

Efectos del grabado ácido en la amelogenesis imperfecta hipomineralizada. Estudio microscópico y microanalítico

Carmen Sánchez-Quevedo ¹, Gregorio Ceballos ², Ismael Ángel Rodríguez ³, José Manuel García ¹, Miguel Alaminos ⁴

(1) Profesor Titular de Histología y Embriología Bucodental, Departamento de Histología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Granada, España

(2) Jefe de Servicio, Hospital Clínico Universitario San Cecilio, Universidad de Granada, España

(3) Profesor de Histología, Cátedra B de Histología y Embriología, Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Córdoba, República Argentina

(4) Investigador contratado. Unidad Mixta de Investigación. Hospital Clínico Universitario San Cecilio. Departamento de Histología. Universidad de Granada, España

Correspondencia:

Prof. Carmen Sánchez-Quevedo

Departamento de Histología

Facultad de Medicina y Odontología

Universidad de Granada

E-18071 GRANADA, España

Tel.: +34-958-243514

Fax: +34-958-244034

E-mail: mcsanchez@hstolii.ugr.es

Recibido: 12-03-2004

Aceptado: 18-05-2005

Sánchez-Quevedo C, Ceballos G, Rodríguez IA, García JM, Alaminos M. Acid-etching effects in hypomineralized amelogenesis imperfecta. A microscopic and microanalytical study. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2006;11:E40-3.

© Medicina Oral S. L. C.I.F. B 96689336 - ISSN 1698-6946

Indexed in:

-Index Medicus / MEDLINE / PubMed
-EMBASE, Excerpta Medica
-Índice Médico Español
-IBECs

RESUMEN

Objetivos: El objetivo del presente trabajo consistió en definir los patrones morfológicos y de calcificación en el esmalte de dientes afectados con amelogenesis imperfecta hipomineralizada, tras la aplicación del grabado ácido, mediante la utilización de la microscopía electrónica analítica cuantitativa.

Diseño del estudio: Se estudian 5 fragmentos de caninos humanos permanentes de pacientes con amelogenesis imperfecta hipomineralizada y 5 caninos controles. Todas las muestras fueron tratadas con ácido fosfórico y posteriormente procesadas para su estudio morfológico y microanalítico.

Resultados: Se observan dos tipos de patrones de grabados, I y II, así como áreas o islotes de patrón I insertados en extensas áreas homogéneas en las que predomina el patrón II. No se aprecian diferencias significativas en la concentración de calcio entre las muestras con amelogenesis imperfecta hipomineralizada y control después del grabado ácido tras el estudio microanalítico cuantitativo. El patrón tipo III no fue observado.

Conclusiones: Se describen los cambios y distribución en la estructura del esmalte después del grabado ácido durante 30 segundos en dientes con amelogenesis imperfecta hipomineralizada. Aunque los datos obtenidos coinciden con alteraciones en el desarrollo de los prismas, no se detectan alteraciones en la concentración de calcio.

Palabras clave: Amelogenesis imperfecta, patrones prismáticos, microscopía electrónica de barrido, microscopía electrónica analítica cuantitativa.

ABSTRACT

Objectives: The purpose of this study was to use quantitative x-ray microprobe analysis with scanning electron microscopy to define the morphostructural and calcification patterns in the enamel of teeth with the hypomineralized variant of amelogenesis imperfecta.

Study design: We compared 5 fragments of permanent human canines from patients with clinically diagnosed hypomineralized amelogenesis imperfecta and 5 normal permanent canines from subjects without amelogenesis imperfecta. All specimens were etched with phosphoric acid for morphological and microanalytical examination.

Results: Two types of etching patterns were found; in addition, islets of pattern I were seen within areas of pattern II. Microanalysis detected no significant differences in calcium concentration between specimens with amelogenesis imperfecta and normal control specimens after acid etching. Pattern III was not observed.

Conclusions: The changes and their distribution in the enamel structure after 30 s of acid etching are described in teeth with this rare disorder. Although these data seem to coincide with alterations in prism development, no alterations in calcium concentration were found.

Key words: Acid-etching, microanalysis, quantitative method, scanning electron microscopy.

