

Análisis semicuantitativo del calcio y fósforo en el esmalte y la dentina

CLEMENTE-PRESAS A; GARCÍA-MOLINA JA; GRECO-MACHADO Y; CARVALHO-LOBATO P;
BELMONTE-CALDERÓN A; SERRA-RENOM I; MANZANARES-CÉSPEDES MC.

Unidad de Anatomía Humana
Departamento de Anatomía y Embriología Humana.
Universidad de Barcelona, España

Resumen

Existe una serie de características comunes asociadas al proceso biológico de formación de los tejidos calcificados a pesar de que los productos finales sean estructuralmente distintos. La presente investigación tiene como propósito determinar si la ratio Ca/P ratio es la misma para los tejidos calcificados dentales tanto del feto como del adulto y si dicha ratio es diferente al valor de la ratio Ca/P de la hidroxiapatita pura calculada por estequiometría. Se escogió como material de observación el esmalte y la dentina, en muestras de fetos humanos y en un total de 30 ratas adultas de raza Wistar y 20 dientes humanos sanos. Las observaciones se llevaron a cabo por medio de Microscopía Electrónica de Barrido y Microanálisis por separación de energía de rayos X. Los valores totales de la ratio Ca/P para el esmalte oscilaron en un intervalo de 0,9 y 1,2, con una media que se encuentra entre 1,07 y 1,08. Los valores totales de la ratio Ca/P para la dentina oscilan entre 1,03 y 1,12 y la media entre 1,07 y 1,075. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre esmalte fetal y adulto ni entre la dentina fetal y adulta. Aún no pudiendo definir la existencia de precursores específicos en los tejidos calcificados del diente (esmalte y dentina), nuestros resultados sugieren que no toda la cristalización de estos tejidos corre a cargo de la hidroxiapatita sino que deben haber otros compuestos que expliquen la disminución del valor de la ratio Ca/P en las muestras estudiadas.

Palabras Clave: Tejidos calcificado, análisis semicuantitativo, esmalte, dentina.

Abstract

There is an amount of characteristics related to the biological formation process of calcified tissues even if the final results are different in structure. The present work have as main goal to determine if the Ca/P ratio of the dental calcified tissues is the same in foetus and adults, and if the Ca/P ratio differs in the calcified tissues respect to the value of the Ca/P ratio of pure hydroxyapatite obtained by stoichiometric methods. The samples of dentin and enamel were taken from humans foetus, 30 Wistar mouse and 20 adult human tooth. The ultrastructural studies were performed by scanning electron microscopy and x-ray dispersion microanalysis. The value obtained for the enamel Ca/P ratio was between 1,07 and 1,08. The value for dentine was between 1,03 and 1,12 and the middle value was between 1,07 and 1,075. There wasn't a statistically significant difference between adult and foetal enamel, nor between adult and foetus dentin. Our results suggest that not all the cristalization of dental calcified tissues takes place by the action of the hydroxyapatite, but rather that other phosphocalcic components could, appear; explaining the dismination of the Ca/P ratio values.

Correspondencia:

M^a Cristina Manzanares Céspedes
Unidad de Anatomía, Campus de Bellvitge-UB
Pavelló de Govern, 5^a planta, despatx 5305
08907 L'Hospitalet de Llobregat, España
Tlf: 934024261
Fax: 934029082
E-mail: cmanzan@bellvitge.bvg.ub.es

Introducción

Existe una serie de características comunes asociadas a las formación de los tejidos calcificados a pesar de que los productos finales sean estructuralmente distintos. El esmalte no es un tejido conectivo, no posee colágeno en su estructura, pero su formación implica a muchos de los mecanismos involucrados en la formación del tejido conectivo duro. Las células formadoras del te son los ameloblastos, que se diferencian dentro del epitelio dental interno formando parte del llamado órgano dental. Para su diferenciación, se requiere la presencia de dentina, tejido calcificado semejante al hueso y al cemento en su formación, estructura, bioquímica e incluso fisiología¹.

