

Análisis estequiométrico de cálculos pulpaes

Por medio de meb y edx

Jaime Darío Mondragón Espinoza

Profesor titular de Endodoncia e Investigador de Clínicas Odontológicas Integrales del Centro Universitario de Ciencias de la Salud (CUCS) de la Universidad de Guadalajara

Rubén Varela Ochoas

Manuel Andrés López Avalos

Hermes Ulises Ramírez Sánchez

José Luis Meléndez Ruiz

Carlos Guerrero Bobadilla

Manuel León Contreras

Profesores titulares de Endodoncia, Odontopediatria, Prótesis y Microscopía e Investigadores de la Universidad de Guadalajara

Resumen

El propósito de este estudio fue analizar la composición química de los cálculos pulpaes. Se seleccionaron, 40 nódulos pulpaes de molares humanos, los que fueron fijados en formalina al 10% para su posterior evaluación mediante MEB y EDX. Los resultados revelaron que la composición química elemental de los cálculos pulpaes es: oxígeno, 54,01%; calcio, 29,67%; fósforo, 12,01%; silicio, 0,85%; magnesio 0,80%, y zinc 0,63%. Al contrastar la relación porcentual en peso de los compuestos comunes de los cálculos pulpaes encontramos: fosfato dicálcico dihidratado (brushita), fosfato α -tricálcico (whitlockita), fosfato octacálcico, y finalmente hidroxapatita.

Bajo las condiciones de este estudio, concluimos que la composición típica de los cálculos pulpaes está formada por varios tipos de fosfato de calcio, siendo el más abundante la brushita, seguido por whitlockita e hidroxapatita.

Summary

The purpose of this study was to analyze the chemical composition of pulp denticles using an X-Ray Dispersive Energy (EDX), coupled to a Scanning Electronic Microscope (SEM).

There were included in the study 40 denticles from human molars, which were fixed in 10% formalin for further evaluation by SEM and EDX. The results showed that the chemical composition of the denticles was as follows: Oxygen 54.01%, Calcium 29.67%, Phosphorus 12.01%, Silicon 0.85%, Magnesium 0.80%, and Zinc 0.63%.

The contrast of the percentage relation in weight of the common compounds of the denticles showed: bicalcium phosphate bihidratado (brushite), α -tricalcium phosphate (whitlockite), octacalcium phosphate, and finally hydroxapatite.

Under the conditions of this study we have concluded that the typical composition of the denticles is formed by several types of calcium phosphate

Introducción

El estroma pulpar es un sitio donde de manera frecuente y por causas metabólicas, traumáticas cariosas, periodontales entre otras, se forman cálculos pulpaes durante los diferentes estadios biológicos de los tejidos dentarios y como respuesta a las condiciones terapéuticas que se desarrollan en el quehacer clínico, que en un momento dado pudiesen comprometer el pronóstico de las piezas a través del tratamiento convencional de conductos radiculares¹⁻²⁻³

Es un fenómeno común que puede observarse hasta en edad temprana y sobre todo en piezas dentales con inflamación pulpar crónica, en aquellas con zonas de necrosis, y alrededor del núcleo de células necróticas individuales en la pulpa inflamada.⁴

Odontológicamente se han introducido y empleado muchas técnicas histoquímicas a fin de estudiar la estructura fina de los tejidos bucales y aquellas que aparecen por excitación del estroma pulpar, dentro de ellas destacan la microscopía electrónica, microradiografía, microanálisis con haz electrónico difracción de Rx, espectrografía con Rx, energía dispersiva de Rx, fosforescencia, luz polarizada, etc., a fin de descubrir con precisión los sitios de actividad enzimática elevada o baja en las células pulpaes y todo ello se da a través de la identificación de los constituyentes químicos de los cálculos pulpaes.

