



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

Caracterización de calcificaciones pulpares mediante técnicas de microscopia y espectroscopia molecular.

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

ESPECIALISTA EN ENDODONCIA

P R E S E N T A:

NEYDI JULIETA JUÁREZ GALLEGOS

TUTOR: Dr. GONZALO MONTOYA AYALA

ASESOR: Esp. ALEJANDRA ROGRÍGUEZ HIDALGO

Caracterización de calcificaciones pulpaes mediante técnicas de microscopía y espectroscopia molecular.

Neydi Julieta Juárez Gallegos *, Gonzalo Montoya Ayala §, Alejandra Rodríguez Hidalgo**

Abstract

Introduction:

Pulp stone is a calcified mass establishing within healthy or diseased teeth. It may appear in the coronal or root portion of the pulp freely, adherent or embedded into the dentin. The stones have different sizes, and those under 200 microns are not visible by routine radiographical procedures. The etiology of these calcifications is poorly understood, and it is not clear whether they represent a pathologic state or constitute a normal biological behavior of the pulp. Chemically, are precipitates of calcium phosphate and calcium carbonate, by increasing in size they may exert pressure on the vessels and influence the blood supply to the pulpal tissue. The objective of the present study was to investigate the physicochemical properties of pulp stones and the correlation with the location within the pulp tissue, and determine the possible molecular mechanisms of formation, growth and maturation of this calcification.

Methods: 4 pulp stones were recovered from 4 teeth requiring root canal treatment. The samples were

sectioned and observed by SEM, HRTEM, X-ray diffraction and spectroscopy Raman to identify phases and crystallinity.

Results: Pulp stones showed heterogeneous structure and chemical composition. The morphology and microstructure of the pulp stone were examined with SEM, the elemental composition and the Ca / P ratio was analyzed with EDS. To determine the crystalline phase, it was performed by HRTEM analysis, X-ray diffraction and Raman.

Conclusions: The ultrastructure of the pulp stones, identified the hydroxyapatite phase and demonstrated the relationship between the different methods used for the characterization of calcifications to assess the degree of mineralization, the form of growth of the crystals, and the anatomical relationship of these inside the pulp tissue. A direct relationship of the formation of these pulp stones with age or with systemic diseases cannot be established, since the sample size is not sufficient.

Key Words:

Pulp stone, pulpal calcification, microscopy scanning, X ray diffraction, Raman.

*Alumno de la especialidad de Endodencia, FO UNAM.

§ Dr. en Ciencias Profesor de Investigación del Laboratorio de Biología Periodontal y Tejidos Mineralizados. DEPeI, UNAM

** C.D.E.E. y Docente de Asignatura de Endodencia DEPeI F.O UNAM.

RESUMEN

Las calcificaciones pulpares son depósitos mineralizados que se pueden presentar en dientes sanos, no erupcionados, o con patología pulpar. Se han realizado varios estudios en los que la prevalencia de esta condición pulpar varía en un rango alto debido a muchos factores etiológicos tales como caries profunda, edad, género, enfermedades sistémicas, restauraciones etc. Los reportes indican que son de tamaño variable, aproximadamente de 200 μm para ser visibles radiográficamente, químicamente son precipitados de fosfato de calcio y carbonato de calcio y aunque actualmente no hay pruebas claras sobre si la calcificación pulpar es un proceso patológico relacionado con varios tipos de lesión o un fenómeno natural, el mayor significado endodóncico radica en que pueden dificultar el tratamiento de conductos radiculares. En este trabajo se analizaron las características físico-químicas de las calcificaciones pulpares para obtener mayor información acerca de los mecanismos moleculares que regulan la formación, crecimiento y maduración; así como correlacionar ubicación dentro del tejido pulpar. Las muestras fueron obtenidas durante la realización del tratamiento endodóncico, posteriormente fueron analizadas microscopía y espectroscopía molecular, con los cuales se identificaron características morfológicas y estructurales, se calculó la proporción Ca/P y se identificó la fase mineral presente en cada una, si bien no podemos establecer una relación directa de la formación de calcificaciones pulpares con enfermedades sistémicas, edad o diversos factores etiológicos debido al tamaño de la muestra, podemos afirmar que el grado de mineralización se encuentra relacionado a la ubicación anatómica dentro del tejido pulpar, ya que en los resultados de este trabajo las calcificaciones encontradas libres dentro de la cámara pulpar se observó mayor número de fibras colágenas y se identificaron fases minerales menos maduras que HA, mientras que las calcificaciones que fueron encontradas cerca o adheridas a la dentina presentan crecimiento laminar similar a la mineralización de la dentina, también se apreciaron nódulos más densos y de textura lisa sobre los que aparentemente se siguen depositando minerales y al aumentar de tamaño pueden fusionarse y formar grandes calcificaciones pulpares, cabe señalar que en todas las calcificaciones cercanas a la dentina la fase mineral corresponde a HA.

INTRODUCCIÓN

El término "mineral" de acuerdo con la Asociación Internacional de Mineralogía (IMA por sus siglas en inglés) se define como "un elemento o compuesto químico que es normalmente cristalino y que ha sido formado como resultado de un proceso geológico". Posteriormente Skinner en el 2005 propuso el término "biomineral", describiéndolo como "un elemento o compuesto que puede ser amorfo o cristalino y que es formado mediante un proceso biogeoquímico".^{1,2} Sin embargo, aún no existe un consenso internacional aceptado, acerca de estas definiciones. Se conocen unos 40 biominerales diferentes. Los de mayor importancia biológica son calcita, aragonita y vaterita compuestos de carbonato de calcio Ca_2CO_3 ; y la hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, compuesta de fosfato de calcio, dichos minerales se han identificado durante la formación de tejidos mineralizados y calcificaciones ectópicas como cálculo dental, sialolitos, calcificaciones renales y ateromas. La naturaleza química de los biominerales, su formación, crecimiento y maduración están genéticamente controlados en el organismo.^{1,3}

Estudios cristalográficos revelan que los biominerales son estructuras con un alto grado de ordenamiento y con propiedades magnéticas y eléctricas, producto de la interacción de la fase mineral y los componentes orgánicos que dan lugar a la formación, crecimiento y morfología de los cristales. Se sabe que el crecimiento de los biocristales está determinado por la existencia de un núcleo preformado el cual posiblemente es de naturaleza amorfa, y que se transformará en un mineral cristalino, mediante la transformación de estado sólido.^{1,2}

Los tejidos mineralizados de los seres humanos (esmalte, dentina, cemento radicular y hueso) se forman gracias a un proceso fisiológico regulado por interacciones de minerales y moléculas extracelulares llamado biomineralización. El componente inorgánico, presente en todos los tejidos calcificados, son sales de fosfato de calcio, en forma de hidroxiapatita; el cual, dicho material es depositado por células diferenciadas. El mecanismo molecular de la mineralización tiene lugar dentro de las vesículas de matriz, sintetizadas y liberadas a partir de la superficie de condrocitos, osteoblastos, odontoblastos y cementoblastos. Los iones de fosfato de calcio se acumulan dentro de vesículas donde eventualmente precipitan y forman cristales de hidroxiapatita. Estos cristales atraviesan la membrana de las vesículas y dan lugar a los nódulos de calcio en el fluido extracelular. Dichos cristales crecen y maduran dentro de la estructura de las fibras de colágena.^{4,5}

El grado de maduración y crecimiento de los cristales está determinado por las condiciones extracelulares presentes y donde influyen de manera importante; el pH, la concentración de iones fosfato, calcio y la presencia de macromoléculas como proteoglicanos y proteínas de la matriz extracelular de cada tejido.

Las patologías de la biomineralización pueden ocurrir en un número de formas y durante toda la vida. Las patologías óseas pueden ser dismórficas y conducir a un

crecimiento anormal de hueso o diente durante el desarrollo o remodelación ósea, o ectópico, que involucra la calcificación de tejidos normalmente no mineralizados.^{4,5.}

Los huesos, dientes y otoconia son generalmente los únicos tejidos mineralizados en el cuerpo humano pero cualquier tejido puede ser mineralizado de forma anormal lo que conduce a patologías como la formación de placas ateroscleróticas o calcificaciones vasculares que pueden ocurrir cuando las células del músculo liso se diferencian en células similares a osteoblastos después de una lesión e inducen mineralización, cálculos renales o biliares, enfermedades articulares como gota, insuficiencia renal, osteoartritis debido a calcificación del cartílago articular o depósitos minerales en las articulaciones.^{6,7}

Pulpa dental.

En muchos sentidos, la pulpa es un tejido único, se trata de un tejido blando de origen mesenquimal, con células especializadas, los odontoblastos, dispuestos periféricamente en contacto directo con la matriz de la dentina. La relación que se establece entre los odontoblastos y la dentina se denomina complejo pulpodentinario, es una de las razones por las que la pulpa y la dentina se deben considerar una unidad funcional compuesta por elementos histológicamente diferentes. La pulpa dental y la dentina funcionan como una unidad y los odontoblastos son un elemento básico de este sistema. Los odontoblastos se localizan en la periferia del tejido pulpar, con extensiones a la parte interna de la dentina. La dentina no existiría de no ser producida por los odontoblastos y la pulpa dental depende de la protección ofrecida por la dentina y el esmalte. Asimismo, la dinámica integrada del complejo pulpodentinario implica que los impactos en la dentina pueden alterar los componentes pulpares, y las alteraciones de la pulpa pueden, a su vez, alterar la calidad y cantidad de dentina producida.^{8,9,10.}

Zonas de la pulpa.

Para su estudio se divide en: (ver imagen 1)

Pulpa central.

La pulpa central es la masa central de la pulpa. Contiene los vasos sanguíneos y los nervios de mayor tamaño, la célula más destacada en esta zona es el fibroblasto.

Zona rica en células.

Debajo de la zona pobre en células existe un estrato, que contiene una proporción elevada de fibroblastos, en comparación con la región más central de la pulpa. Esta capa es mucho más prominente en la pulpa coronal que en la radicular. Además de fibroblastos, la zona rica en células puede contener un número variable de macrófagos, células dendríticas y células mesenquimales indiferenciadas o células madre. La migración de células inmunocompetentes dentro y fuera de la zona rica en células es consecuencia de la provocación antigénica. Aunque la división celular dentro de la zona rica en células es rara en pulpas normales, la muerte de los odontoblastos causa un gran aumento en la tasa de mitosis. Puesto que los odontoblastos con lesiones irreversibles se sustituyen por células que emigran desde

la zona rica en células hasta la superficie interna de la dentina. Se considera probable que esta actividad mitótica represente el primer paso en la formación de una nueva capa odontoblástica. Estudios implican a las células primitivas como fuente de estos odontoblastos de reemplazo.^{8,9,10}

Zona pobre en células.