La mineralización del esmalte se basa fundamentalmente en el crecimiento de los cristales de hidroxiapatita, siendo estos extremadamente grandes y semejantes a placas de forma hexagonal. Algunos autores afirman que presentan una estructura muy parecida a los cristales de la dentina², sin embargo otros afirman que se diferencian de los cristales del hueso y la dentina en que estos últimos son pequeños, aplanados y en forma de aguja¹⁻³. Los cristales del esmalte se desarrollan rápida y homogéneamente a partir de su forma inicial no mineralizada⁴⁻⁵ por el rápido flujo de iones de Ca y PO₄ ocupando el espacio, formado a medida que se pierde agua y sales minerales. Plate y Hóling⁶⁻⁷ describieron a lo largo de las microfibrillas de la dentina unas zonas polares llamadas sitios activos donde el calcio y los grupos fosfatos se concentran sobre los aminoácidos del colágeno e inducen la nucleación del cristal.

Nuestro estudio sobre la composición mineral del esmalte y la dentina se planteó dos hipótesis: primera: la *ratio* Ca/P es la mismo para tejidos calcificados tanto en el feto como del adulto; y segunda: la *ratio* Ca/P es diferente en los tejidos calcificados al valor estequiométrico de la *ratio* Ca/P de la hidroxiapatita pura.

Para analizar el esmalte y la dentina se han venido utilizando varias técnicas morfológicas. La observación de los tejidos calcificados previa descalcificación ha sido el método más usado hasta la fecha; prueba de ello son los trabajos de Salomón y cols⁸, Rodde⁹, Bonar y cols⁴, Kuroiwa y cols¹⁰ quienes utilizaban este sistema indirecto. Otros autores recurren a las técnicas de Inmunohistoquímica, por ejemplo Nancy y cols¹¹ que estudiaron la expresión y distribución de las proteínas del esmalte utilizando un ácido para capturar las amelogeninas y la proteína A-oro de alta resolución durante las dife-

rentes etapas de la amelogenesis.

El método utilizado para nuestro estudio se basa en la visión directa sin descalcificación previa de los tejidos. En los trabajos de Manzanares y cols¹² se comprobó que el método descrito por Donath¹³ era adecuado, con algunas modificaciones, para visualizar directamente por Microscopia Electrónica de Barrido y Microanálisis muestras óseas sin descalcificar. En este trabajo se ha pretendido verificar si dicho método era también efectivo con los tejidos calcificados del diente y permitirá además efectuar análisis semicuantitativos de los elementos minerales de las muestras.

Material y métodos

Se emplearon como muestras fetos humanos de las siguientes medidas vertex-coccis: 22,23,25,37 cm¹⁴. Los fetos fueron cedidos por el Departamento de Anatomía y Embriología Humana, División IV, Universidad de Barcelona. Estos fetos fueron seccionados, puesto que se consideran lo bastante maduros como para presentar gérmenes dentario con tejidos calcificados.

Como material adulto se emplearon un total de 30 ratas adultas de raza Wistar sin discriminación de sexo y 20 dientes humanos sanos provenientes de extracciones. Las ratas permanecieron en el estabulario durante 6 semanas recibiendo alimentación convencional. Cumplida esta edad se consideraron ya adultas y fueron sacrificadas según las especificaciones legales vigentes. La elección de las ratas se basa en extensos estudios de formación y desarrollo del esmalte, constituyendo un modelo muy apropiado por tratarse de un diente en continuo crecimiento y erupción, (Salomón y cols⁸ Warshawsky y cols¹⁵ y mas recientemente Hubbard y cols¹⁶). En este ultimo se pudo observar la ausencia completa de secreción y maduración del esmalte, desde el ápice en formación del diente hasta la zona en erupción.

Posteriormente se realizaron cortes sagitales del cráneo con el fin de obtener las muestras necesarias para que abarquen la dimensión antero-posterior de la mandíbula. Los cortes fueron realizados con la técnica de separación por pulido Exackt-Kultzer, iniciada por Donath en 1982¹³, modificada por Manzanares y cols. 1987¹².

Las muestras se incluyeron en plástico (Técnica 7200, Kulzer, Alemania) sin descalcificación y después se sometieron a fotopolimerización, una vez polimerizado el bloque con el tejido se realiza el pulido exhaustivo que se requiere para visualizar las muestras en el Microscopio Electrónico de Ba-

Tabla 1.-One Factor ANOVA Analysis of Variance
Valores obtenidos para dentina fetal y dentina adulta con el 99% de significación

Source	DF	Sum Squares	Mean Squares	F-test
Between groups	1	2.9719E-4	2.9719E-4	.288
Within groups	40	.041	1.031E-3	P=.5943
Total	41	.042		