2-4-5-6-7-8

El propósito del presente trabajo fue determinar la composición química elemental y molecular de los cálculos pulpaes en molares humanos con microscopía electrónica de barrido (MEB) y energía dispersiva de rayos X (EDX)

Materiales y métodos

En el presente estudio se utilizaron 80 pulpas de molares superiores e inferiores, los que requirieron de tratamiento endodóntico por presentar pulpitis irreversible, en pacientes de ambos géneros entre 20 y 50 años de edad y con obliteración de la cámara pulpar visible radiográficamente (Figura 1).

Establecido el diagnóstico clínico y radiográfico, se procedió a realizar el tratamiento, siguiendo los procedimientos de la técnica endodóntica convencional; considerando al realizar la apertura que ésta fuese lo suficientemente amplia y cuidadosa para no tocar con los instrumentos rotatorios y manuales el tejido nodular y pulpar, facilitando así su remoción.

Removidas las pulpas y/o calcificaciones, se procedió a colocarlas durante 120 días en frascos individuales que contenían una solución de formalina neutra al 10%. Transcurrido el período de almacenaje, los especímenes se dejaron secar al medio ambiente durante 72 horas, para ser analizados a través de tres técnicas:

- a) Lupa con luz integrada.
- b) Microscopía electrónica de barrido.
- c) Espectroscopia de energía dispersiva de rayos-x.

a) El primer paso fue determinar la presencia de las calcificaciones utilizando un examen visual, el cual se realizó con una lupa con luz integrada (Parlinda H.K.) con una capacidad de amplificación 4X, realizando con ella la primera observación de la pulpa coronaria y Radicular, comprobando la presencia de estructura dura con la punta de un explorador endodóntico DG-16 (Maillefer Baillagues, Swiss), recolectándose después de esta observación los 40 nódulos cálcicos de mayor tamaño para ser evaluados.

b) La observación por MEB (JEOL 5400LV, Japan) consistió en colocar las muestras en la cámara del mismo, bajo un vacío de 1×10^{-6} Torr (Alto vacío), un voltaje de aceleración de 20 KV y una distancia de trabajo de 20 mm y así analizar la estructura de los diversos cálculos pulpares, utilizando electrones secundarios para obtener imágenes con amplificaciones de 35X a 2000X (Figs. 2-5).

c) Una vez observados y microfotografiados los cálculos, se procedió a microanalizarlos seleccionándose al azar dos zonas de la superficie externa y dos zonas de la porción interna, con amplificaciones de 1500X, para detectar si existían diferencias entre los diversos elementos que las componen. Para ello se utilizó un detector de EDX Super Quantum Dry (Quantex Fisons Instruments, Maynard, USA) durante 100 seg. Con él se obtuvo la información, que, procesada a través de un sistema de cómputo, dio como resultado el porcentaje en peso y molecular de cada uno de los elementos

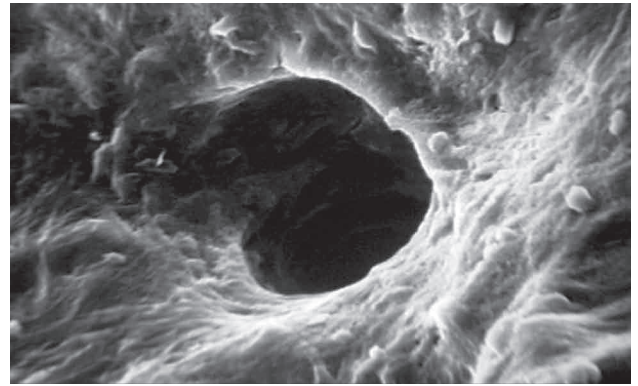


Fig.1. Tubulo dentinario de porción interna de cálculo pulpar mostrando múltiples adherencias cálcicas (5000X).