- Bajo la capa odontoblástica en la pulpa coronal, existe con frecuencia una zona estrecha, de un ancho aproximado de 40 μm , relativamente libre de células y por ello recibe el nombre de zona pobre en células o capa de Weil. Esa zona está formada por capilares sanguíneos, fibras nerviosas amielínicas y las finas prolongaciones citoplasmáticas de los fibroblastos. La presencia o ausencia de la zona pobre en células depende del estado funcional de la pulpa. Esta zona puede no ser aparente en las pulpas jóvenes, donde la dentina se forma con rapidez, o en las pulpas viejas, donde se genera dentina reparadora.

Capa odontoblástica.

El estrato celular más externo de la pulpa sana es la capa de odontoblastos, esta capa se localiza inmediatamente subyacente a la pre dentina; las proyecciones odontoblásticas sin embargo, pasan a través de la pre dentina para llegar a la dentina. En consecuencia, la capa odontoblástica se compone de los cuerpos celulares de los odontoblastos. Además, entre estos últimos se pueden encontrar capilares, fibras nerviosas y células dendríticas. En la porción coronal de la pulpa joven, que está secretando colágena activamente, los odontoblastos tienen una forma cilíndrica alta. La altura de los odontoblastos es variable en consecuencia, sus núcleos no se encuentran al mismo nivel, sino que están alineados de forma escalonada, descrito a menudo como una empalizada. Esta organización hace que parezca que las capas tengan de tres a cinco células de grosor, aunque realmente sólo hay una capa de odontoblastos. Los espacios intercelulares entre los odontoblastos son pequeños, de unos 30-40 nm de ancho. Los cuerpos celulares de los odontoblastos están conectados por complejos firmes y uniones comunicantes. Las uniones comunicantes están formadas por proteínas de conexión que permiten el paso entre las células de moléculas señal. La capa odontoblástica de la pulpa coronal contiene más células por unidad de área que la de la pulpa radicular. Mientras que los odontoblastos de la pulpa coronal madura suelen ser cilíndricos, los de la porción media de la pulpa radicular son más cúbicos. Cerca del foramen apical, los odontoblastos aparecen como una capa escamosa de células planas. Puesto que el número de túbulos dentinarios por unidad de área es menor en la raíz que en la corona del diente, los cuerpos celulares de los odontoblastos están menos apiñados y se pueden ensanchar en sentido lateral; durante la maduración y el envejecimiento, se produce continuamente una acumulación en la capa de odontoblastos, especialmente en la pulpa coronal, por estrechamiento del espacio pulpar. La apoptosis de los odontoblastos parece ajustarse a este limitado espacio durante el desarrollo.^{8,12,13,14}

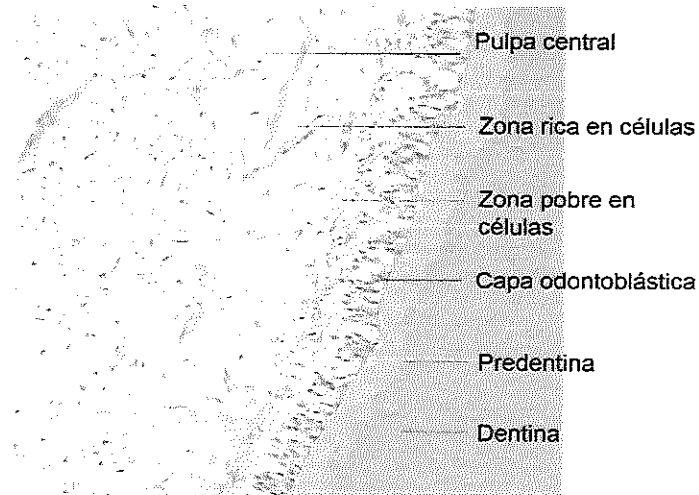


Imagen 1. Zonas morfológicas de la pulpa. Cohen "Vías de la pulpa" 2010.

Dentina.

La dentina madura se compone de aproximadamente un 70% de material inorgánico, un 20% de material orgánico y un 10% de agua. El principal componente inorgánico consiste en hidroxapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. La matriz orgánica consta de proteínas, de las cuales la más común es la colágena tipo 1; hay un componente menor de colágena tipo V. Las proteínas no colágenas más comunes son la dentinofosfoproteína (DPP), proteína de matriz de dentina 1 (DMP1), sialoproteína de dentina (DSP), osteopontina (OPN), osteocalcina y sialoproteína ósea (BSP). Además, contiene proteoglicanos, pequeñas cantidades de fosfolípidos y numerosos factores de crecimiento, como proteínas morfogenéticas óseas (BMP), factores de crecimiento similar a la insulina (IGF) y factor de crecimiento transformante beta (TGF- β). Estos factores de crecimiento son importantes durante la desmineralización de la dentina porque localmente pueden estimular la posterior diferenciación de células madre.^{8,9,10, 15.}

Dentina primaria, secundaria y terciaria.

La dentina primaria se forma durante el desarrollo del diente hasta que los dientes erupcionan en la cavidad oral, se secreta a una velocidad relativamente alta y forma la mayor parte de la dentina del diente. Tiene una estructura regular y contiene túbulos dentinarios que forman una curvatura primaria en forma de S por el movimiento direccional de los odontoblastos, que tienen una prolongación celular que se extiende desde un borde periférico ancho hacia una capa celular central y estrecha. Tras la erupción de los dientes, los odontoblastos siguen depositando dentina, pero cambian ligeramente de dirección, lo que contribuye a la inclinación de los túbulos dentinarios y se conoce como dentina secundaria, se sintetiza a una velocidad mucho más lenta y tiene una estructura menos regular que la primaria. Se deposita durante el resto de la vida del diente. A diferencia de la dentina primaria y secundaria, la dentina terciaria, o dentina reparadora o reaccionaria, se deposita como consecuencia de un proceso patológico, como caries o abrasión oclusal. Se ha sugerido que la dentina terciaria es

secretada por odontoblastos originales o, en caso de muerte, por odontoblastos de sustitución recién diferenciados que surgen de células madre mesenquimales próximas. La función de la dentina terciaria es proteger a la pulpa de agentes irritantes provenientes del medio externo. Tiene una estructura desorganizada en comparación con la dentina primaria y secundaria.^{8,9,10}

Dentina del manto.

La primera capa de dentina primaria que se deposita es la dentina del manto. Es producida por los odontoblastos que no están plenamente diferenciados. En el diente adulto, la dentina del manto es la más antigua y se encuentra adyacente al esmalte de la corona. Los odontoblastos producen los componentes de colágeno, que se organizan en una red de fibrillas. Los análisis con microscopio electrónico han demostrado que los odontoblastos producen pequeñas vesículas de matriz de membrana cerrada donde empieza la precipitación de minerales. Después de la rotura de las vesículas de matriz, los cristales se extienden por la matriz de colágeno y actúan como puntos de partida para el crecimiento de los cristales de apatita.

Dentina peripulpar.

La dentina peripulpar se forma una vez depositada la capa de dentina del manto y forma la mayor parte de la dentina primaria y secundaria. Los odontoblastos depositan primero la matriz orgánica, formada principalmente por fibrillas de colágeno de aproximadamente 500 nm de diámetro, orientadas en ángulo recto con el eje largo de los túbulos dentinarios. Estas fibras de colágeno están muy juntas y forman una red entretejida que quedará incrustada por los cristales minerales subsiguientes. Los odontoblastos transportan activamente el calcio de los vasos sanguíneos a la red de fibrillas de colágeno. Hay pruebas de que la mineralización de la dentina está controlada por la DPP. La DPP puede fijar calcio, porque es muy aniónica. Los cambios conformación de la DPP le permiten fijar un gran número de iones de calcio, lo que permite la formación y el crecimiento de cristales minerales en la red de matriz de colágena. Al regular la liberación y concentración de DPP, los odontoblastos pueden regular el inicio y la velocidad de mineralización de la dentina. Los cristales de hidroxiapatita se depositan en la superficie y dentro de las fibrillas y siguen creciendo a medida que avanza la mineralización, aumentando el contenido mineral de la dentina. La dentina peripulpar se mineraliza a través de calcosferitas en el frente de mineralización entre la predentina y la dentina mineralizante. Los cristales minerales se organizan en calcosferitas, de tamaño y forma variables en diferentes regiones de la dentina. Al crecer, se fusionan con calcosferitas adyacentes hasta que la matriz de dentina está totalmente mineralizada.

Predentina.

La predentina es una capa de matriz orgánica desmineralizada de 15 a 20 μm entre la capa de odontoblastos y la dentina mineralizada. Las principales proteínas son colágena tipo I y II, los elementos distintos de la colágena son proteoglucanos como dermatán sulfato, heparán sulfato, hialuronato, sulfato de queratina, condroitín 4-

Respuesta del tejido pulpar ante agentes irritantes.

Las reacciones inflamatorias de la pulpa pueden ser causadas por traumatismos, por agentes tóxicos o alergénicos en materiales restauradores y por productos bacterianos. Después de identificar la variedad de células halladas en la respuesta inflamatoria, las investigaciones se han centrado en la respuesta inespecífica de la reacción inflamatoria de la pulpa. Si los principales signos y síntomas de la inflamación (rubor, calor, inflamación y dolor) son aplicadas a la posición anatómica de la pulpa dental (rodeada de tejido mineralizado), explicaría la evolución de la enfermedad pulpar, ya que la presión dentro de la cámara pulpar debe ser lo suficientemente alta para que ocurra un colapso en la circulación, resultando rápidamente en una necrosis total. ^{14,15,16,17.}

Siempre que la pulpa es sometida a injurias, el sistema inmunológico desatará una respuesta inflamatoria que limitará el daño de los tejidos por medio de la eliminación de los organismos que han invadido este espacio. En primer lugar ocurre una respuesta vascular inmediatamente debajo del sitio de la lesión, evidenciado por un aumento en la permeabilidad vascular y extravasación de fluido (edema), que dependiendo de su intensidad puede causar alteraciones en la capa odontoblástica por la elevación de la presión. Esta vasodilatación permite la disminución de la velocidad de circulación de la sangre y de sus células rojas, además de la marginación de leucocitos. Cuando la presión local en los tejidos sobrepasa la presión venosa local, los vasos tienden a sufrir colapso, y la sangre se aleja de la zona de mayor presión histórica hacia zonas de menor resistencia. La presión persistente obstaculiza la circulación, cuya consecuencia es mínima en los tejidos normales, pero grave en los tejidos inflamados, ya que al obstruirse la circulación, se facilita la acumulación de factores irritantes como lo son las toxinas bacterianas, enzimas nocivas, factores quimiotóxicos, etc. Esta congestión venosa en la región apical, controlando el posible drenaje de la pulpa constituye el factor decisivo para el carácter regresivo o progresivo de la reacción pulpar inicial. La pulpitis es similar a la inflamación de otros tejidos del cuerpo, lo que varía es la intensidad, la duración y la extensión. Basándose en síntomas clínicos y descripciones histopatológicas, se pueden distinguir dos fases en la pulpitis: aguda (exudativa) y crónica (proliferativa). ^{14,15,16,17.}

La respuesta exudativa constituye la respuesta inicial de los tejidos pulpares o periapicales a cualquier irritación: mecánica, física, química, térmica o microbiana. Esta reacción se caracteriza por una afluencia de exudado líquido (edema), el término agudo implica una hiperactividad de las fuerzas inflamatorias exudativas muy cerca del foco de la lesión o infección. Si el irritante primario (externo) aumenta, también aumenta la respuesta exudativa para tratar de superar y neutralizar el agente irritante. La células predominantes en la repuesta aguda son leucocitos polimorfonucleares neutrófilo (PMN), macrófagos y células plasmáticas.