INTRODUCCION

La técnica del grabado ácido se aplica en odontología con el objeto de alcanzar tres distintos objetivos. Por un lado porque constituye un modelo de destrucción ácida semejante al que produce la caries dental (1); por otro porque su aplicación ayuda a la clasificación taxonómica y evolutiva de los márfidos al establecer diferencias estructurales en el esmalte de los mismos (2). Finalmente porque su aplicación clínica permite asentar, sobre las excavaciones y fisuras que origina, el material de restauración necesario para la terapia odontológica (3). La amelogenesis imperfecta es, por otra parte, un término que identifica a un grupo de alteraciones hereditarias que afectan a la formación de la matriz extracelular del esmalte (4) alterando la formación de los prismas (5). Aunque la terapéutica odontológica en la amelogenesis imperfecta varía según el estatus clínico de cada paciente y el estadio evolutivo del proceso existen algunas indicaciones en las que el grabado ácido podría aplicarse a las piezas afectadas para desarrollar con posterioridad un tratamiento restaurador (6,7).

La aplicación reciente de nuevas técnicas de análisis cuantitativo a la microscopia electrónica en el estudio de los tejidos mineralizados permite establecer, en el momento presente, una estrecha relación entre los patrones morfológicos y los patrones químicos que definen y configuran la estructura de dichos tejidos (8-10). La aplicación a la odontología de la microscopía electrónica analítica ha permitido un importante avance en la definición de los patrones de normalidad y de patología de las estructuras mineralizadas dentarias y de la respuesta que ofrecen dichas estructuras a la terapéutica odontológica (11, 12). El presente trabajo tiene por objeto el estudio de los patrones estructurales y de calcificación en la amelogenesis imperfecta hipomineralizada tras la aplicación del grabado ácido utilizando el microscopio electrónica de barrido y el microanálisis cuantitativo por energía dispersiva de rayos X. La utilización de dicha metodología permite, por un lado analizar los efectos del grabado ácido sobre los prismas del esmalte y evaluar por otro la incidencia que dichas modificaciones podrían tener sobre cualquier terapia restaurativa que utilizase el grabado ácido como tratamiento previo.

MATERIAL Y METODO

El material de estudio consta de fragmentos de 5 caninos permanentes de la región coronaria, obtenidos en el curso de

la preparación de la corona, procedentes de pacientes, clínica y genéticamente diagnosticados de amelogenesis imperfecta hipomineralizada. Todos los pacientes fueron miembros de una misma familia (13). Como control utilizamos fragmentos coronarios de 5 caninos normales incluidos, extraídos quirúrgicamente.

Los fragmentos dentarios se sometieron a un proceso de criofijación en nitrógeno líquido y posterior desecación en un aparato Polaron E5350 a -80°C durante 24h. Con posterioridad se aplicó la técnica del grabado ácido con ácido fosfórico al 35% durante 30 segundos. A continuación los especímenes se lavaron con agua bidestilada y se secaron al aire durante 1 hora. Tras el montaje de los mismos se recubrieron con carbón para el estudio microanalítico y con oro para el estudio morfológico. Ambos estudios se realizaron en un microscopio electrónico de barrido Philips XL30 provisto de un detector de energía dispersiva de Rayos X E DAX-4 (14, 15).

Las constantes del microscopio y del detector utilizadas fueron las siguientes: voltaje = 15 kV; spot size = 500 nm; ángulo de superficie = 35°; ángulo de percepción = 61.34°, cuentas por segundo = 1200 cps; tiempo de acumulación de cuentas = 50 s. Con las constantes indicadas se obtuvieron una serie de espectros a 40 000 x. El número de análisis fue de 10 en cada espécimen, alcanzándose un total de 50 en las muestras con amelogenesis imperfecta y 50 en las muestras control.

Para medir la concentración de calcio utilizamos el método pico/fondo (P/B) (16, 17) y sales estándares de calcio (10, 15, 18, 19). Para el estudio cuantitativo de las muestras analizadas se utilizan sales estándar de Ca las cuales fueron tratadas con idéntica metodología que las muestras tanto control como de amelogenesis (20, 21). Para el análisis estadístico utilizamos la t de Student.