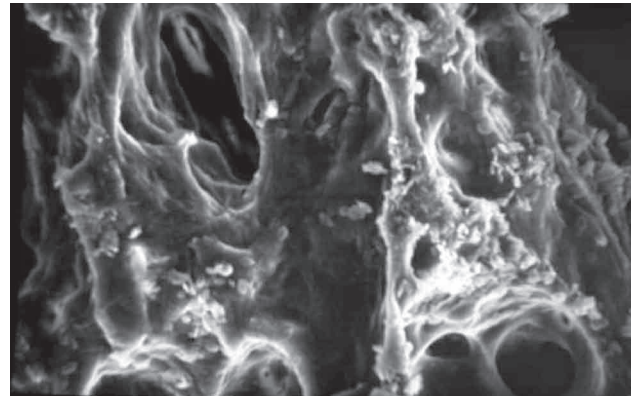


Fig. 2. Microfotografía de porción central de cálculo pulpar que muestra la forma en que el tejido cálcico rodea los vasos sanguíneos (2000X).

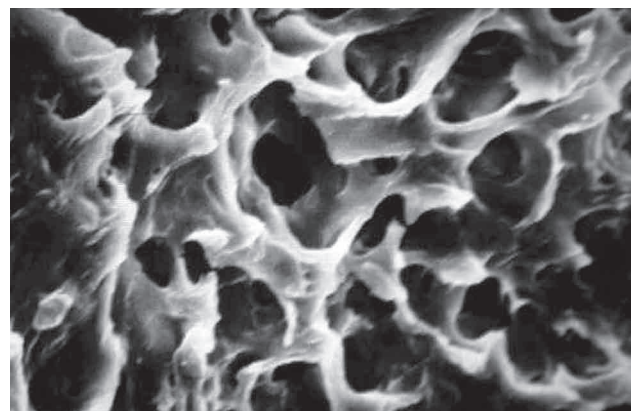


Fig. 3. Estructuras cálcico fosfatadas cristalinas características de fosfato -tricálcico (whitlockita) (2000X).

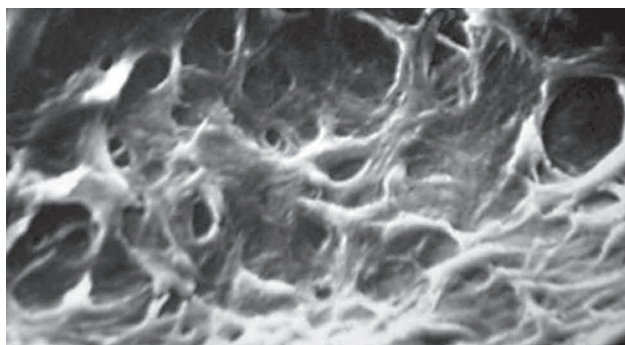


Fig. 4. Microfotografía de la parte central de cálculo pulpar que muestra una intensa red de fibras calcificadas interconectando las porciones internas de las paredes de los mismos (2000X).

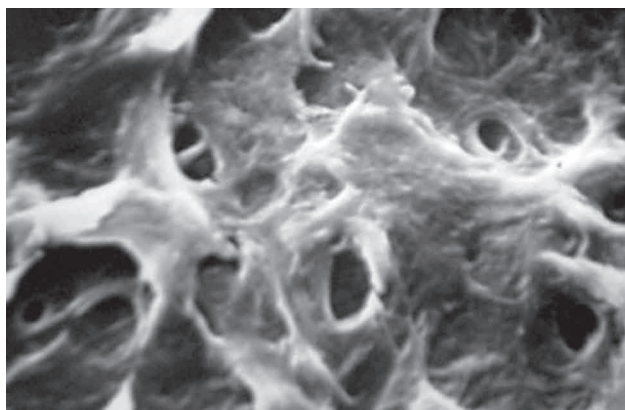


Fig. 5. Acercamiento que nos permite observar la estructura fibrilar densa que sirve de matriz a la masa cálcica de los diversos nódulos (2000X).