En la respuesta proliferativa, se observa una neoformación de vasos sanguíneos, finos y frágiles, así como una notable proliferación fibroblástica de colágeno. Estos dos componentes constituyen el tejido de granulación que se necesita para el proceso de cicatrización. Cuando en la población celular se incluyen linfocitos, células plasmáticas y macrófagos tisulares, entonces se denomina tejido granulomatoso, ya que el tejido posee entonces funciones defensivas y de cicatrización. El término crónico implica que la presión tisular no supera el umbral del dolor. Los productos de la zona exudativa drenan hacia una superficie, son absorbidos por el flujo venoso o linfático pasan a los tejidos conjuntivos adyacentes o usan cualquier combinación posible para aliviar la presión.^{14,15}

Como respuesta ante lesiones cariosas, abrasión, preparaciones dentales, etc; los odontoblastos tienen la capacidad de producir dentina reaccionaria. En caso de una lesión cariosa invasiva, los odontoblastos son destruidos por toxinas bacterianas o alterados por moléculas nocivas liberadas por el material restaurador, por células necróticas o por enzimas liberadas por la degradación de la matriz extracelular. Las células sub odontoblasticas (células Höehl) pueden en ese caso diferenciarse y reemplazar a odontoblastos perdidos formando una capa de dentina reaccionaria debajo de la línea calcio traumática.^{14,15,16,17}

Si la pulpa dental se encuentra expuesta, los odontoblastos y las células de Höehl ya no pueden reparar la lesión y otro proceso tiene lugar. Las células madre o progenitoras ubicadas dentro de la pulpa son reclutadas, proliferan y se diferencian en células similares a osteoblastos u odontoblastos, y comienzan a producir matriz extracelular, que finalmente sufrirá mineralización. Esta cascada de eventos lleva a la formación de dentina reparadora, en forma de una dentina delgada o puente que ocluye el sitio de exposición, o bien una estructura similar al hueso (osteo-dentina) que ocupa parcial o totalmente el espacio de la pulpa.^{14,15,16,17}

Se ha especulado que los factores bioactivos, que se liberan después de la desmineralización de la dentina en lesiones cariosas, por aplicación de materiales dentales ácidos o acondicionamiento con EDTA (ácido etilendiamiltetraácético) tienen la capacidad de quitar iones de calcio de la red cristalina de hidroxapatita, lo que puede estimular el tejido de reparación por promoción de proliferación y diferenciación de células de la pulpa dental.

cicatriciales hialinizados antiguos de la piel. La calcificación sustituye los componentes celulares de la pulpa y puede dificultar el suministro de sangre, aunque no sea una evidencia concreta a favor de la posibilidad se ha planteado que el dolor pulpar idiopático, se relaciona con frecuencia a la presencia de dichas calcificaciones.^{23,24}

Metamorfosis calcificante.

La luxación de los dientes a causa de traumatismos dentoalveolares puede llevar a una metamorfosis calcificante, una anomalía que puede conducir en cuestión de meses o años la obliteración, radiográfica parcial o total de la cámara pulpar. La obliteración radiográfica se debe a un depósito excesivo de un tejido mineralizado similar al cemento, o en ocasiones al hueso sobre las paredes dentinarias. El examen histológico evidencia que la presencia de algún tejido blando y tejido mineralizado puede estar cubierto de células parecidas a los cementoblastos. En una concusión y subluxación el porcentaje de obliteración del conducto es de 3% a 11% (Cleen, 2002) Desde el punto de vista clínico, las coronas de los dientes con metamorfosis calcificante pueden tener un tono amarillento, en comparación a los dientes vecinos. Esta condición suele ocurrir en dientes con formación incompleta de raíz. El traumatismo conlleva una alteración de los vasos sanguíneos que penetran en el diente y produce un "infarto pulpar", se plantea que el foramen apical permite que el tejido del ligamento periodontal proliferare y sustituya el tejido infartado, aportando células de cemento y osteoprogenitoras capaces de diferenciarse en cementoblastos, osteoblastos o en ambos.^{25,26,27}

Clasificación.

Las calcificaciones pulpares pueden ser clasificadas estructuralmente y sobre la base de su ubicación. Estructuralmente: son verdaderas y falsas, la distinción es morfológica. Un tercer tipo difuso o amorfo, son de forma más irregular que las calcificaciones falsas, que se producen en estrecha asociación con vasos sanguíneos. Las calcificaciones verdaderas son formadas por dentina y están rodeadas por odontoblastos, mientras que las falsas se forman a partir de la degeneración de células de la pulpa que se mineralizan. Esta mineralización se produce en etapas, inicialmente los nichos de células son encerrados por fibras dispuestas concéntricamente (es decir, una fase orgánica precede a la mineralización) que luego se impregnan con sales minerales. Entonces se van agregando calcificaciones incrementales. Basados en la ubicación: pueden ser incrustadas, adheridas y libres. Las calcificaciones incrustadas se forman en la pulpa, donde se adjunta dentina fisiológica en formación (a veces completamente) dentro de las paredes del conducto. Estos se encuentran con mayor frecuencia en la parte apical de la raíz, y la presencia de odontoblastos y tejido calcificado parecido a dentina pueden aparecer en la periferia de estas calcificaciones.^{10,11,12,25}

Técnicas de análisis de Biominerales.

Los estudios cristalográficos revelan que los biominerales son estructuras con un alto grado de ordenamiento y con propiedades magnéticas y eléctricas características, y con una gran diversidad de morfologías que son producto de la interacción de la fase mineral (iones orgánicos) y los componentes orgánicos (regularmente proteínas) que dan lugar a estructuras complejas. El avance tecnológico ha permitido el desarrollo de nuevas herramientas que nos permiten obtener características macroscópicas e interatómicas de los biominerales, que nos evidencian sus propiedades fisicoquímicas permitiendo obtener nuevos conocimientos sobre su formación y patrón de crecimiento. Algunas técnicas para el estudio de los biominerales se detallan a continuación ^{30,31,32}

- Análisis imagenológico.

Las técnicas imagenológicas utilizadas con mayor frecuencia para la visualización de calcificaciones pulpares son la tomografía computarizada de haz cónico (CBCT por sus siglas en inglés) y las radiografías convencionales ya que proveen información anatómica para el diagnóstico y plan de tratamiento. Permiten la visualización de depósitos mineralizados entro de la cámara pulpar, pudiendo valorar la ubicación anatómica y tamaño, además de permitir comparar la densidad (medida en unidades Hounsfield) entre diferentes tejidos. ^{12,13,20,32}

Microscopía electrónica de barrido (SEM/EDS por sus siglas en inglés).

El microscopio electrónico de barrido utiliza un dispositivo (filamento) que genera un haz de electrones para irradiar la muestra y con diferentes detectores se obtienen señales producidas por su interacción con la superficie de la muestra para crear una imagen que refleja sus características superficiales brindando información útil para caracterizar tamaño, topografía, composición química y morfología de muestras microscópicas; junto con el análisis de imagen se realiza un análisis elemental por medio de la energía dispersada de rayos X característicos (EDS) para determinar la composición semicuantitativa de la muestra. ^{30,33,34}

Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM por sus siglas en inglés).

Es un instrumento que utiliza un haz de electrones acelerados para irradiar una muestra delgada por una de sus caras, dándonos una imagen formada por los electrones que emergen por la cara contraria. Esta técnica es útil para la identificación de la distribución atómica de una muestra cristalina y con ayuda del análisis de la transformada de Fourier (FT por sus siglas en inglés) determinará las distancias interatómicas que componen una fase cristalina determinada. ^{30,33,34}

Espectroscopía Raman.

La Espectroscopía Raman es una técnica fotónica de alta resolución que proporciona en pocos segundos información química y estructural de casi cualquier material o compuesto orgánico y/o inorgánico permitiendo así su identificación. El análisis mediante espectroscopía Raman se basa en el examen de la luz dispersada por un material al incidir sobre él un haz de luz monocromático. Una pequeña porción de la luz es dispersada inelásticamente experimentando ligeros cambios de frecuencia que son característicos de los materiales analizados e independientes de la frecuencia de la luz incidente. ^{30, 37,38}

Difracción de RX (DRX).

La difracción de rayos X constituye una herramienta básica para la caracterización de materiales cristalinos, frente a otras técnicas analíticas permite por un lado establecer la forma alotrópica bajo la que se presenta una sustancia, y por otro lado analizar sustancias que presentan varias fases constituidas por los mismos elementos. Para la identificación de estas se procede a comparar tanto la posición y la intensidad de las líneas presentes en el espectro problema con todos los espectros de difracción conocidos, los cuales aparecen incluidos en una base de datos que cada año publica la organización International Centre for Difraccion Data (ICDD). ^{30, 37,38}

Planteamiento del problema y justificación.

Las calcificaciones pulpaes presentan una alta incidencia clínica en endodoncia y se distingue por el depósito de tejido calcificado en el espacio de la cámara pulpar y conductos radiculares, dificultando la localización e instrumentación de los mismos, estas situaciones conducen a errores dentro del procedimiento endodóncico como perforaciones, desviación del conducto original y fractura de instrumentos.

Hasta el día de hoy, la formación de calcificaciones pulpaes es multifactorial, sin embargo se han asociado a degeneración pulpar por la edad, tratamiento ortodóncico, trauma, predisposición genética, entre otros. La etiología se encuentra relacionada a un proceso inflamatorio crónico que condiciona un microambiente ideal para el depósito de minerales inducido por células especializadas sobre la matriz extracelular. Por lo anterior el estudio de las características minerales formadas dentro del tejido pulpar, mediante el empleo de técnicas para el estudio cristalográfico, incrementará el conocimiento sobre el proceso de biomineralización que lleva a cabo como respuesta ante irritantes sobre el tejido pulpar.

