

Técnica histológica para la inclusión en metilmetacrilato de muestras óseas no descalcificadas

J. L. PERIS, J. PRAT, M. COMIN, R. DEJOZ, I. ROGER y P. VERA

Grupo de Biomecánica Médica, Instituto de Biomecánica de Valencia (IBV). Valencia. España.

Resumen.—La preparación de muestras óseas descalcificadas incluidas en par-alma ha sido durante mucho tiempo una técnica histológica rutinaria en numerosos hospitales y centros de investigación, pero presenta el inconveniente de modificar la estructura de la fase mineral del tejido óseo. Se describe una técnica histológica que permite la obtención de secciones de tejido óseo no descalcificado partiendo de su infiltración e inclusión de metilmetacrilato (MMA). Esta técnica posibilita la cuantificación histomorfométrica del proceso de remodelación ósea y la localización histoquímica de enzimas y diversas sustancias.

HISTOLOGICAL TECHNIQUE FOR METHYL METHACRYLATE EMBEDDING OF BONE BIOPSIES

Summary.—Demineralized paraffin embedded bone biopsies have been a routine histological technique in many hospitals and research centres, but this technique does not preserve the mineral phase of the bone tissue. A simple polymethyl-methacrylate embedding method is described for undecalcified bone specimens. This method permits an accurate histomorphometrical evaluation of bone remodelling and enzymes and other substances can be histochemically localized.

INTRODUCCIÓN

El hueso, debido a su estructura tanto de tejido duro como de tejido blando, siempre ha representado un reto desde el punto de vista histológico. La utilización de muestras óseas calcificadas permite mantener intacta la fase mineral del hueso; y esta característica, aunque de gran importancia, no es la única ventaja que presenta, ya que entre otras cabe destacar las siguientes: a) tinción específica de las líneas cementantes (1) y del osteoide (2), b) persistencia de los fluorocromos (tetraciclinas, azul de calceína, naranja de xilenol,...) administrados *in vivo* (3, 4), y c) localización histoquímica de ciertas enzimas y diversas sustancias (5). Estas particularidades posibilitan la ampliación de conocimiento de los sis-

temas dinámicos (crecimiento, modelado y remodelación ósea) llevados a cabo por las células óseas, así como de los diferentes mecanismos de control tanto biológicos como mecánicos que actúan sobre el tejido óseo.

Si bien las tradicionales técnicas de inclusión en parafina o celoidina/parafina requieren una descalcificación previa de la muestra, el proceso de corte de muestras calcificadas necesita un adecuado material de soporte. En la actualidad, se ha optado por la utilización de diversos tipos de metacrilatos tales como butil-metacrilato (6), etil-metacrilato (7), glicol-metacrilato (2-hidroxietil-metacrilato) (GMA) (8, 9), 2-hidroxipropil-metacrilato (10, 11) y metil-metacrilato (MMA) (12-15); así como resinas de poliéster (16) y epóxidos (17). Sin embargo, en la actualidad son muchos los autores que prefieren utilizar el metilmetacrilato como medio de infiltración e inclusión, ya que presenta dos claras ventajas frente a las otras alternativas, la primera de ellas es su capacidad de infiltración de muestras de gran tamaño previamente tratadas y la segunda es la versatilidad de tinción de dichos especímenes. A pesar de las dificultades

Correspondencia:

Dr. JOSÉ L. PERIS
Instituto de Biomecánica de Valencia
Apartado de Correos 119
46980 Paterna. Valencia

* Este trabajo ha sido financiado parcialmente por el Proyecto de Investigación concedido por la DGICYT (PM91-0185).

que presenta la preparación del monómero, la larga duración del procesado de la muestra y el impreciso control de la polimerización, el metil-metacrilato no ha llegado a ser reemplazado por los plásticos de última generación.

El propósito de este artículo es dar a conocer una técnica histológica que permita realizar cortes de 3-5 um de grosor de muestras óseas no descalcificadas mediante un equipamiento relativamente convencional en el que no se incluyen sierras de precisión ni sofisticados equipos de desbastado y micropulido.

TÉCNICA

El procesado de muestras óseas no descalcificadas requiere una serie de pasos generales que son comunes a otras técnicas histológicas aunque presentan, en algunos casos, grandes diferencias:

1. Obtención de la muestra.
2. Fijación.
3. Deshidratación.
4. Infiltración.
5. Polimerización.
6. Corte y montaje.
7. Tinción.