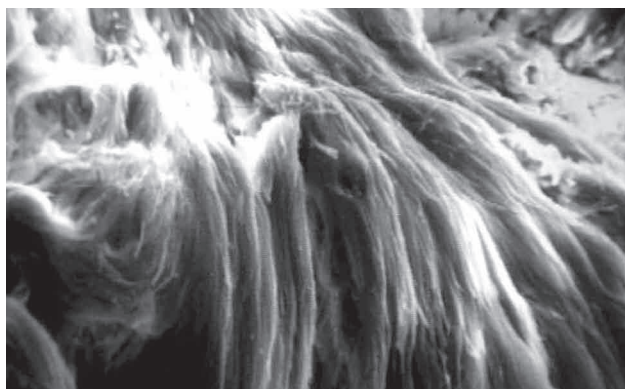


Fig. 6. Conglomerado que nos permite observar las estructuras cristalinas de las sales de fosfato de calcio características de la dentina (Brushita y Whitlockita) (5000X).

Tabla 1. Microanálisis de 40 cálculos pulpares de molares humanos de acuerdo con el valor porcentual promedio de sus elementos constitutivos

ELEMENTO	MEDIA	SUMATORIA	VARIANZA	DESV. EST.
OXÍGENO	54,019	1080,38	81,3566	9,0197
FÓSFORO	12,012	240,24	24,0687	4,7819
CALCIO	29,6745	593,49	80,9418	8,9843
SILICIO	0,859	17,18	4,2271	2,0560
MAGNESIO	0,8005	16,01	7,2522	2,6930
ZINC	0,6395	12,79	3,2922	1,7740

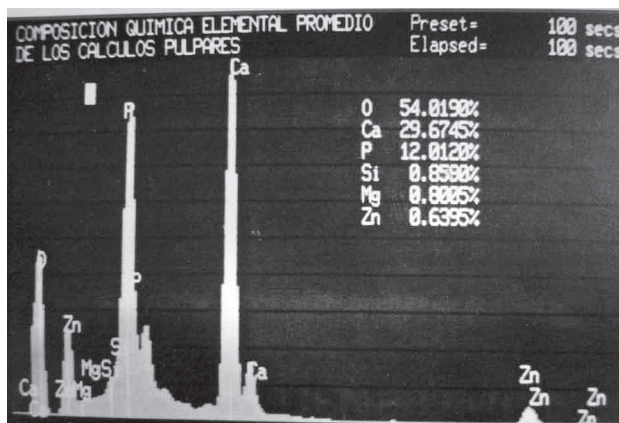


Fig. 7. Microanálisis de espectroscopia de EDX de cálculos pulpares, con una distancia de trabajo de 20mm y un voltaje de aceleración de 20 KV durante 100 segundos.

presentes en las muestras (Fig. 6).

Una vez obtenidos los datos de las muestras estudiadas, los valores de los elementos constitutivos fueron promediados mediante distribución normal de acuerdo con su porcentaje en peso, para proceder a realizar un análisis estequiométrico y así obtener la probable estructura molecular de los compuestos encontrados. Posteriormente, éstos fueron contrastados con los porcentajes de los fosfatos cálcicos más comunes encontrados por Kodata y cols¹¹ en los nódulos pulpares.

Resultados

Una vez microanalizados los 40 cálculos pulpares seleccionados se descartó una de las zonas de lectura, por no mostrar diferencia significativa entre ellas. Estos microanálisis revelaron la presencia de seis elementos en su composición química, siendo éstos oxígeno, calcio, fósforo, con pequeñas trazas de magnesio, silicio y zinc.

El valor porcentual de los elementos constitutivos de la muestra fue el siguiente: oxígeno, 54,01%; calcio, 29,67%; fósforo, 12,01%; silicio, 0,85%; magnesio, 0,80% y zinc, 0,63% (Tabla 1).