Objetivo general:

- Identificar las características fisicoquímicas de calcificaciones pulpares y su correlación con la localización anatómica dentro del tejido pulpar.

Objetivos específicos:

- Describir la morfología y microestructura de las calcificaciones pulpares mediante análisis imagenológico y mediante microscopía electrónica.
- Identificar la fase mineral que compone a las calcificaciones pulpares mediante microscopía electrónica de transmisión, micro Raman y difracción de rayos X.
- Correlacionar la morfología y fase mineral con su localización pulpar.

Hipótesis:

- Las calcificaciones pulpares son un mecanismo de defensa ante la presencia de estímulos endógenos o exógenos, por lo que su morfología, composición y fase mineral estará determinado por los componentes moleculares y celulares presentes en el tejido pulpar.

Metodología**Tipo y diseño general del estudio**

La presente investigación es de tipo transversal descriptivo.

Universo de estudio, selección y tamaño de la muestra

El universo de la muestra estará constituido por pacientes atendidos en la clínica de Endodoncia de la DEPeI UNAM, con presencia de calcificaciones pulpares, de 35-75 años de edad.

Criterios de inclusión y exclusión:Criterios de inclusión:

- Pacientes de ambos sexos con presencia radiográfica de calcificaciones pulpares en dientes permanentes.
- Pacientes entre 35-75 años de edad.
- Dientes que no hayan presentado acceso previo.
- Pacientes con ápice completamente formado.
- Pacientes con o sin enfermedades sistémicas.

Criterios de exclusión:

- Pacientes fuera del rango entre 35-75 años de edad.
- Dientes previamente tratados.
- Dientes deciduos.

Materiales:

- Pieza de alta velocidad.
- Fresas redondas (número 2, 3 y 4).
- Cucharillas de dentina 31,31 y 33 L.
- Agua desionizada.
- Tubos Eppendorf.
- Cinta carbón doble cara.
- Micro pinzas.
- Porta objetos.
- Rejilla de carbono.
- Mortero de ágata.
- Isopropanol.

Equipo:

- Punta de ultrasonido E7D.
- Cámara de vacío.
- Microscopio SEM JEOL 5900LV.
- Microscopio TEM JEOL JEM 2010.
- Difractómetro D8 Advance Davinvi.
- Microscopio confocal micro Raman Thermo – Scientific DXR.

Metodología.

Obtención de las muestras.

A partir de pacientes que acudieron a la clínica de Endodoncia de la División de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología y una vez realizada la historia clínica y con la autorización del consentimiento informado, se recolectaron las calcificaciones localizadas tanto en cámara como en conductos radiculares, previamente identificados con el análisis imagenológico (radiografía). Las calcificaciones fueron removidas con cucharillas endodóncicas 31, 32 y 33 L. Las muestras se lavaron con abundante agua desionizada estéril para eliminar residuos de tejido pulpar y se colocaron en micro tubos Eppendorf, una muestra por tubo, el cual fue etiquetado con los datos del paciente y clasificados como CP1, CP2, CP3 y CP4. Los tubos fueron almacenados a temperatura ambiente en una cámara de vacío hasta el día en que se realizaron los estudios de Microscopía y Espectroscopía molecular.

Preparación de las muestras.

Las muestras se dividieron, para su análisis en cada una de las diferentes técnicas: La morfología y microestructura de las calcificaciones pulpares fueron examinados empleando un microscopio electrónico de barrido JEOL 5900LV, las muestras se montaron en soportes metálicos (*pin stub*) y se recubrieron con una capa de oro (~5 nm) para reducir el daño térmico y mejorar la emisión de electrones secundarios que aumentan la calidad de la imagen. Las microfotografías fueron tomadas mediante la técnica de electrones secundarios; la composición elemental se determinó por medio de una microsonda y se calculó la proporción Ca/P mediante análisis de porcentajes atómicos de los elementos identificados en el espectro.

Para los análisis de HRTEM, DRX, y micro Raman fue necesario pulverizar las muestras en un mortero de ágata. Las muestras que se sometieron al análisis de HRTEM se resuspendieron en isopropanol, con ayuda de un capilar se tomó un volumen de ~ 5 μL y se montó en una rejilla de carbono. Las imágenes de alta resolución fueron obtenidas con un microscopio JEOL JEM2010 y analizadas con el software Digital Microscope.

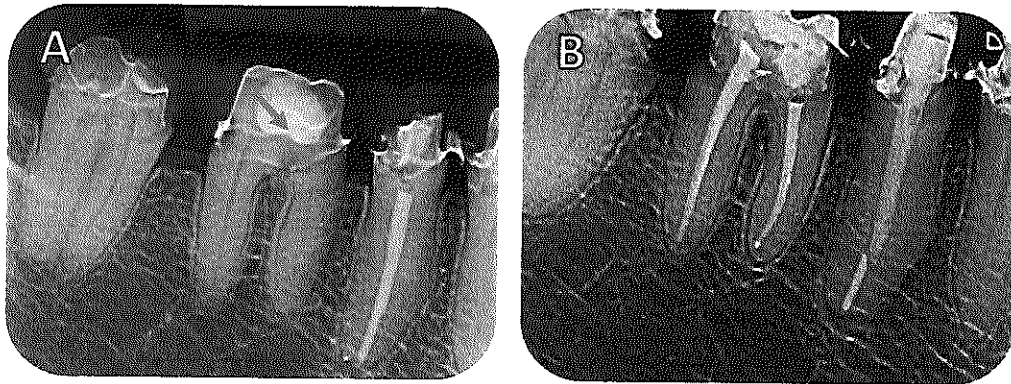
Para la caracterización de las muestras mediante micro Raman se utilizó un microscopio confocal micro Raman Thermo – Scientific DXR; se empleó el láser con longitud de onda de 532 nm, potencia de 10 nW y en el intervalo de 50-3000 cm^{-1} , los resultados de los espectros vibratorios fueron analizados con el software Origin 8.

La identificación de la fase cristalina de las calcificaciones pulpares fue evaluada mediante difracción de Rayos X. Los experimentos se llevaron a cabo con generador de rayos X de molibdeno de ánodo giratorio (D8 Advance Davinvi configuración theta-theta marca Bruker Axs), y analizadas con software Origin 8.

Resultados:

Paciente 1

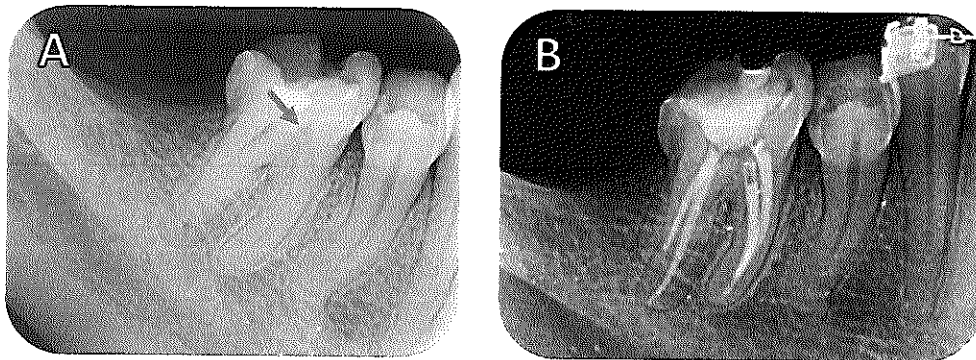
Femenina de 72 años, con antecedentes de hipertensión arterial desde hace 17 años e insuficiencia venosa periférica bajo tratamiento médico con diosmina 500 mg. Referida de la clínica de prótesis bucal e implantología DEPEI para tratamiento del diente 46; después de realizar las pruebas de sensibilidad pulpar y periapical, se diagnostica con pulpitis irreversible y periodontitis apical aguda, en la radiografía inicial se observa cámara pulpar obliterada y conductos radiculares estrechos. La calcificación se encontró libre dentro de la cámara pulpar, y una vez libre de tejido orgánico se codificó como CP1 para su posterior caracterización.



A) Radiografía dentoalveolar inicial, donde se observa cámara pulpar retraída, conductos radiculares estrechos sin lesión periapical, B) Radiografía final del tratamiento de conductos.

Paciente 2

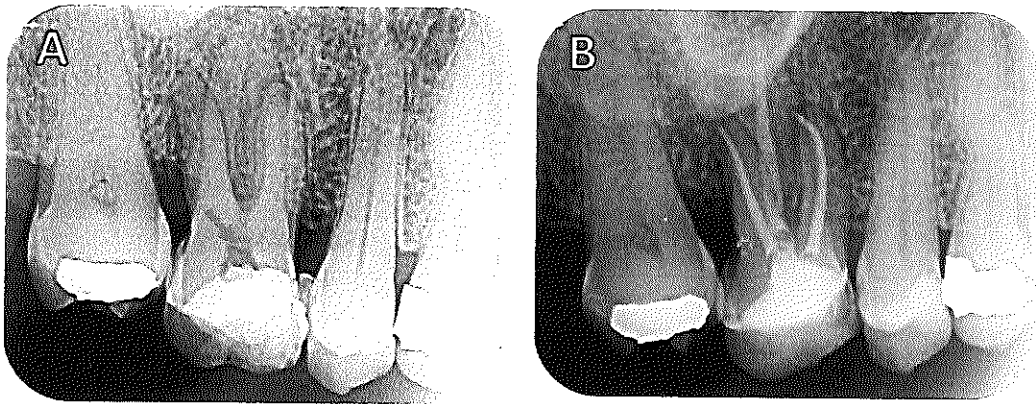
Femenina de 48 años, sin antecedentes personales patológicos. Referida de la clínica de ortodoncia DEPEI para tratamiento del diente 46 después de realizar las pruebas de sensibilidad pulpar y periapical se diagnostica con necrosis pulpar y periodontitis apical crónica, en la radiografía inicial se observa cámara pulpar estrecha y presencia de calcificación pulpar en la entrada de los conductos mesiales los cuales se observan estrechos, note la presencia de una raíz adicional distolingual (radix paramolaris). La calcificación se aisló libre dentro de la cámara pulpar, se codificó como CP2 para su posterior caracterización.



A) Radiografía dentoalveolar inicial, donde se observa cámara pulpar estrecha, conductos radiculares estrechos y presencia de una calcificación pulpar sobre la entrada de los conductos mesiales, B) Radiografía final del tratamiento de conductos.

