar, pero el solucromo de azurina tiene mayor sensibilidad que el aluminón sin pérdida de especificidad.

Agradecimientos

Proyecto financiado por FICYT 1991-1992. A. Angeles González Carcedo por su colaboración técnica.

Bibliografía

1. Malluche HH, Faugère MC: «Renal bone disease 1990: An unmet challenge for the nephrologist». *Kidney Int* 38:193-211, 1990.
2. Buchanan MR, Ihle BU, Dunn CM: «Haemodialysis related osteomalacia: A staining method to demonstrate aluminum». *J Clin Pathol* 34:1352-1354, 1981.
3. Maloney NA, Ott SM, Alfrey AC, Miller NL, Coburn JW, Sherrard DJ: «Histological quantitation of aluminum in iliac bone from patients with renal failure». *J Lab Clin Med* 99:206-216, 1982.
4. Faugère MC, Malluche HH: «Stainable aluminum and not aluminum content reflects bone histology in dialyzed patients». *Kidney Int* 30:717-722, 1986.

5. Denton J, Freemant AJ, Call J: «Detection and distribution of aluminium in bone». *J Clin Pathol* 37:136-172, 1984.
6. Hodsman AB, Sherrard DJ, Alfrey AC, Ott SM, Brickman AS, Miller NL, Maloney NA, Coburn JW: «Bone aluminum and histomorphometric features of renal osteodystrophy». *J Clin Endocrinol Metab* 54:539-546, 1982.
7. Sanz-Medel A, Rodríguez-Roza R, González Alonso R, Noval Vallina A: «Atomic spectromic methods (atomic absorption and atomic emission) for the determination of aluminium at the parts per billion level in biological fluid». *J Anal Atom Spect* 2:177-184, 1987.
8. LeGendre GR, Alfrey AC: «Measuring picogram amounts of aluminium in biological tissue by flameless atomic absorption analysis of a chelate». *Clin Chem* 22:53-56, 1976.
9. Kaye M, Hodsman AB, Malynowsky L: «Staining for bone for aluminium: Use of acid solochrome azurine». *Kidney Int* 37:1142-1147, 1990.
10. Ellis HA, Pang MMC, Mawhinney WHB, Skillen AW: «Demonstration of aluminium in iliac bone. Correlation between aluminium and solochrome azurine staining techniques with data on flameless absorption spectrophotometry». *J Clin Pathol* 41:1171-1175, 1988.