RESULTADOS

Nuestros resultados ponen de relieve, en las piezas de amelogenesis imperfecta estudiadas, dos tipos de patrones de grabado. En primer lugar se observa el patrón tipo I formado por prismas con una marcada excavación central y unos prominentes márgenes periféricos (Fig. 1). En segundo lugar el denominado patrón II en el que se observa una variable protusión central de los prismas y una disolución mas o menos marcada en la periferia de los mismos siendo este patrón el mas extendido en la estructura del esmalte (Fig. 2). En los casos con patrón I a

diferencia de lo que ocurre en las áreas con patrón II existe una mayor variabilidad en el tamaño y morfología de los prismas. En las zonas correspondientes a las estrías de Retzius el grabado ácido muestra también prismas con patrones modificados en su tamaño y morfología a diferencia de los existentes en las zonas comprendidas entre las líneas de Retzius que son en general mucho más homogéneas. En cualquier caso a nivel de las estrías de Retzius los prismas mantienen el patrón de grabado del área en la que se encuentra. Uno de los datos más característicos observados en las piezas dentarias con amelogenesis imperfecta tratadas con grabado ácido es la existencia de pequeñas áreas o islotes de patrón I insertas en extensas áreas homogéneas en las que predomina el patrón II (Fig. 3). A dicho nivel existe un material amorfo abundante que sobreleva en general las pequeñas áreas con patrón de grabado tipo I.

Los resultados microanalíticos expresados en fracción de peso de calcio tras el tratamiento con grabado ácido en el esmalte afectado de amelogenesis imperfecta fueron: 22.90 ± 2.52 en el patrón tipo I, 22.64 ± 1.95 en las protusiones o islotes de patrón I y 21.95 ± 2.25 en el patrón tipo II. Los valores obtenidos después del grabado ácido en las muestras controles fueron 22.50 ± 2.41 en el patrón tipo I y 21.61 ± 2.25 en el patrón tipo II.

El estudio estadístico realizado (t de Student) no pone de relieve diferencias significativas en la fracción de peso de calcio entre ambos tipos de piezas dentarias (amelogenesis imperfecta y control) tras la aplicación del grabado ácido.

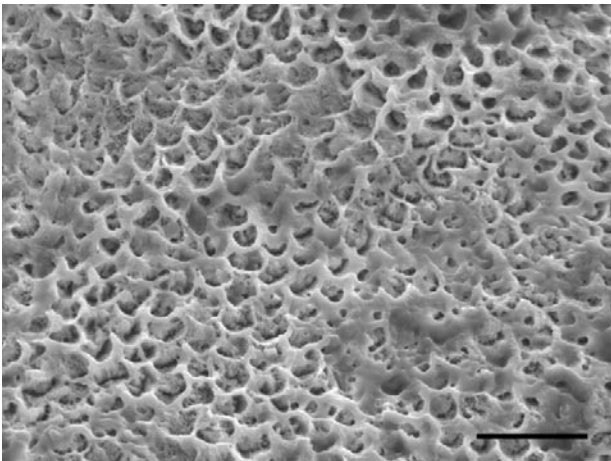


Fig. 1. Patrón tipo I, caracterizado por depresión central y márgenes prominentes. Escala, 20 μ m.

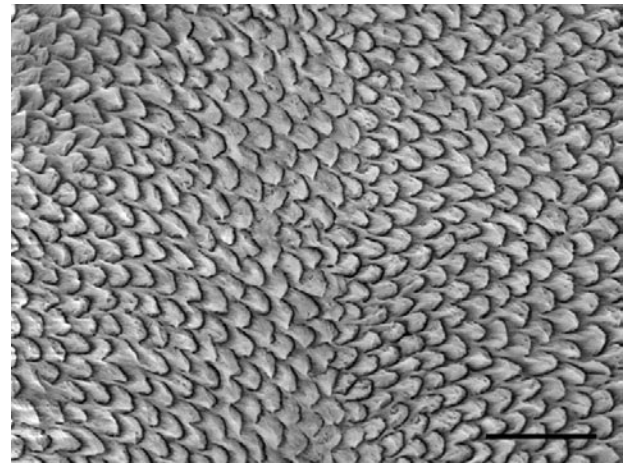


Fig. 2. Patrón tipo II, caracterizado por protusión central variable y pérdida de márgenes periféricos. Se observa la estría de Retzius en el centro de la imagen. Escala, 20 μ m.