Tabla 2.- One Factor ANOVA
Valores obtenidos para dentina fetal y dentina adulta con el 99% de significación

Group	Count	Mean	Std Dev	Std Error
Fd	44	1.073	.012	1.840E-3
Ad	32	1.077	.016	2.855E-3

Tabla 3.- One Factor ANOVA
Valores obtenidos para dentina fetal y dentina adulta con el 99% de significación

Comparison	Meand Diff	Fisher PLSD	Scheffe F-test	Dunnett t
fd vs ad	-3.386E-3	8.596E-3	1.085	1.042

rrido. Las observaciones se llevaron a cabo en un MEB JSM-840 (Jeol Limited, Tokio, Japón) equipado con un detector de microanálisis por separación de energía de rayos X (AN-10000, Link-Oxford, Inglaterra). La técnica de trabajo consistía en localizar el área de dentina o esmalte en cada una de las muestras observadas por Backscatering, y llevar un haz electrónico de observación a 75000 aumentos. En este punto se iniciaba la adquisición del espectro microanalítico tras comprobar la corriente de sonda. Acabada la adquisición se procesaba y se comprobaba, nuevamente la corriente de sonda. De cada zona analizada se efectuaron como mínimo 5 lecturas para dotar de mayor fiabilidad a los datos estadísticos. Las lecturas presentadas son las de los valores netos (*net integral*) y brutos (*gross integral*) de los espectros microanalíticos del Ca y P. A partir de estos valores calculamos el valor del «pick/background» (pb) de cada elemento (Ca y P) que resulta de sumar los valores brutos y netos y dividirlos por el valor bruto. Para este cálculo utilizamos los programas informáticos Statview y Cricket Graph ® de un ordenador Macintosh del sistema Apple (Cupertino, California). Los nuevos valores, una vez calculada la relación Ca/P para cada elemento, se llevaron al programa de estadística (Statview, Cupertino, California) donde se sometieron al test de ANOVA con el fin de averiguar si había o no diferencias estadísticamente signifi-

cativas entre la relación Ca/P fetal y Ca/P de adulto para dentina y el esmalte obtenidas por microanálisis semicuantitativo.

Resultados

Se realizaron un número total de 590 mediciones. Para la *ratio* Ca/P del esmalte adulto se realizaron 70 mediciones y 140 para el esmalte fetal. Para determinar la *ratio* Ca/P dentina adulta se realizaron 160 mediciones y 220 para la dentina fetal.

Las tablas 1,2 y 3 nos indican los valores obtenidos con el test ANOVA para dentina fetal y dentina adulta con el 99% de significación. El valor de Fisher PLSD señala que no existen diferencias significativas entre dentina fetal y dentina adulta.

Las tablas 4,5 y 6 nos indican los valores obtenidos con el test ANOVA con un 99% de significación al comparar esmalte fetal con esmalte adulto. El valor de Fisher PLSD indica que no existen diferencias significativas entre esmalte fetal y adulto.

En vista que no se encontraron diferencias significativas entre la dentina fetal y adulta estimamos que los valores totales de las *ratios* Ca/P para la dentina oscilan entre 1,03 y 1,12 y la media entre 1,07 y 1,075. (Gráfica 1)

Del mismo modo, la ausencia de diferencias significativas entre esmalte fetal y adulto, nos lleva a

Tabla 4.- One Factor ANOVA

Valores obtenidos al comparar esmalte fetal con esmalte adulto con el 99% de significación

Source	DF	Sum Squares	Mean Squares	F-test
Between groups	1	2.1245E-4	2.1245E-4	1.085
Within groups	74	.014	1.9581E-4	P=.301
Total	75	.015		

Tabla 5.- One Factor ANOVA

Valores obtenidos al comparar esmalte fetal con esmalte adulto con el 99% de significación

Group	Count	Mean	Std Dev	Std Error
fe	28	1.076	.037	7.066E-3
ae	14	1.082	.016	4.377E-3

Tabla 6.- One Factor ANOVA

Valores obtenidos al comparar esmalte fetal con esmalte adulto con el 99% de significación

Comparison	Meand Diff	Fisher PLSD	Scheffe F-test	Dunnett t
fd vs ad	-5.643E-3	.028	.288	.537