Paciente 3

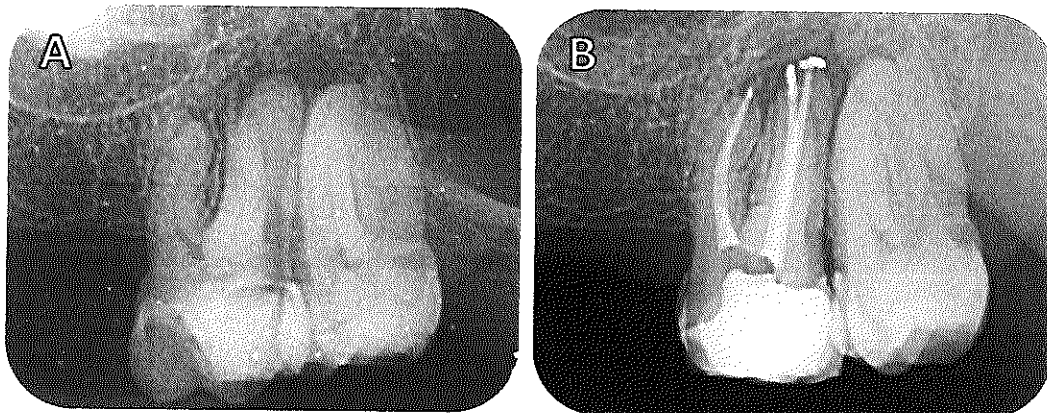
Femenina de 53 años, con antecedentes de esclerodermia, hipertensión arterial y síndrome de Sjögren bajo tratamiento médico con ácido micofenólico 360 mg, y losartan 50 mg. Referida de la facultad de odontología para tratamiento del diente 16 después de realizar las pruebas de sensibilidad pulpar y periapical se diagnostica con pulpitis irreversible y periodontitis apical aguda, en la radiografía inicial se observa cámara pulpar amplia y conductos radicales estrechos. La calcificación se encontró adherida al piso de la cámara pulpar y una vez libre de tejido orgánico se codificó como CP3 para su posterior caracterización.



A) Radiografía dentoalveolar inicial, donde aparentemente se observa una calcificación pulpar en el espacio de la cámara pulpar, B) Radiografía final del tratamiento de conductos.

Paciente 4

Femenina de 64 años, hipertensión arterial y diabetes bajo tratamiento médico con losartan 50 mg y glibenclamida 5 mg. Referida de la clínica de prótesis bucal de la DEPEI para tratamiento del diente 27 después de realizar las pruebas de sensibilidad pulpar y periapical se diagnostica con necrosis pulpar y periodontitis apical crónica, en la radiografía inicial se observa cámara pulpar obliterada y conductos radiculares estrechos. Lesión radiolúcida difusa de aproximadamente 3x2 mm asociada a la raíz palatina. Después de extraer la calcificación que se encontró adherida a la dentina se codificó como CP4 para su posterior caracterización.



A) Radiografía dentoalveolar inicial, donde aparentemente se observa una calcificación pulpar en el espacio de la cámara pulpar, B) Radiografía final del tratamiento de conductos.

Caracterización de calcificaciones: Las microfotografías obtenidas a partir de SEM mediante electrones secundarios se muestran en la imagen 1, estas permiten identificar la topografía superficial y homogeneidad de las muestras, donde en CP1 y CP2 (A-D) se observa un patrón fibrilar mineralizado con zonas aparentemente más densas, estas características topográficas son comúnmente observadas en la mineralización de fibras de colágena del hueso o de cartilago hipertrófico. En CP3 (E y F) se observan nodulos aparentemente más densos que pueden fusionarse y dar lugar a una calcificación de mayor tamaño, mientras que para CP4 (G y H) se observa un patrón laminar, similar a la mineralización de la dentina.

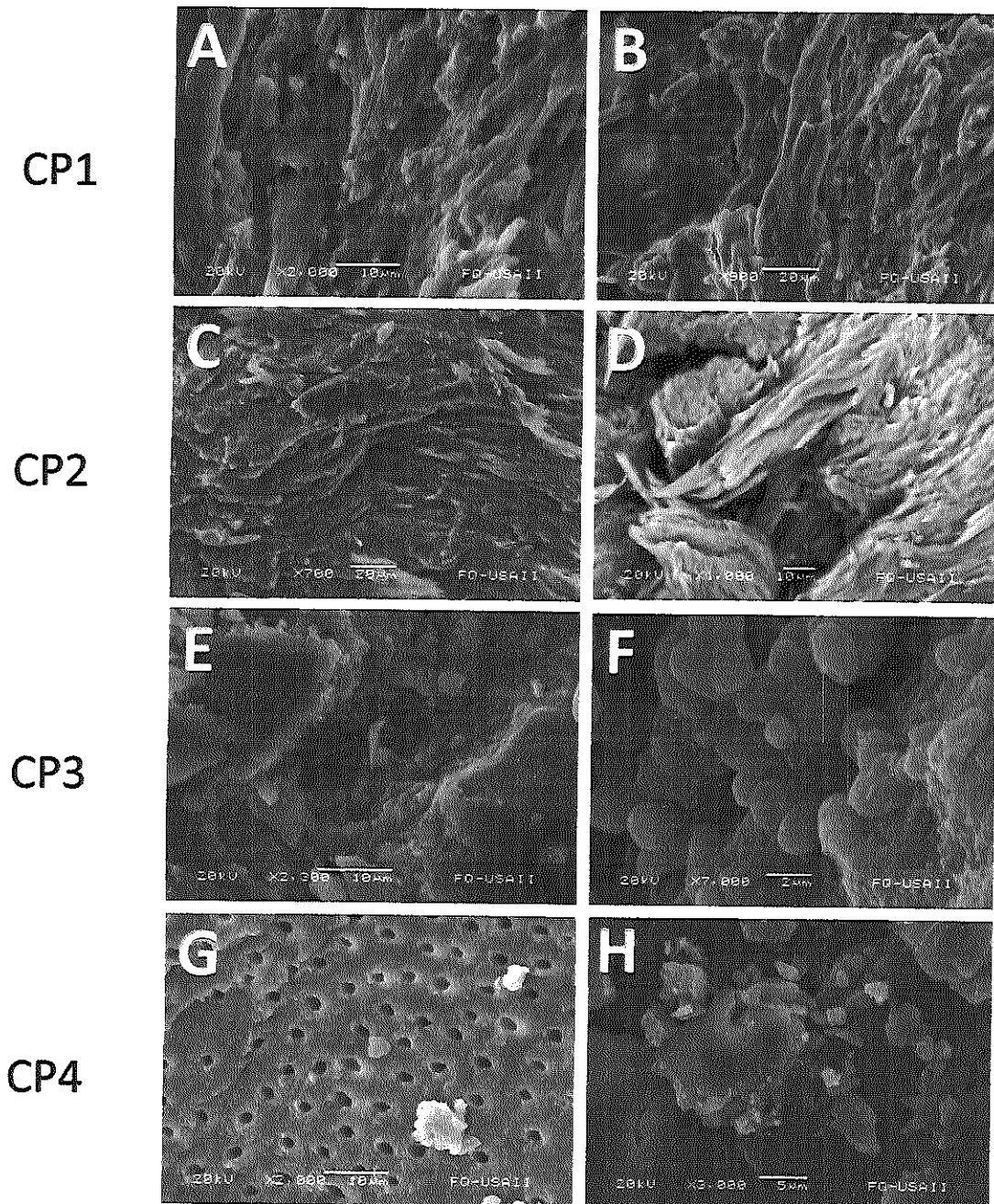


Imagen 1. Microfotografías de SEM con electrones secundarios de calcificaciones pulpares.

Análisis semicuantitativo de elementos (EDS).

Al realizar el análisis químico elemental mediante EDS de las muestras mostrado en la imagen 2, se observó mayor proporción de calcio y fósforo, sin embargo también se identificaron otros elementos presentes como sodio, magnesio, carbono, cloro y zinc. La relación Ca/P para cada una de las muestras fue 1.85, 2.9, 2.5 y 1.87 respectivamente, estos valores son similares e incluso más altos comparados con la proporción Ca/P de la HA (1.67), esto se debe a la presencia de moléculas y proteínas (denominadas impurezas) que forman parte activa del proceso de biomineralización en las calcificaciones pulpares.

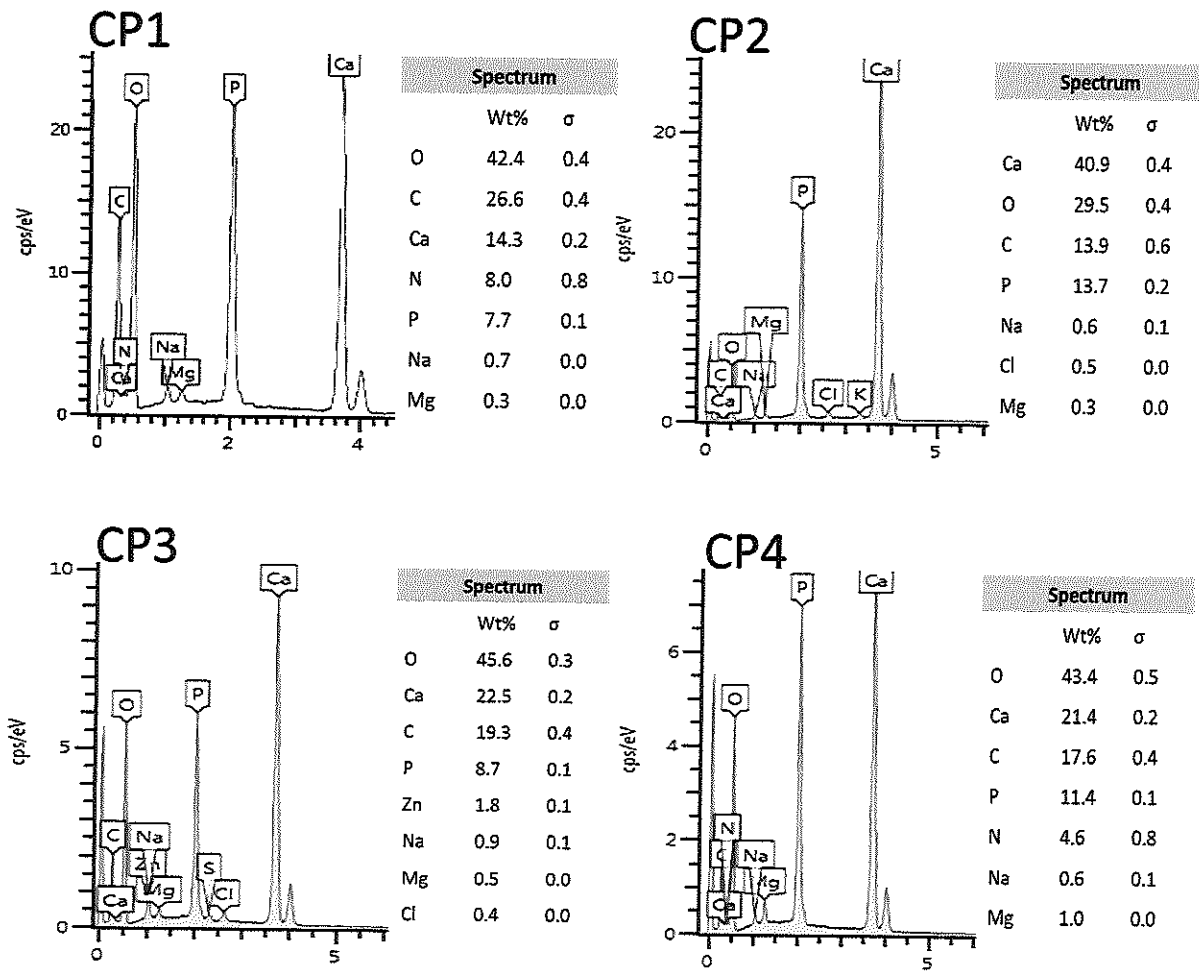


Imagen 2. Análisis EDS de calcificaciones pulpares. La gráfica y tabla muestran los elementos presentes para cada una de las muestras.