Obtención de la muestra

Aunque el MMA permite el procesado de muestras de gran tamaño, se aconsejan biopsias de morfología cúbica con un tamaño no superior a 1 cm de lado si la muestra va a ser seccionada mediante microtomo. Especímenes mayores presentan problemas de deshidratación. Actualmente existen en el mercado sistemas (18) que permiten el manejo de muestras de tamaño muy superior con excelentes resultados.

Fijación

La fijación debe realizarse lo más rápidamente posible y consiste en la inmersión en alcohol etílico 40%, aunque algunos autores realizan la fijación en formol 10% tamponado con fosfato sódico (15). La ventaja de realizar la fijación en alcohol etílico es que, al mismo tiempo, se inicia la deshidratación y, además, se evita el lavado en agua destilada durante una noche que suele edematizar los tejidos, por lo que la posterior deshidratación provoca cierta retracción tisular a nivel de la interfase hueso-médula (19).

Es preferible que la obtención de muestras de menor tamaño se realice a partir de un espécimen previamente fijado.

Tanto la fijación como los siguientes pasos de deshidratación e infiltración deben realizarse a 4° C.

Deshidratación

La deshidratación se realiza en series de alcohol etílico de gradación creciente. Es posible que la deshidratación represente el punto crítico del procesado de las muestras calcificadas ya que, aunque se ha señalado que la polimerización es la fase en la que el histólogo puede realizar un menor control, es el nivel de deshidratación de la muestra el que permitirá una polimerización de mejor calidad debido al carácter marcadamente hidrófobo que presenta el MMA (15, 20).

La deshidratación se lleva a cabo a 4° C y previamente debe conseguirse un ligero vacío en los viales; a excepción del aclarado con xileno, cuyo punto de inflamación es de 24° C, con el fin de evitar posibles riesgos. A su vez, se debe atemperar los recipientes antes de cambiar las muestras de solución.

Procedimiento

- Alcohol etílico 70%, 2 baños de 1-2 días.
- Alcohol etílico 95%, 3 baños de 2 días.
- Alcohol etílico absoluto, 1 día.
- Alcohol etílico absoluto, 2 baños de 1 día.
- Xileno, 2 baños de 1 día.

Los tiempos de deshidratación pueden reducirse en gran medida mediante la utilización de procesadores automáticos de tejidos que combinan ciclos de vacío y de presión (15).

Infiltración

La infiltración consiste en sumergir las muestras en soluciones de MMA (monómero), dibutil-ftalato (plastificador) y concentraciones crecientes de peróxido de benzoilo (iniciador) hasta una solución final idéntica a la solución de polimerización.

Esta fase es la más laboriosa de todo el proceso y debe realizarse en campana de gases, habida cuenta de que todos los reactivos que intervienen son tóxicos por inhalación y contacto y, además, el peróxido de benzoilo es explosivo a temperaturas superiores a 70° C (21). Algunos autores (13) aconsejan la sustitución del peróxido de benzoilo por el bis-(4-terbutilciclohexil)-peroxidicarbonato aunque los resultados no son comparables al realizar la fijación en una solución al 4% de formol tamponado 0.1M.

Desestabilización del MMA

El metil-metacrilato comercial (ALDRICH QUÍMICA) se encuentra estabilizado con 10 ppm de hidroquinona-monometil-éter para evitar la polimerización espontánea durante el transporte. La literatura no refleja de manera clara la necesidad de desestabilizar el monómero (13), aunque ciertos autores (15) eliminan la hidroquinona pero no aportan razones que lo justifiquen, y otros (12), la mantienen aumentando la concentración de iniciador. El procedimiento de extracción de la hidroquinona es el siguiente: se lava el monómero estabilizado con hidróxido sódico 5% (p/v) (22) en un embudo de decantación, se agita fuertemente, se deja reposar y se elimina la fracción oscura. Este procedimiento se repite hasta que el efluente sale limpio. El siguiente paso consiste en eliminar los restos de hidróxido sódico, para ello se lava en 100 ml de H₂O(d), se agita y se elimina el efluente; repitiendo la operación 4-5 veces hasta que el efluente muestre un pH neutro. Posteriormente se deseca el monómero filtrándolo a través de cloruro calcico.

Todas las soluciones que contengan metil-metacrilato deben almacenarse a 4° C. Para evitar que dichas soluciones absorban agua por condensación es necesario que los viales que las contengan se atemperen antes de entrar en contacto directo con el ambiente.