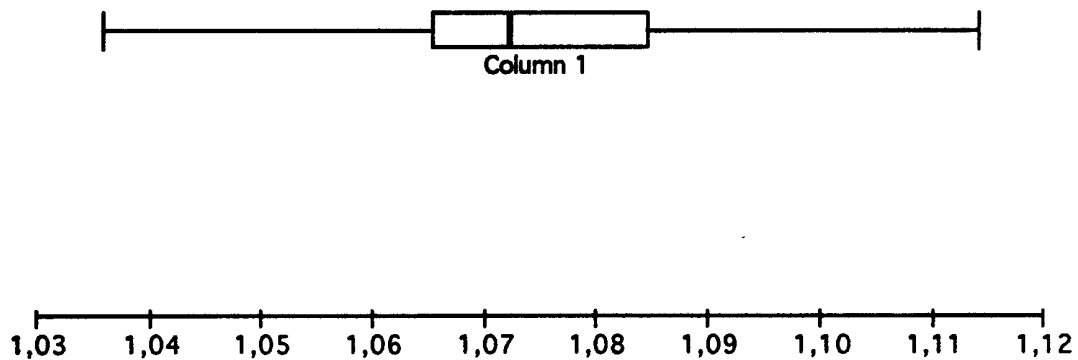


Gráfico 1: Stat Works™ Data ratio Ca/P esmalte

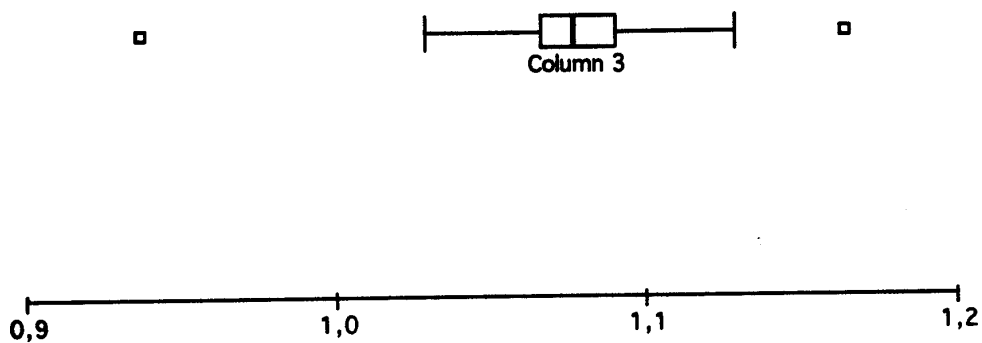


Gráfico 2: Stat Works™ Data ratio Ca/P Dentina

estimar los valores totales de la *ratio* Ca/P para el esmalte en un intervalo que oscila entre 0,9 y 1,2, con una media que se encuentra entre 1,07 y 1,08. (Gráfica 2)

Discusión

Una vez calculada la relación Ca/P para cada elemento, el test de ANOVA, establece que no existen diferencias significativas entre los valores del *ratio* Ca/P de esmalte en feto y adulto y que tampoco existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores del *ratio* Ca/P de dentina entre feto y adulto.

Según Roberts y cols¹⁷, que compararon la relación Ca/P en el hueso recientemente formado con la relación Ca/P del hueso maduro, la relación Ca/P que se encontró en el hueso joven era inferior a 1,67 (relación más soluble) y con el tiempo y la maduración, este valor se acercaba al valor de la HA evaluada por estequiometría que era 1,67. En contraste nosotros hemos encontrado un valor para la *ratio* Ca/P inferior a 1,67 tanto para la dentina que es un tejido conectivo como para el esmalte que no lo es. Asimismo, nuestro estudio no ha revelado diferencias significativas entre el esmalte fetal y adulto, y entre la dentina fetal y adulta. El diferente proceso de formación del germen dentario respecto al del hueso podría explicar estas discrepancias.