Microscopía Electrónica de Alta Resolución (HRTEM).

El análisis de los cristales realizado mediante HRTEM se ilustra en la imagen 3, las fotografías de alta resolución muestran los valores que corresponden a distancias interatómicas para CP1 de 4.13, 4.42, 1.76, 6.58, 4.18 Å que corresponden a los planos cristalinos (1,-2,1), (-3, 2,0), (0, 1,0), (3, 1,1), (1, 0,1) respectivamente.

Para CP2 las distancias interatómicas 3.09, 1.51, 1.39, 1.91, 1.74 Å corresponden a los planos cristalinos (1,1,-2), (1,2,3), (2,2,4), (1,3,2), (3,0,3) respectivamente.

Las distancias interatómicas para CP3 fueron 1.41, 1.92, 2.25, 2.30, 2.20 Å, que corresponden a los planos cristalinos (1,4,3), (2,2,2), (0,0,3), (-1,0,3), (0,3,0).

Mientras que para CP4 las distancias interatómicas 7.05, 6.97, 6, 5.385, 6.958, 5.505, 5.47, 7.11 Å corresponden a los planos cristalinos (3,4,1), (5,1,1), (1,0,4), (2,3,3), (1,4,3), (2,6,0), (2,1,3), (1,4,3).

Las reflexiones cristalinas se muestran a través de la transformada de Fourier (recuadros en rojo), la cual nos permite identificar que la fase cristalina de las fotografías A, C y G es Brushita, B y E Monetita, D, F y H corresponden a HA, los cuales fueron comparados con los datos de referencia PDF 720713, PDF 770128 y PDF 861201.

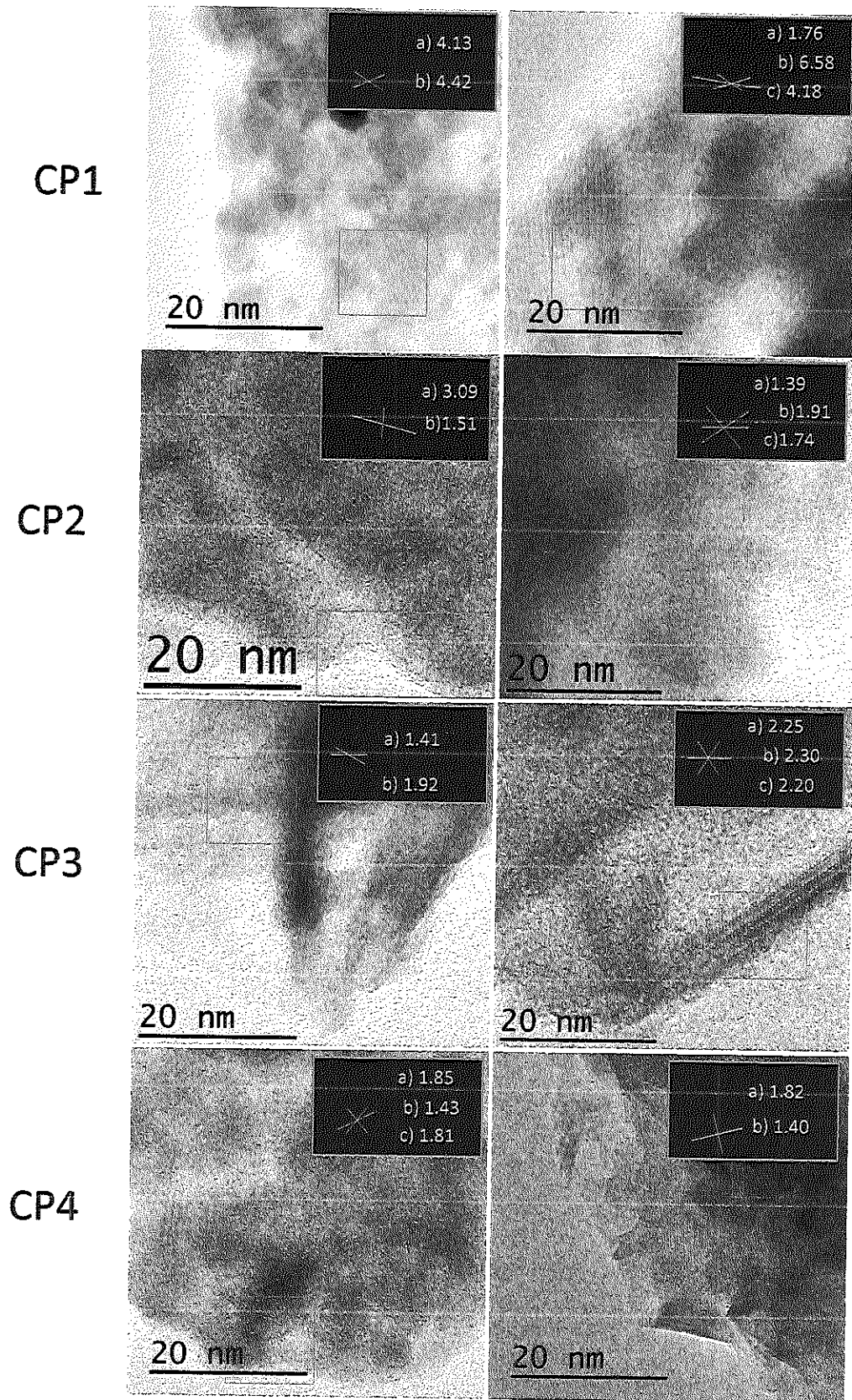


Imagen 3. Fotografías obtenidas con HRTEM que muestran la resolución atómica, donde a partir de la transformada de Fourier (recuadros en rojo) se midieron ángulos y distancias interplanares.

Difracción de Rayos X.

La identificación de la fase cristalina de las calcificaciones pulpares fue evaluada mediante difracción de Rayos X. Los experimentos se llevaron a cabo con difractómetro con ánodo de molibdeno giratorio (D8 Advance Davinvi configuración theta-theta marca Bruker Axs).

Los difractogramas se graficaron en el programa Origin 8, se compararon con datos de referencia PDF-861201 que corresponde con la fase cristalina de hidroxiapatita.

Los difractogramas de la Imagen 4 de las cuatro muestras de calcificación pulpar presentan picos en diferentes posiciones de ángulo los cuales corresponden a los planos cristalinos (002), (211), (112), (130) y ángulos de 25.816, 32.065, 31.941 y 39.86 respectivamente. Estos planos cristalinos corresponden a la fase de HA y no se observa la presencia de otra fase mineral, de los difractogramas podemos apreciar picos anchos que se atribuye a cristales pequeños, el cristal crece en la dirección (112) ya que es el pico de mayor intensidad. Al obtener las calcificaciones pulpares de una matriz orgánica el resto de los picos de la fase de HA no se logran definir esto se puede atribuir a la presencia de material orgánico en la muestra.

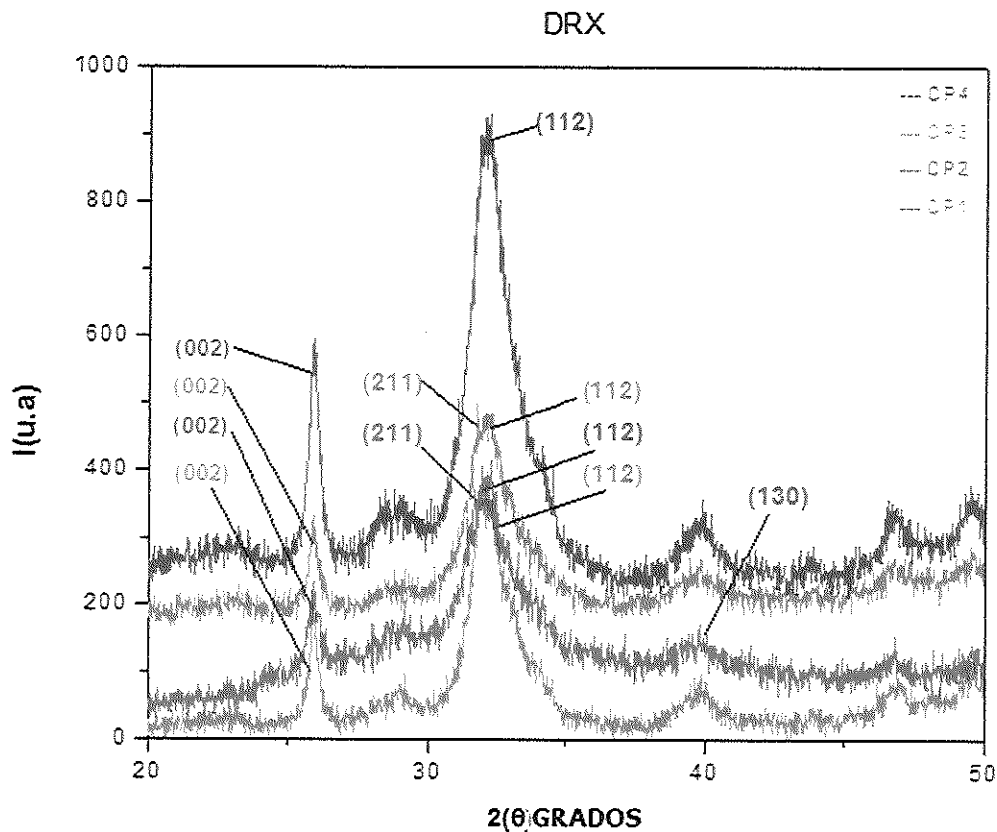


Imagen 4. DRX de calcificaciones pulpares

Espectroscopia Raman.