Preparación de las soluciones de infiltración

Se preparan tres soluciones diferentes de infiltración.

Solución I

- 75 ml de metil-metacrilato.
- 25 ml de dibutil-ftalato.
- 0,5 ml de a-terpineno al 1% en MMA.

Agitar continuamente durante 2 horas.

El a-terpineno actúa como atemperador durante la polimerización (34).

Solución II

- 75 ml de metil-metacrilato.
- 1 g de peróxido de benzoilo.
- 25 ml de dibutil-ftalato.
- 0,5 ml de a-terpineno al 1% en MMA.

Disolver en primer lugar el metil-metacrilato junto con el peróxido de benzoilo durante una hora y pos-

teriormente añadir el dibutil-ftalato y el a-terpineno y agitar durante dos horas.

Solución III

- 75 ml de metil-metacrilato.
- 2,5 g de peróxido de benzoilo.
- 25 ml de dibutil-ftalato.
- 0,5 ml de a-terpineno al 1% en MMA.

Disolver en primer lugar el metil-metacrilato junto con el peróxido de benzoilo durante una hora y posteriormente añadir el dibutil-ftalato y el a-terpineno y agitar durante dos horas.

Las soluciones I y II pueden guardarse a 4° C durante una semana, pero la Solución III debe prepararse el mismo día de su utilización.

Procedimiento

- Solución I, 3 días.
- Solución II, 4 días.
- Solución III, 6 días.

La infiltración debe llevarse a cabo a 4° C y es conveniente mantener una presión de 22 mm Hg en el interior del vial mediante la utilización de una bomba de vacío (15).

Polimerización

La polimerización, al igual que la deshidratación, presenta una serie de inconvenientes que se han intentado paliar introduciendo numerosas modificaciones en la técnica tales como la utilización de moldes pre-enfriados en agua (23), mezclas de MMA precalentado y baños de agua fría (24), y variando la concentración de iniciador (12). Pero numerosas experiencias (2, 4, 12) demuestran que si se realiza una correcta deshidratación, la polimerización tiene lugar de manera controlada atendiendo al siguiente protocolo.

Previamente se prepara una capa polimerizada en el fondo de un vial de boca ancha de 30 ml vertiendo 5 ml de Solución III recién preparada. Se tapa herméticamente para evitar que el O₂ inhiba la polimerización, y se mantiene a temperatura ambiente durante una noche. A continuación se coloca el vial en un baño termostático de agua a 38° C, produciéndose la polimerización en 1-3 días. Posteriormente se coloca la muestra previamente infiltrada sobre la capa prepolimerizada del vial, se orienta de manera adecuada y se rellena el molde casi completamente con Solución III reciente. Se cierra y se mantiene a temperatura ambiente durante una noche. Transcu-

rrido este tiempo se coloca el vial en un baño termostático de agua a 38° C. La polimerización suele tener lugar a los 2-3 días (19). La muestra una vez incluida se puede almacenar a temperatura ambiente durante mucho tiempo, pero si el espécimen ha sido tratado con diversos fluorocromos (tetraciclinas, verde de calceína, naranja de xilenol, etc.) hay que evitar que sea iluminado de forma directa (fig. 1).

Se aconseja la utilización de envases de vidrio de boca ancha, ya que durante la polimerización se producen corrientes de convección en el medio de inclusión debido al calor generado y este mayor diámetro facilita que se disipe (15).

Corte

La técnica de corte que será descrita corresponde a la preparación y corte de muestras óseas mediante la utilización de microtomos motorizados. La obtención de secciones mediante sofisticados sistemas de corte, desbastado y pulido (18) quedan fuera del propósito de este artículo.

Preparación de la muestra incluida

Los viales con la muestra incluida en la matriz de MMA polimerizada se mantienen a -20° C durante 12 horas para facilitar la separación del cristal. Los viales fríos se envuelven en papel y se golpean suavemente hasta romper el cristal.

Los bloques para microtomía deben tener un tamaño aproximado de 3 X 1 cm, para ello se utiliza una sierra con cuchilla de diamante (ACCUTOM-2) a una velocidad de desplazamiento de 0,8-1,0 mm/min y 2800 rpm. La muestra debe quedar centrada en el bloque.