El fósforo en la forma de fosfatos en los tejidos mineralizados es el mayor componente de la hidroxiapatita. Hiller¹⁸ a través de sus investigaciones concluyó que la *ratio* Ca/P es casi constante en el esmalte en desarrollo. En contraste Glick¹⁹ encontró que la *ratio* Ca/P cambiaba con el grado de mineralización y más recientemente Lungren⁴ llegó a las mismas conclusiones. LeGeros²⁰ afirma que la *ratio* Ca/P del esmalte dental humano adulto es de 1,64; 1,62 para la dentina y 1,70 para el hueso. Bonar y cols.³ describieron el desarrollo y la maduración del componente mineral del esmalte dental de porcino. Prepararon porciones de esmalte en diferentes estado de maduración desde esmalte muy inmaduro de un diente no erupcionado con un contenido mineral del 45% a un esmalte maduro con un contenido del 99%. Las preparaciones más inmaduras de diente no erupcionado tenían un contenido mineral de 45%, 67%, 91% y una relación Ca/P de 1,41, 1,44 y 1,47 respectivamente. El contenido mineral de las preparaciones de maduración intermedia era de 90-92% con una relación Ca/P de 1,5 aproximadamente igual a la

relación Ca/P que se encontró en las muestras más maduras. Jalevik²¹ encontró una *ratio* Ca/P en dientes hipoplásicos de 1,4 en las áreas hipoplásicas del esmalte, mientras que en las áreas con esmalte normal encontró una *ratio* Ca/P de 1,8. Bonar y cols.⁴ atribuyen los resultados obtenidos de la *ratio* Ca/P a la existencia de precursores diferentes a la hidroxiapatita, bruxita, y que coexisten con está disminuyendo el valor de la *ratio* Ca/P respecto del de la hidroxiapatita pura (1,67). No obstante aseguran que con el tiempo el valor del *ratio* se acercaría al valor estequiométrico de la hidroxiapatita. Sin embargo, la medida de los valores obtenidos en nuestro estudio para el esmalte tanto fetal como adulto se encuentra entre 1,0 y 1,1 lo que difiere de los valores obtenidos por Bonar y cols⁴.

En el esmalte se postula la existencia de fosfato octocálcico como precursor de la hidroxiapatita. A pesar de que la naturaleza de la apatita del esmalte se ha estudiado de forma exhaustiva, todavía no se ha llegado a dilucidar si el cristal de apatita del esmalte incluye precursores inmediatos en su proceso de formación o si es apatita ya desde su origen. En cambio en los tejidos duros ricos en colágeno como la dentina y el hueso, se habla de la existencia de otros precursores tales como la ACP (apatita pobremente calcificada), el fosfato octocálcico y la bruxita²², que explicaría los resultados obtenidos en nuestro trabajo de los valores de las *ratios* Ca/P para esmalte y dentina inferiores a 1,67.

Brown y cols.²³ proponen en base a sus estudios de difracción de RX que la formación del cristal del esmalte comienza con fosfato octocálcico y que gradualmente se hidroliza en apatita. Según nuestros resultados es probable la existencia de precursores de la hidroxiapatita o de otros compuestos cálcicos que harían disminuir el valor total de la *ratio* Ca/P, sin embargo no parece que exista una maduración gradual que haga que este *ratio* varíe desde el estado fetal adulto.

Conclusiones

La literatura revela una dispersión entre los métodos empleados para evaluar la calcificación de los tejidos dentarios y su evolución temporal.

Existe una gran homogeneidad en cuanto al valor de la *ratio* Ca/P obtenido en nuestro estudio que se encuentra alrededor del 1 (0,9-1,2) en el esmalte y la dentina, siendo diferente al valor estequiométrico de la hidroxiapatita pura que es de 1,67. Por otra parte no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas entre el esmal-

te fetal y el esmalte adulto. El valor medio de la *ratio* Ca/P obtenido para el esmalte se encuentra entre 1,0 y 1,1 Tampoco hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas entre la dentina fetal y dentina adulta. El valor de la *ratio* Ca/P obtenido para la dentina es de aproximadamente 1,07.

Como corolario de los resultados anteriores, se concluye que, aún no pudiendo definir la existencia de precursores específicos en los tejidos calcificados del diente (esmalte y dentina), no toda la calcificación de estos tejidos corre a cargo de la hidroxiapatita sino que probablemente existen otros compuestos que explican la disminución del valor de la *ratio* Ca/P

Agradecimientos

Al Prof. R. Fontana y la Sra. A. Domínguez, de los Serveis Científicotécnicos de la Universidad de Barcelona, por su valiosa ayuda, tanto técnica como científica, y por su generosa disponibilidad. A las señoras SM. Caballero-Araque y E. Sánchez-García, del laboratorio de Tejidos Calcificados, por su experta preparación de las muestras.