El análisis por espectroscopia Raman, permite identificar los grupos funcionales fosfato (PO_4^{2-}) característicos del arreglo cristalino de la fase HA. Por lo tanto podemos observar en el espectro de la imagen 5 la banda en $582\text{-}587\text{ cm}^{-1}$ corresponde a la vibración ν_4 (deformación P-O), la banda $950\text{-}967\text{ cm}^{-1}$ que corresponde a la vibración ν_1 (valencia simétrica P-O), las bandas en $1065\text{-}1067\text{ cm}^{-1}$ corresponde a la vibración ν_1 (grupo carbonato sustitución tipo B) en el caso $2932\text{-}2937\text{ cm}^{-1}$ la vibración se atribuye a enlaces hidroxilo.

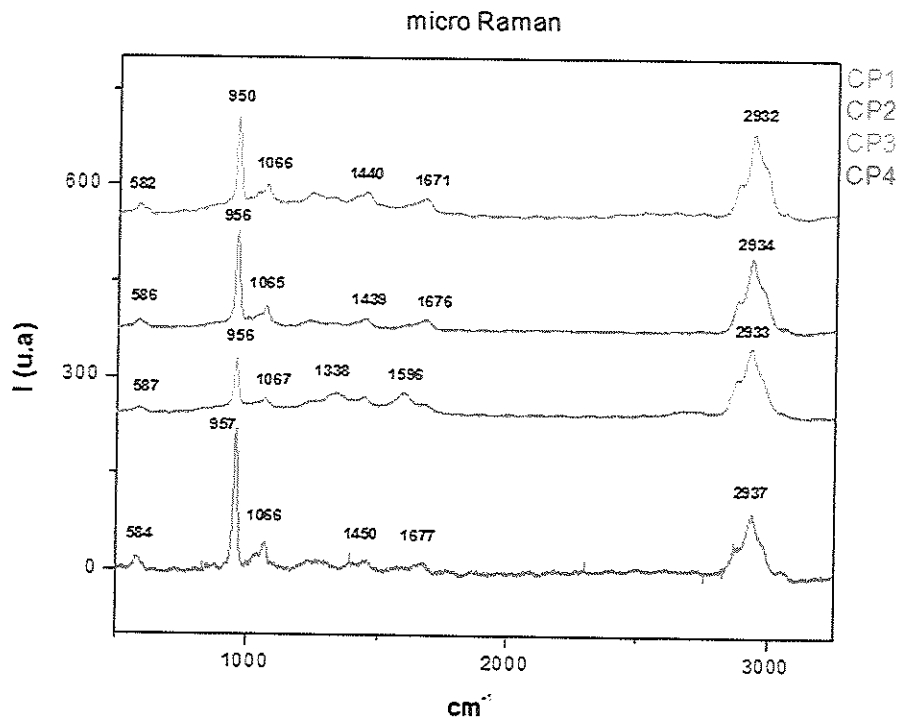
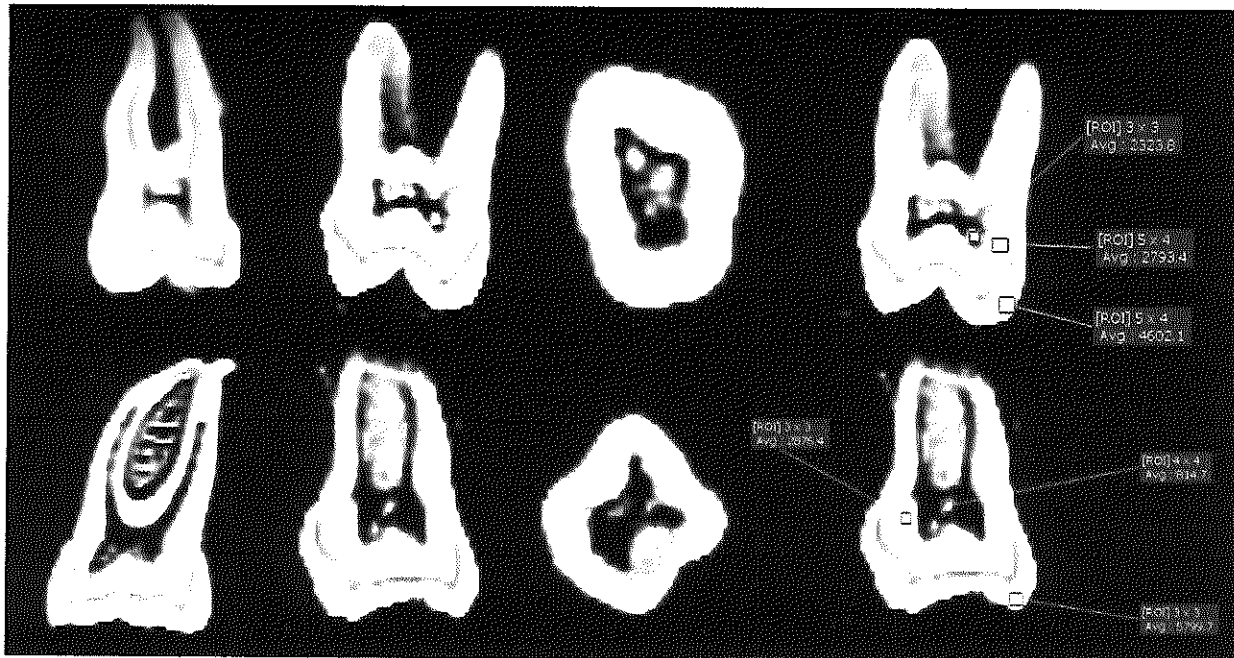


Imagen 5. Espectro micro Raman de calcificaciones pulpares.

Líneas de Espectro Raman de Hidroxiapatita.	
cm-1	Fragmento, vibración.
423	(PO_4) ₃ – (ν_2) (P-O vibracional)
585	(PO_4) ₃ – (ν_4) (P-O deformación)
950-965	(PO_4) ₃ – (ν_1) (P-O valencia simétrica)
1030-1045	(PO_4) ₃ – (ν_3) (P-O valencia simétrica)
1065-1075	(CO_3) ₂ – (ν_1) Substitución tipo B
1079-1080	Carbonato de potasio amorfo (ν_1)
1085-1087	Calcita y Aragonita (ν_1)
1095-1103	(CO_3) ₂ – (ν_1) Substitución tipo A

Imagen 6. Líneas de espectro Raman de Hidroxiapatita (Timchenko A, "Experimental studies of hydroxyapatite by Raman spectroscopy", Journal Optical Technology, 2018.)

Correlación del grado de mineralización respecto a la ubicación de calcificaciones dentro del tejido pulpar.



Con ayuda de tomografía computarizada se analizó la densidad de las calcificaciones pulpares a través de unidades Hounsfield, y se correlacionó la ubicación anatómica con el grado de mineralización. Los resultados indican que las calcificaciones localizadas en la periferia del tejido pulpar presentan densidad similar a la dentina, mientras que las calcificaciones libres presentan menor grado de densidad; lo cual corrobora los resultados obtenidos en este trabajo y permite postular que posiblemente el grado de mineralización corresponde a la ubicación anatómica, ya que las calcificaciones encontradas en el centro del tejido pulpar se encuentran menos mineralizadas y se relaciona con el grado de componente orgánico presente.

Discusión.

Las calcificaciones pulpaes son alteraciones en el tejido pulpar, y ocurren con mayor frecuencia en mujeres que en hombres, su prevalencia puede alcanzar hasta 50% de los dientes de una persona sana, los dientes más afectados son los primeros molares y con mayor recurrencia en la pulpa cameral (Goga R, 2011, Nogueira Leal 2017, Cohen 2010). Aunque se ha relacionado que la prevalencia es mayor en pacientes de edad avanzada, las calcificaciones pulpaes también se pueden observar en pacientes jóvenes, en dientes sanos e incluso en dientes no erupcionados. En un estudio realizado con 52 caninos impactados (Nitzan 1996), se evaluó la presencia de calcificaciones en pacientes entre 11-76 años de edad; los resultados mostraron una incidencia constante en todos los grupos de edad, y por tanto sin relación con el envejecimiento.

Investigaciones previas asocian la presencia de calcificaciones con el proceso natural de envejecimiento o en respuesta a lesiones, como la oclusión traumática, movimientos de ortodoncia y factores irritantes que promueven la inflamación crónica⁹. Las otras causas reportadas incluyen factores idiopáticos, fluoruros, suplementos, hipervitaminosis D o una posible predisposición genética (dentinogénesis imperfecta y displasia dentinal, que pueden verse incluso en dientes sin erupción). Sin embargo, la correlación entre envejecimiento y calcificaciones pulpaes sigue sin aclararse y aún se está discutiendo. Cabe destacar que en el presente estudio no se observó una relación directa entre el envejecimiento, tamaño y la composición de la calcificación pulpar; sin embargo, es necesario incrementar el número de muestra de eventuales investigaciones para obtener datos más precisos.

Todas las muestras analizadas en este trabajo fueron obtenidas de pacientes femeninas de entre 52 y 73 años, 3 de ellas con antecedentes de hipertensión arterial; los dientes de los cuales fueron obtenidas estas calcificaciones fueron primeros molares superiores y un segundo molar inferior asociados a irritantes crónicos como caries y bruxismo. Nuestros resultados concuerdan con los reportes mencionados con acerca de sexo y edad.

Aunque los estudios epidemiológicos han destacado su alta prevalencia, el conocimiento básico del proceso de formación que tiene lugar en la pulpa dental es escaso, el análisis de la microestructura de las calcificaciones nos dejan ver la participación activa de componente orgánico, colágena, en dirigir el crecimiento al actuar como un andamio para el depósito mineral dando como resultado calcificaciones fibrilares con menor cantidad de zonas calcificadas. Por otro lado, las calcificaciones obtenidas de la periferia muestran morfologías más compactas y superficies más lisas, en donde la presencia de colágena es menor y la dentina actúa como un sustrato para el depósito de minerales.

La relación Ca/P de las muestras fue calculada por medio de EDS, los resultados son relativamente altos comparados con la proporción Ca/P presente en hidroxiapatita estequiométrica 1.67, esto se puede explicar debido a que en la composición de las

calcificaciones pulpaes se encuentran presentes otros elementos como Cl, Mg, Na y Zn; estudios anteriores también han identificado la presencia de Cu y Zn en mayor proporción en la composición de calcificaciones pulpaes y en dentina cariada presumiblemente la presencia de estas altas concentraciones de Cu y Zn, que no se observan en dentina sana, puede estar relacionado con un aumento de la actividad de la enzima oxido dismutasa (SOD) en un contexto inflamatorio.