De acuerdo con los valores encontrados en relación con el porcentaje en peso, los compuestos químicos formados en los cálculos pulpares son: fosfato dicálcico dihidratado o brushita ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); fosfato ζ -B-tricálcico o whitlockita [$\text{Ca}_{10}(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_6$]; fosfato octacálcico [$\text{Ca}_8(\text{PO}_4)_4(\text{HPO}_4)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$] e hidroxiapatita [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$].

Discusión

Ante el hecho innegable de que las calcificaciones pulpares se producen como resultado de un estímulo intenso que sobreexcita el contenido celular de la pulpa, y que da como resultado la formación de neoestructuras cálcico-fosfatadas heterogéneas, amorfas, compactas y, en algunos casos, con una estructura cristalina definida, adheridos a la pared dentinaria y/o apropiándose del estroma pulpar de manera parcial o total.^{9-10-11-12-13.}

De tal manera, la gran ventaja de la histoquímica microscópica y la energía dispersiva de rayos x, está en la identificación de los constituyentes químicos y su localización exacta.² La invasión de los tejidos del huésped por microorganismos o sus productos generalmente induce una amplia variedad de reacciones inmunopatológicas.¹⁴⁻¹⁵ La liberación de enzimas histolíticas, toxinas y otros productos del metabolismo bacteriano constituyen el primer elemento que agrede a pulpa y periodonto y se difunde a las estructuras aledañas produciendo irritación inflamatoria, la presencia de macrófagos residentes se activa para combatir los antígenos presentes, así como por el sistema de complemento a través de la vía alternativa como defensa innata. Los macrófagos poseen receptores que reconocen componentes de la superficie de los antígenos (receptor a manosa, glicano, CD14 y el de ligadura a lipopolisacárido) favoreciendo la fagocitosis. Además la activación de macrófagos aumenta su capacidad de presentar antígenos a los linfocitos y sintetizar mediadores biológicos como interleucinas IL1, IL6, IL8, TNF, prostaglandinas, leucotrienos, enzimas lisosomales, radicales oxigenados y nitrogenados,³⁻²⁴

El factor de necrosis tumoral (TNF) estimula la producción local de prostaglandina y ambas inducen la secreción de metaloproteinasas, las cuales ejecutan la destrucción del tejido conectivo y la disolución de la matriz orgánica.


16-17-18-19-20

Asimismo, un cuerpo extraño depositado en el tejido pulpar sirve de matriz para la formación de estructuras concéntricas-fosfatadas, por lo que es imprescindible en el trabajo clínico el extremar los cuidados en el acto operatorio, sobre todo cuando esté expuesto el tejido pulpar.¹²⁻¹³

De acuerdo con los hallazgos reportados por los diversos autores, son los molares las piezas dentales más afectadas por la presencia de cálculos en su estroma pulpar. Esta situación podría deberse a diferentes razones, como: el hecho de que los primeros molares son las piezas dentarias que erupcionan más precozmente; su predisposición a caries dental; el estrés masticatorio; la acción de procedimientos operatorios, etc. Asimismo, estas calcificaciones también han sido observadas en dientes anteriores sometidos a pulpotomía y desgastes patológicos, como atrición, abrasión y erosión²⁻³⁻⁵

Los resultados obtenidos en el presente estudio revelaron que en la composición química elemental de los cálculos pulpares es preponderante la presencia de diversos tipos de fosfato de calcio, los cuales se presentan por interacción de otros fosfatos en desintegración, con dureza tipo 3 (escala de Mohs) similar a la calcita, con intensidad y formas diversas, con tendencia a las formas romboédricas y con capacidad de asociarse a otros minerales presentes en los líquidos tisulares.¹⁰⁻¹¹⁻¹²⁻¹³

Los porcentajes de los elementos que se obtuvieron con EDX, una vez confrontados con el análisis estequiométrico de las sales de fosfatos de calcio más comúnmente encontradas en las estructuras dentales, mostraron la presencia de brushita y whitlockita como las estructuras cálcico-fosfatadas más identificadas, así como la presencia de hidroxiapatita y fosfato octacálcico.