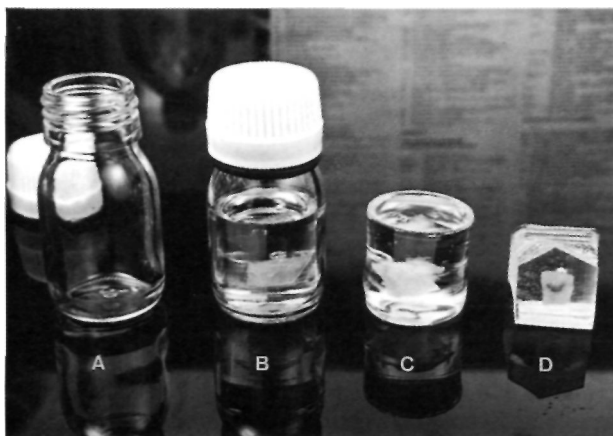


Figura 1. Fotografía en la que se muestran A) vial de polimerización, B) biopsia incluida en el polimerizado, C) bloque sin desbastar y D) bloque preparado para el corte.

Preparación de porta-objetos gelatinados

Los porta-objetos deben ser tratados previamente mediante la siguiente mezcla gelatinada para conseguir que las secciones queden firmemente adheridas a los mismos (19).

Solución A

- Gelatina, 4,5 g.
- H₂O(d), 1000 ml.

Solución B

- Solución al 4% (p/v) de sulfuro de potasio y cromo.

Mezcla

- Solución A, 100 ml.
- Solución B, 3,85 ml.

Se agita la mezcla y se calienta a 50° C. Sumergir los porta-objetos durante 2 minutos y finalmente escurrir y secar a temperatura ambiente.

Corte y montaje

El microtomo debe ser motorizado y preferiblemente de deslizamiento vertical (Leitz 1516). La motorización es absolutamente indispensable, ya que es necesario que durante el proceso de corte se mantenga constante una velocidad mínima. La cuchilla debe ser de tipo-D y con filo recubierto de carburo de tungsteno (MICROM, Heidelberg; SPIKKER 8805; o bien JUNG HK-2).

El grosor de corte mínimo que se puede obtener con esta técnica es de 3-5 μ m que permite enfoques precisos a microscopía óptica (100X, 200X). Las secciones que se pretenda analizar mediante microscopía de fluorescencia deben tener un grosor de 15 μ m y se debe evitar la incidencia directa de luz sobre las mismas cuando no estén siendo observadas.

Se humedece continuamente el filo de la cuchilla y la superficie de corte del bloque con alcohol etílico 40% a partir del momento en el que comienza el corte (fig. 2); se recoge la sección con unas pinzas y se coloca sobre un baño termostático de H₂O(d) a 60-70° C que expande el corte y evita posibles arrugas (15). Se recoge la sección y se coloca sobre el porta-objetos gelatinizado. Baron et al. (19) no emplean el baño de agua, sino que colocan el corte directamente sobre un porta-objetos cubierto con alcohol etílico 96%, extendiendo la sección con ayu-

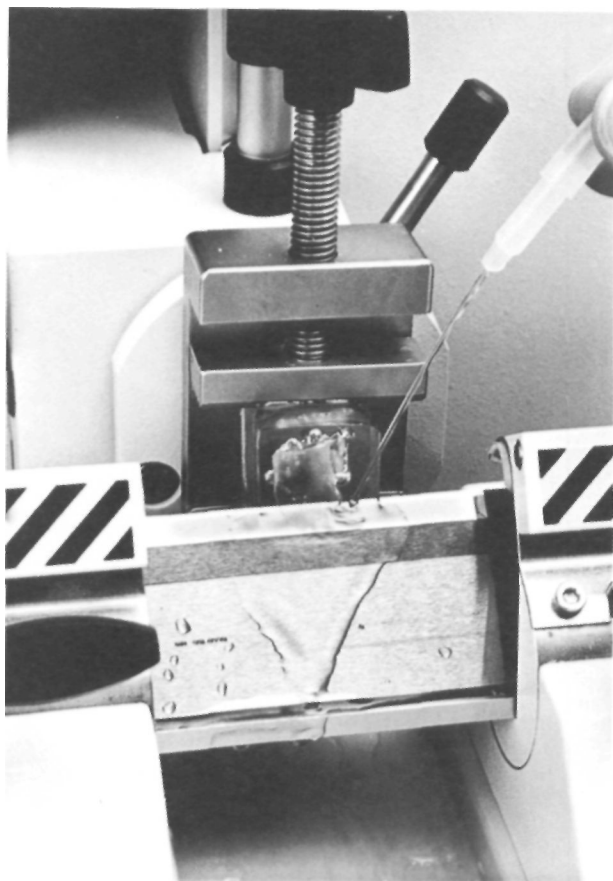


Figura 2. Imagen de la cuchilla durante el proceso de corte en la que se observa el lavado continuo con alcohol etílico 40% al que se ve sometida la sección.