Bibliografía

1. **Campos Muñoz A, Gómez M.** Histología y embriología bucodental: Madrid. Editorial Médica Panamericana. 1999
2. **Houille P, Voegel JC, Schultz P, Steuer P, Cuisinier FJ.** High resolution electron microscopy: structure and growth mechanisms of human dentin crystals. *Journal of Dental Research.* 1997. 76(4):895-904
3. **Aobat.** Recent observations on enamel cristal formation during mammalian amelogenesis. *Anat. Rec.* 1996;245:208-18
4. **Bonar LC, Shimizu M, Roberts JE, Griffin RG, Glimcher MJ.** Structural and Composition Studies on the Mineral of Newly Formed Dental Enamel: A Chemical, X Ray diffraction, and 31P and proton nuclear magnetic Resonance Study. *Journal Of Bone and Mineral Research.* 1991;11:1167-76
5. **Lundgren, Persson LG, Engström EU, Chabala J, Levi-Settir R, Noren JG.** A secondary ion mass spectroscopic study of elemental compstion patter in rat incisor dental enamel during different stages of ameloblast differentiation. *Archs Oral Biol.* 1998;43:841-848
6. **Plate, Hohling, Reimer, Barckhaus, Weinecke, Wiesmann, Boyde.** Analysis of the calcium dstrubution in preentine by EELS and of the early crystal formation in dentine by ESD. *Journal of Microscopy.* 1992;166: 329-341
7. **Plate U, Arnold S, Stratmann U, Wiesmann HP, Hohling HJ.** General principle of ordered apatitic crystal formation in enamel and collagen rich hard tissues. *Connective tissue Research.* 1998;38:149-57
8. **Salomón, Legrand, Golberg.** Scanning electron microscopy of the formaing enamel of rat incisor: influence of fixative and treatments interacting with the organic matrix. *Scanning Microscopy.* 1991;5:509-517
9. **Rodde, J.** Semiquantitative in vitro study of etching of human enamel: scanning electron microscopy observations. *Bull Group Int Rech Sci Stomatol et Odontol.* 1989;2:87-98
10. **Kuroiwa M, Kodakat, Higashi S.** Morphological study of the seams in multirroot formation of rat molar teeth. *Acta Anatmica.* 1991;142:6-14
11. **Nancy A, MC Kee MD, Smith CE.** Immunoloalization of Enamel proteins during amelogenesis in the cat. *The Anatomical Record.* 1992;233:335-349
12. **Manzanares MC, Calero MI, Franch J, Jiménez MP, Serra I.** Optimisation of a scheduled study for undecalcified samples. *Microscopy and Analysis.* 1997:31-33
13. **Donath K.** Técnica de separación y pulido fino para la realización de preparados histológicos de tejidos y materiales no seccionables. Impreso Exakt-Kultzer Noerdestedt. 1988
14. **Murillo.** Sistematización de las fases prenatales del desarrollo. *Annales del desarrollo XII.* 1960;15:7-21
15. **Warshaws KY W.** *Crc. Rev Anat Cell Biol.* 1988;1:425
16. **Hubard M, Kon J.** Proteomic analysis of dental tissues, reiew. *J Chromatogr B.* 2002;771:211-220
17. **Roberts JE, Bonar LC, Griffin RG, Glimcher MJ.** Characterization of very young mineral phases of bone by solid state phophorus angle sample spinning nuclear magnetic resonance and X-ray diffraction. *Calcif Tissue Int.* 1992;50: 42-48
18. **Hiller CR, Robinson C, Weatherell JA.** Variations in the composition of developing rat incisor enamel. *Calcif Tissue Res.* 1975;18:1-12
19. **Glick PL.** Patters of enamel maturation. *J Dent Res.* 1979;58:883-892
20. **Legeros R.** CalciumPhosphates in Oral Biology and Medicine. *Monographs in Oral Science* 15 Karger AG 1991
21. **Jalevik B.** Enamel hypomineralization in permanet first molars. A clinical, histo-morphological and biochemical study. *Swedish Dental Journal.* 2001;149:1-86
22. **Barckhaus RH, Hóling HJ, Fromm I, Hirsch P.** Electron spectroscopic diffraction and imaging of the early and mature stages of calcium phosphate formation in the epiphyseal growth plate. *J of Microscopy.* 1991:162:155-69
23. **Brown WE.** A mechanism for growth of apatitic crystals. In: Stack Mv, Fearnhead, RW (eds). *Tooth enamel II* John Wrigh&sons, Bristol 1965:11-14