Creemos conveniente que se realicen nuevos estudios en los cuales se correlacione la estructura cristalina con la composición química de los fosfatos de calcio de los cálculos pulpares. 

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Seltzer, S.; Bender, I.B. *La pulpa dental*. 1a Ed. Esp.: Ed. Mundi. 225-249, 1970.
2. Orban, J.B. *Histología y embriología bucales*. 1a Reimpresión. La Prensa Médica Mexicana. 146-152, 1976.
3. Conway, J.C. Baunhammers, G. "Scanning electron microscopy examination on surfaces and margins: a scanning electron microscopy investigation." *J. Prosth. Dent.* 27: 622-631, 1972.
4. Frank, R.M. "The structure of human dentin." *Third European Symposium on Calcified Tissues*, p. 259-271, 1965.
5. Gerould, C.H. "Ultraestructuras de la dentadura humana como reveladas por la microscopía electrónica." *J. Dent. Res.* 23: 239-245, 1994.
6. Boyd, A.; Knight, P.J. "The use of clinical dental research." *Br. Dent. J.* 127: 313-322, 1996.
7. Kubota, K.; Ajisaka, M.; Inoue, Y.; Yamaguchi, S. And Hasegawa, L. "Scanning electron microscopy observation of longitudinal and sectioned dentinal tubules." *J. Nikon Univ. SCH Dent.* Tokyo, Japan 11: 140-143, 1969.
8. Richard, A.G.; Thomassen, L. "Microestructura de superficies de dientes como reveladas por la microscopía electrónica." *J. Am. Dent. Assoc.* 31: 722-726, 1994.
9. Iacobelli, L.; Ippolito, A.; Ianinciello, L.; Riccitiello, F. "Calcificaciones pulpares. Investigación por el SEM y esteromicroscopio." *J. De Clin. En Odont.* 6: 5-10, 1995/1996.
10. Kodata, T.; Debari, K.; Sano, T.; Yamada, M. "Scanning electron microscopy and energy-dispersive x-ray microanalysis studies of several human calculi containing calcium phosphate crystals." *Scanning Microscopy* 8: 241-257, 1994.
11. Brannstrom, M., Johnson, G. "Effects of various conditioners and

- cleaning agents of prepared dentin surfaces: a scanning electron microscopy investigation." *J. Prosth. Dent.* 31:422-430, 1974.
12. LeGeros, R.Z.; Orly, I.; LeGeros, J.P.; Gómez, C.; Kasimiroff, J.; Tarpley, T.; Kevedel, B. "Scanning electron microscopy and electron probe microanalysis of the crystalline components of human and animal dental calculi." *Scan. Micr.* 3: 345-356.
13. Saxon, C.A. (1968): "Identification of octacalcium phosphate in human dental calculus by electron diffraction." *Arch. Oral Biol.* 13: 243-246, 1998
14. Jiang Y, Russel Tr, Schilder H, Graves DT. "Edodontic pathogens stimulate monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in mononuclear cells." *Int Endod J.* 24 (2). 1998.
15. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Imunología celular e molecular*. 4 ed. Resentir. Rio de Janeiro. 2003.
16. Siquiera Jr JF, Dantas CJS. *Mecanismos celulares e moleculares da inflamação*. Rio de Janeiro: Medis, 2000: 238.
17. Tsai CH, Huang FM, Yang LC, Chou MY, Chang YC. "Immunohistochemical localization of ciclooxigenase-2 in Radicular cysts." *Int. Endod J* 2002; 35: 854-8.
18. Ten Cate AR. *Histología Bucal. Desarrollo, Estructura e Función*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001: 439.
19. Kettering JD, Torabinejad M. "Microbiología e Imunología." In: Cohen S, Burns E. "Caminhos da polpa." 7 Ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. 2000.
20. Nair PNR. "Apical Periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response." *Periodontol* 2000. Copenhagen, 1997; 13: 121-146.