da de un pincel fino, aunque los resultados no son óptimos. Se coloca una lámina de teflón sobre el corte y se desliza un rodillo fotográfico sobre la muestra para eliminar las gotas de agua que han quedado atrapadas (fig. 3). Se colocan los porta-objetos separados por papel secante en una prensa para escurrirlos y se dejan a 40-50° C durante una noche. Posteriormente, se eliminan las láminas de teflón y de papel secante y se mantienen los porta-objetos a temperatura ambiente.

Tinción

El protocolo de tinción comienza con la desplastificación de las secciones para eliminar el metilmetacrilato mediante 3 baños de 25 minutos de Cellosolve (etilén-glicol-monoetil-éter, SIGMA QUÍMICA) (19, 25). A continuación, se rehidratan los cortes en series de alcohol de gradación decreciente. Las técnicas de tinción empleadas son el azul de toluidina-0 (C.I. 52040, ALDRICH) a pH 3,7 (19) que ofrece un magnífico detalle celular y una marcada diferenciación del osteoide (fig. 4), y una variante del tricrómico de Masson-Goldner (26) que, aunque im-

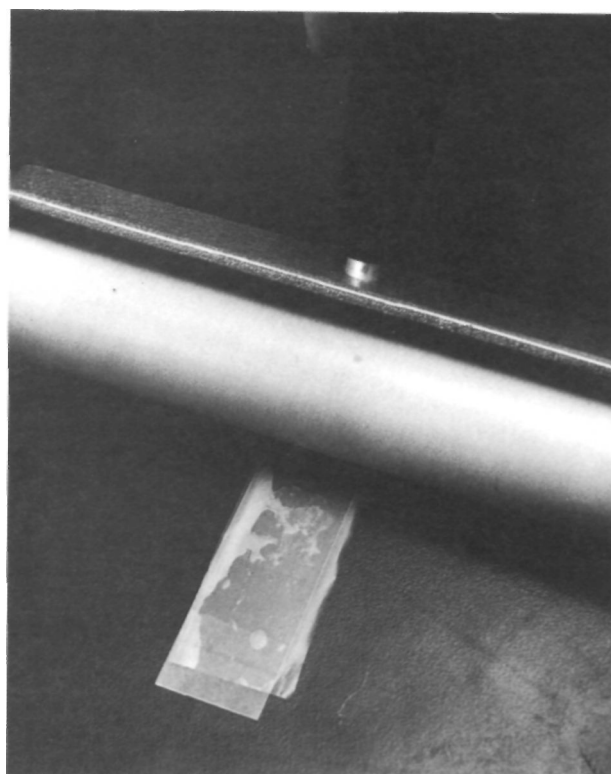


Figura 3. El deslizamiento del rodillo fotográfico sobre la sección facilita la eliminación de las gotas de agua localizadas entre la sección y el portaobjetos.

posibilita una cuantificación histomorfométrica adecuada mediante técnicas de análisis de imagen semiautomático, permite obtener excelentes fotografías en color. Recientemente ha aparecido publicada una nueva técnica (27) que facilita la diferenciación entre hueso trabecular y hueso medular en aves, objetivo que la clásica tinción de von Kossa no conseguía. Estas técnicas de tinción son las utilizadas de manera rutinaria en nuestro laboratorio con excelentes resultados pero existen numerosos protocolos de tinción que son aplicables a muestras óseas incluidas en MMA (2, 19, 28, 29).

Los marcajes *in vivo* con diversos tipos de fluorocromos no pueden ser considerados en ningún caso como tinciones, por lo que las secciones que sean analizadas mediante microscopía de fluorescencia (fig. 5) no deben ser teñidas y se tiene que evitar la incidencia de luz directa sobre las preparaciones, ya que provocaría una disminución de la intensidad del haz emitido.