Estas calcificaciones pueden obliterar parcial o completamente la cámara pulpar y por lo tanto complicar el tratamiento endodóncico, la composición precisa nunca se ha determinado, sin embargo Trowbridge encontró que su fase mineral consiste en hidroxapatita carbonatada; otros autores como Yoshiyama y Col. reportaron la presencia de witlockita en las muestras analizadas, y en un estudio reciente de Fleur Beres se identificó apatita parcialmente carbonatada con valores similares a dentina cariada. En este trabajo la identificación de la fase cristalina se obtuvo mediante el empleo de técnicas especializadas de espectroscopia y difracción de rayos X; y donde los resultados obtenidos, al ser comparados con tablas internacionales de referencia cristalográficas de minerales de importancia biológica y condujo a la identificación predominante de HA para las cuatro muestras de calcificaciones pulpaes. Sin embargo, también se identificaron fases como brushita y monetita, que corroboran que la formación de calcificaciones pulpaes se lleva a cabo bajo el control molecular de componentes orgánicos (colágena y proteínas especializadas) sobre el depósito y organización de iones inorgánicos que forman parte de fases cristalinas menos mineralizadas. En diversos estudios se ha comprobado que el proceso de biomineralización se lleva a cabo gracias a un microambiente que facilita el depósito de fosfato de calcio, donde eventualmente regiones específicas de moléculas orgánicas controlan el crecimiento y maduración del mineral.

Algunos estudios han observado la posible correlación de enfermedades sistémicas y la aparición de calcificación pulpar, especialmente enfermedad cardiovascular (ECV). Maranhao de Moura y de Paiva confirmaron que la calcificación pulpar tiene una tasa aumentada en sujetos con aterosclerosis coronaria. Nayak y col. informó que los pacientes con enfermedades cardiovasculares tenían mayor número de cálculos pulpaes en comparación con otras enfermedades sistémicas. Edds y col. propuso que el 74% de los pacientes con antecedentes de ECV presentaban cálculos pulpaes evidentes, mientras que solo el 39% de los pacientes sin antecedentes de ECV tenían cálculos pulpaes.

Con respecto a la patogénesis similar de la calcificación de la pulpa dental y los ateromas calcificados, se ha propuesto que las radiografías de rutina se puedan usar como un método de detección disponible y de bajo costo para el diagnóstico precoz de ECV potencial. La aterosclerosis es una enfermedad que amenaza la vida y rara vez manifiesta signos o síntomas; por lo tanto, su detección temprana es crucial para prevenir un derrame cerebral o un ataque cardíaco. Las radiografías son relativamente económicas y se realizan de forma rutinaria en una gran parte de la población adulta.

Conclusión:

En este estudio caracterizamos la ultraestructura de los cálculos pulpares, se identificó la fase cristalina que compone a estos depósitos cálcico, predominantemente como hidroxapatita; mediante la aplicación de diferentes herramientas tecnológicas utilizadas para la caracterización de las calcificaciones, obteniendo datos importantes sobre el grado de mineralización, la forma de crecimiento de los cristales, y la relación anatómica de estos dentro del tejido pulpar. Debido al diseño de este trabajo, no se puede establecer una relación directa de la formación de estas mineralizaciones con la edad o con enfermedades sistémicas, aunque 3 de las cuatro muestras de pacientes referían enfermedad cardiovascular crónica.

A partir de los resultados obtenidos, observamos que la presencia de un irritante crónico en el tejido pulpar condiciona un microambiente que facilita la precipitación de iones sobre la matriz orgánica, dando lugar a la formación de calcificaciones pulpares, el grado de maduración se relaciona con la ubicación anatómica ya que las calcificaciones adheridas o cercanas a la dentina se encuentran más mineralizadas que las que se encuentran libres en el tejido, esto es debido a los componentes de la matriz orgánica; donde la colégena juega un papel importante en el grado de mineralización.

Diferentes estudios sugieren que la identificación de calcificaciones pulpares podría utilizarse como un método de diagnóstico disponible para la detección temprana de pacientes con riesgo de enfermedades cardiovasculares no diagnosticadas, síndromes o hipercalcemias; los resultados de este trabajo concuerdan con dichas investigaciones, ya que más del 50% de las muestras analizadas correspondían a pacientes con enfermedades cardiovasculares. Sin embargo es necesario enfatizar que es el médico del paciente y no el dentista quien hace el diagnóstico final.

Agradecimientos.

C.D.E.E. Alejandra Rodríguez Hidalgo Docente de Asignatura de Endodoncia de la División de Estudios de Posgrado e Investigación F.O UNAM.

Dr. en Ciencias Gonzalo Montoya Ayala Profesor de Investigación del Laboratorio de Biología Periodontal y Tejidos Mineralizados. DEPeI, UNAM.

Dra. Maricela Santana Vázquez, Investigadora Posdoctoral Laboratorio de Biología Periodontal y Tejidos Mineralizados. DEPeI, UNAM

Ingeniero Químico Rafael Iván Puente Lee Responsable del Laboratorio de Microscopía electrónica de barrido y transmisión de la USAII. FQ. UNAM.

Ingeniero Químico María Cecilia Salcedo Luna Responsable del Laboratorio de Difracción de Rayos X de Polvos USAII, Facultad de Química, UNAM.

Referencias.

1. Villagómez Olea José "Ecología Oral" 1°Ed. Manual Moderno, 2018.
2. Jürgen Engel. "A Critical Survey of Biomineralization Control, Mechanisms, Functions and Material Properties", Springer Briefs in Applied Sciences and Technology, 2017.
3. Crichton Robert. "Biomineralization. Biological Inorganic Chemistry", Second Edición, ELSEVIER, 2012.
4. Kawasaki Kazuhiko "Biomineralization in Humans: Making the Hard Choices in Life" Annual Review of Genetics, 43, 119–142, 2009.
5. Chricton Robert "Biomineralization: Biological inorganic chemistry" Second Edition Chap. 19, Elsevier, 2012
6. Ríos Castro Ángel, "Técnicas espectroscópicas en química analítica, volumen II, editorial síntesis, 2012.
7. <http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero>
8. Cohen Stephen "Las vías de la pulpa". 10° ed. Madrid. Elsevier, 2010.
9. Estrela Carlos "Ciencia endodóntica" 1ª.ed. Sao Paulo: Artes Médicas, 2005.
10. Leonardo, Mario Roberto "Endodoncia, tratamiento de conductos radiculares: principios técnicos y biológicos" vol. 1 Sao Paulo, Editorial Artes Médicas, 2005.
11. Goga R "Pulp stones: a review" International Endodontic Journal, 41, 457–468, 2008.
12. Moss-Salentijn "Calcified structures in human dental pulps" Journal of Endodontics, 14, 184-189, 1998.
13. Da Silva Emmanuel "Assessing pulp stones by cone-beam computed tomography" Clinical Oral Investigation, 21, 2327–2333, 2017.
14. Goldberg Michel "Inflammatory and immunological aspects of dental pulp repair", Pharmacol Res; 58, 137–147, 2008
15. Widbiller M "Dentine matrix proteins: isolation and effects on human pulp cells" International Endodontic Journal, 51, 278–290, 2018.
16. Béres Fleur "Physicochemical analysis of human pulpal mineralization secondary to *FAM20A* mutations" Connective Tissue Research, 59, 46-51, 2018.
17. Nozu Aoi "Senescence and odontoblastic differentiation of dental pulp cells", Journal of Cellular Physiology, 234, 849–859, 2019.
18. Khojastepourl Leila "Can dental pulp calcification predict the risk of ischemic cardiovascular disease" Journal of Dentistry, 10, 435-460, 2013.
19. Mohammed S Alenazy "Clinical implications of calcifying nanoparticles in dental diseases: a critical review" International Journal of Nanomedicine, 9, 27-31, 2014.
20. Sisman Y. "The prevalence of pulp stones in a Turkish population. A radiographic survey" Med Oral Patol Oral Cir Bucal; 17, 212–217, 2012.

21. Yang F, Zeng J, Zhang W, et al. "Evaluation of the interaction between calcifying nanoparticles and human dental pulp cells: a preliminary investigation". *International Journal Nanomedicine*, 6, 13–8, 2010.
22. Zeng JF, Yang F, Zhang W, et al. "Association between dental pulp stones and calcifying nanoparticles". *Int J Nanomedicine*, 6, 109–18, 2011.
23. Nitzan DW, "The effect of aging on tooth morphology: a study on impacted teeth", *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology* 61, 54, 1986.
24. Yoshiyama M, "Scanning electron microscopic characterization of sensitive vs. insensitive human radicular dentin". *J Dent Res* 68, 1498–1502, 1998.
25. Trowbridge HO, "Assessment of indurated, diffusely calcified human dental pulp. In: *Proceedings of the International Conference of Dentin/ Pulp Complex*". Tokyo: Quintessence Publishing; 1996:297.
26. Fleur Beres, Juliane Isaac, "Comparative physicochemical analysis of pulp stone and dentin", *Journal of endodontics*, 42, 432-437, 2016.
27. Nayak M, Kumar J, Prasad LK. "A radio-graphic correlation between systemic disorders and pulp stones". *Indian J Dent Res*, 21, 369-373, 2010.
28. Maranhão de Moura A, de Paiva JG. "Pulpal calcifications in patients with coronary atherosclerosis". *Endod Dent Traumatol*, 3,307-309, 1987.
29. Edds AC, Walden JE, Scheetz JP, "Pilot study of correlation of pulp stones with cardiovascular disease". *Journal of endodontics*, 31, 504-506, 2005.
30. Vázquez Nin Olga "Introducción a la microscopía electrónica aplicada a las ciencias biológicas" Fondo de Cultura Económica, México 2000.
31. Brodusch Nicolas "Field Emission Scanning Electron Microscopy New Perspectives for Materials Characterization" Springer Briefs in Applied Sciences and Technology, 2018.
32. Marcaida Iker "Analytical and bioanalytical chemistry" Springer Berlin, 2017
33. Tanaka Nobuo "Electron Nanoimaging Basics of Imaging and Diffraction for TEM and STEM" Springer Briefs in Applied Sciences and Technology, Tokio Japan 2017.
34. Kawasaki Kazuhiko "Biomineralization in Humans: Making the Hard Choices in Life" *Annual Review of Genetics*, 43, 119–142, 2009.
35. Horsley SH, Beckstrom B, Clark SJ, Scheetz JP, "Prevalence of carotid and pulp calcifications: a correlation using digital panoramic radiographs". *Int J Comput Assist Radiol Surg*, 4, 169-173, 2009.
36. Şener S, Cobankara FK, Akgünlü F. "Calcifications of the pulp chamber: prevalence and implicated factors". *Clin Oral Investig*, 13, 209-215, 2009.
37. Timchenko A, "Experimental studies of hydroxyapatite by Raman spectroscopy", *Journal Optical Technology*, 2018.
38. Antonakos Anastasios "Micro-Raman and FTIR studies of synthetic and natural apatites" *Journal biomaterials*, 28, 3043-3054, 2007.