DISCUSIÓN

Si bien el glicol-metacrilato (GMA) presenta una serie de ventajas frente al metil-metacrilato (MMA)

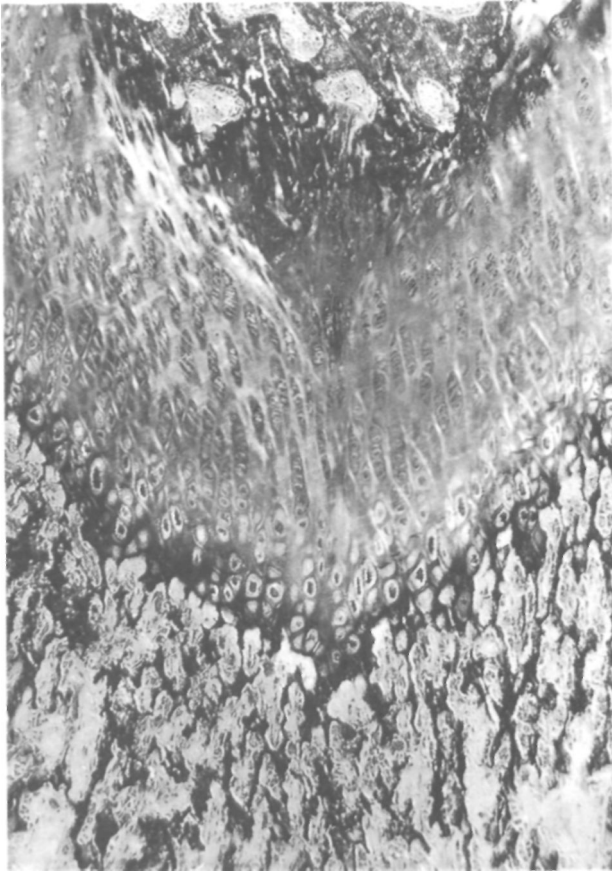


Figura 4. Sección longitudinal de la iisis distal de la tibia/peroné de conejo (Azul de toluidina-O, contraste interferencial-diferencial, aumento original 100X).

tales como: a) menor toxicidad, b) menor producción de calor durante la polimerización, c) no necesitar una deshidratación completa de la muestra al ser un monómero miscible en agua y d) facilidad en la extensión de la sección sobre el porta-objetos; manifiesta un grave inconveniente al no poderse eliminar fácilmente de los cortes debido a la formación de enlaces cruzados (*cross-links*) durante la polimerización. En cambio, el MMA polimeriza únicamente formando largas cadenas que no evidencian enlaces entre sí y, por ello, son eliminadas rápidamente sin necesidad de utilizar solventes agresivos (30).

Diversos estudios histoquímicos (31) sugieren que si bien la inclusión en GMA proporciona una adecuada infiltración del cartílago y preserva la actividad de la fosfatasa alcalina asociada a los osteoblastos, el MMA supone un soporte idóneo para el hueso cortical y trabecular y brinda una mejor conservación de la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina de la matriz cartilaginosa y de la fosfatasa ácida de los osteoblastos.

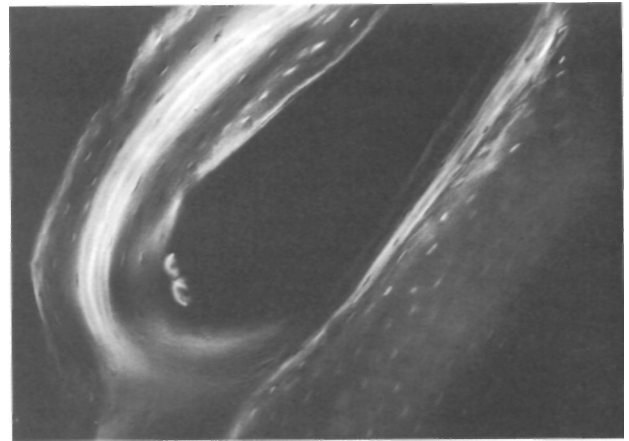


Figura 5. Sección longitudinal de la epífisis proximal del fémur de conejo en el que se observa un doble marcaje de tetraciclina alrededor de una osteona (muestra sin teñir, epifluorescencia, aumento original 200X).

Con el fin de facilitar la polimerización y la formación de bloques Ubres de burbujas, algunos autores (32) proponen la utilización de un monómero de inclusión parcialmente polimerizado, pero este procedimiento genera gases tóxicos y requiere una especial atención para evitar una reacción exotérmica rápida y violenta.

Frankel y Martin (11) sugieren la utilización de unas soluciones de infiltración e inclusión cuyos componentes mayoritarios son el 2-hidroxipropil metacrilato, 2-butoxi-etanol, trietilenglicol dimetacrilato, peróxido de benzoílo, polietilenglicol 400 y N, N-dimetilanilina. El polietilenglicol 400 actúa reblandeciendo la muestra y el 2-butoxi-etanol es un plastificador, el trietilenglicol dimetacrilato proporciona flexibilidad y estabilidad estructural al polímero y la combinación de peróxido de benzoílo y N, N-dimetilanilina acelera la polimerización al producirse una degradación redox del peróxido (33). El empleo como monómero único de GMA da lugar a plásticos excesivamente duros que provocan la aparición de cortes con numerosas arrugas. Esta técnica rinde excelentes resultados y el proceso de polimerización tiene lugar a 4 ° C, pero tanto los reactivos como las cápsulas de gelatina que se emplean como moldes son difíciles de conseguir y de elevado precio. Similares desventajas se hacen patentes en diversos kits comerciales como la historesina LKB (9).

Buijs y Dogterom (13) incluyen como último paso de deshidratación un baño en metanol durante 18 horas en un Soxhlet que facilita la eliminación de las últimas trazas de agua. Como modificación a la técnica descrita en el presente artículo estos autores proponen la sustitución del peróxido de benzoílo como

iniciador por el *bis* (4-ter-butilciclohexil) peroxidicarbonato que no manifiesta propiedades detonantes y su contenido en agua es ínfimo. El motivo por el que se recomienda dicho iniciador es que genera temperaturas más bajas durante la polimerización lo que implica dos claras ventajas: a) la conveniencia de ser utilizado en análisis de histoquímica enzimática y b) la mayor dificultad en alcanzar el punto de ebullición del MMA A (103° C). En la actualidad, nuestro laboratorio se encuentra en fase de ensayos preliminares de utilización de dicho reactivo.

La inclusión de muestras óseas con implantes en MMA presenta una serie de inconvenientes que pueden solventarse infiltrando los especímenes bajo condiciones de vacío y a temperaturas de 4 ° C. En

algunos casos se aconseja modificar las concentraciones de plastificador para conseguir una mayor dureza del bloque (13). El procesado de tales muestras precisa de sofisticados equipos de corte, desbastado y pulido como el sistema Exakt (18) que permite controlar el procedimiento de desbastado favoreciendo la obtención de cortes muy precisos.

El método descrito representa una técnica de rutina en nuestro laboratorio que permite el procesado de muestras óseas mineralizadas de diversos tamaños, pero cuya principal limitación la constituyen los dilatados períodos de tiempo necesarios para la correcta deshidratación e infiltración de los especímenes.

Bibliografía

1. Villanueva AR, Sypitkowski C, Parfitt AM. A new method for identification of cement lines in undecalcified plastic embedded sections of bone. *Stain Technol* 1986; 61: 83-8.
2. Villanueva AR. Basic preparation and staining of undecalcified bone. En: Sheehan DC, Hrapchack B, editors. *Theory and practice of histotechnology*. 2nd ed. St Louis: C V Mosby Company 1980; 96-107.
3. Frost HM. Tetracycline-based histological analysis of bone remodeling. *Calcif Tissue Res* 1969; 3: 211-37.
4. Villanueva AR, Lundin KA. A versatile new mineralized bone stain for simultaneous assessment of tetracycline and osteoid seams. *Stain Technol* 1989; 64: 129-38.
5. Gruber HE, Stauffer ME, Thompson ER, Baylink DJ. Diagnosis of bone disease by core biopsies. *Semin Hematol* 1981; 18: 258-78.
6. Borysko E. Recent developments in methacrylate embedding. *J Biophys Biochem Cytol* 1956; 2. Suppl 4: 3-14.
7. von Hirsch T, Boellaard JW. Methacryl-säureester als einbettungsmittel in der histologie *Z Wiss Mikr* 1958; 64: 24-9.
8. Bennet HS, Wyrick AD, Lee SW, McNeil JH. Science and art in preparing tissues embedded in plastic for light microscopy, with special reference to glycol methacrylate, glass knives and simple stains. *Stain Technol* 1976; 51: 71-97.
9. Yeung EC, Law SK. Serial sectioning techniques for a modified LKB historesin. *Stain Technol* 1987; 62: 147-53.
10. Leduc EH, Holt SJ. Hydroxypropyl methacrylate, a new water-miscible embedding medium for electron microscopy. *J Cell Biol* 1965; 26: 137-55.
11. Franklin RM, Martin M-T. Staining and histochemistry of undecalcified bone embedded in a water-miscible plastic. *Stain Technol* 1980; 55: 313-21.
12. Kenner GH, Henricks L, Giménez G, Barb W, Park JB. Bone embedding technique with inhibited PMMA monomer. *Stain Technol* 1982; 57: 121-6.
13. Buijs R, Dogterom AA. An improved method for embedding hard tissue in polymethyl methacrylate. *Stain Technol* 1983; 58: 135-41.
14. Hipp JA, Brunski JB, Cochran GVB. Method for histological preparation of bone sections containing titanium implants. *Stain Technol* 1987; 62: 247-52.
15. Emmanuel J, Hornbeck C, Bloebaum RD. A polymethyl methacrylate method for large specimens of mineralized bone with implants. *Stain Technol* 1987; 62: 401-10.
16. Villanueva AR. Methods for preparing and interpreting mineralized sections of bone. *Proceedings of the first Workshop on Bone Morphometry*; 1973 Mar 21-31; Ottawa. University of Ottawa. 1973.
17. Smith LG, Karagianes MT. Histological preparations of bone to study ingrowth into implanted materials. *Calcif Tissue Res* 1974; 14: 333-7.
18. Donath K. Preparation of histologic sections by the cutting-grinding technique for hard tissue and other material nor suitable to be sectioned by routine methods. Equipment and methodical performance. EXAKT Kulzer Publication, Norderstedt 1990; 1-16.
19. Baron R, Vignery A, Neff L, Silverglate A, Santa Maria A. Processing of undecalcified bone specimens for bone histomorphometry. En: Recher RR, editor. *Bone histomorphometry: Techniques and interpretation*. Boca Raton, Florida: CRC Press Inc, 1983; 13-15.
20. Evans RA, Dunstan CR, Baylink DJ. Histochemical identification of osteoclasts in undecalcified sections of human bone. *Miner Electrolyte Metab* 1979; 2: 179-85.
21. Bretherick L. *Hazards in the laboratory*. 3rd ed. London: Royal Society of Chemistry, 1981.
22. Burck HC. *Histologische technik*. 3rd ed. Stuttgart: George Thieme, 1973.
23. Savelkoul TJE, Visser WJ, Roelofs JMM, Lentferink MHF. A rapid method for preparing undecalcified sections of bone for autoradiographic investigation with short-lived radionuclides. *Stain Technol* 1983; 58: 1-5.
24. Chappard D, Alexandre C, Camps M, Montheard JP, Riffat G. Embedding iliac bone biopsies at low temperature using glycol and methyl methacrylate. *Stain Technol* 1983; 58: 299-308.
25. Lloyd J. Removing K-plast or any MMA from sections. *Hard Times Communique*, National Society for Histotechnology, 1991, 4-5.

26. **Gruber HE.** Adaptations of Goldner's Masson trichrome stain for the study of undecalcified plastic embedded bone. *Biotech Histochem* 1992; 67: 30-4.
27. **Lynch M, Maxwell MH.** Differentiation of cancellous bone and medullary bone in laying hens: a novel technique for image analysis. *Biotech Histochem* 1991; 66: 303-6.
28. **Bancroft JD.** Theory and practice of histological techniques. 2nd ed. New York: Churchill Livingstone Inc.; 1982.
29. **Schenk RK, Olah AJ, Herrmann W.** Preparation of calcified tissues for light microscopy. En: Dickson GR, editor. *Methods of calcified tissue preparation*. Amsterdam: Elsevier, 1984; 1-56.
30. **Meeuwse F.** A new plastic (K-Plast)[®] based on methylmethacrylate for lightmicroscopy. *Histotechnick* 1986; 3: 1-5.
31. **Gruber HE, Marshall GJ, Nolasco LM, Kirchen ME, Rimoin DL.** Alkaline and acid phosphatase demonstration in human bone and cartilage: Effects of fixation interval and methacrylate embedments. *Stan Technol* 1988; 63: 299-306.
32. **Difford J.** A simplified method for the preparation of methyl methacrylate embedding medium for undecalcified bone. *Med Lab Technol* 1974; 31: 79-81.
33. **Hott M, Marie PJ.** Glycol methacrylate as an embedding medium for bone. *Stain Technol* 1987; 65: 51-7.
34. **Gottfredsen K, Budtz-Jorgensen E, Jensen LN.** A method for preparing and staining histological sections containing titanium implants for light microscopy. *Stain Technol* 1989; 64: 121-7.