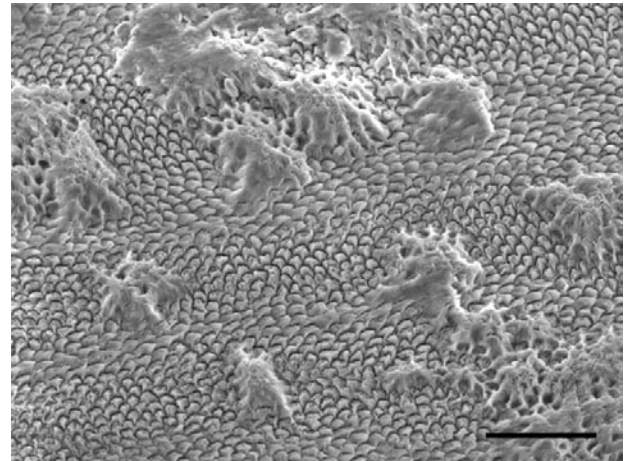


Fig. 3. Áreas o islotes de patrón tipo I insertados en extensas áreas homogéneas en las que predomina el patrón II. Escala, 50 μ m.

DISCUSION

La utilización de la microscopía electrónica de barrido y del grabado ácido ha permitido establecer en distintas especies incluida la humana, tres tipos principales de patrones de grabado I, II y III según la clásica descripción de Silverstone et al (22), así como la distribución topográfica de dichos patrones en el seno del esmalte (23). En el material utilizado en nuestro estudio correspondiente a amelogenesis imperfecta hipomineralizada es posible constatar la existencia de dos tipos de patrones el I y el II sin que hayamos podido constatar la existencia del patrón III descrito también en la amelogenesis imperfecta hipomineralizada por Seow y Amaratunge (7). Es importante destacar a este respecto que el tiempo de grabado utilizado por estos autores es de 1 minuto lo que supera el tiempo terapéutico que nunca debe alcanzar los 30 s. y que en ningún caso se ha alcanzado en el presente estudio. El hecho de que en nuestro material aparezcan islotes o áreas de patrón I en el seno de áreas tipo II avala en nuestra opinión la existencia de alteraciones en el desarrollo de los prismas, a diferencia de lo que indican

autores como Seow y Amaratunge (7) y Wright et al (11). Estos autores sugieren que la observación de los tres patrones, tras la aplicación del grabado, indicaría una estructura normal de los prismas. La presencia de los islotes que describimos indica una alteración en la típica distribución de los patrones establecidos en los controles y en estudios previos (7-10). En dichos estudios nuestro grupo ha demostrado que los prismas del esmalte ofrecen patrones paralelos y en decusación, estos últimos menos frecuentes, y que con independencia de la distribución arquitectural algunos prismas ofrecen un patrón estructural filamentos. Los niveles de calcio detectados en nuestros estudios con microscopía electrónica analítica cuantitativa ponen de relieve que no existen diferencias significativas sobre los efectos del grabado ácido en las muestras control y en las muestras con amelogenesis imperfecta, siendo por tanto más significativa la acción del grabado ácido sobre el patrón morfoestructural, debido a la alteración en el desarrollo de los prismas, que sobre la calcificación del esmalte. Los estudios llevados a cabo por Wright et al (24) en amelogenesis imperfecta hipomineralizada realizados solo con microscopía analítica cualitativa indicaban una disminución del contenido mineral que nuestros estudios con microscopía analítica cuantitativa no confirman. Los resultados microanalíticos obtenidos deben ponerse asimismo en relación con la revisión que en el momento presente se lleva a cabo sobre el proceso de mineralización que se desarrolla, tanto en esmalte como en dentina, en las distintas variedades clínicas de amelogenesis imperfecta y que parecen conducir a un replanteamiento de la clasificación clínica clásica de esta entidad nosológica (19, 25).

La consecuencia, por último, más significativa para los profesionales de la odontología que se deriva del presente trabajo es la posible incidencia de los cambios descritos en los programas de restauración terapéutica de dientes con amelogenesis que utilizan la técnica del grabado ácido como fase acondicionante preliminar. El conocimiento de los patrones existentes en las distintas variedades de amelogenesis puede ayudar en este sentido, aparte de las especiales características que poseen los dientes con amelogenesis, a superar la alta incidencia de fracaso que existe en las restauraciones terapéuticas sustentadas en la adhesión que se llevan a cabo en este tipo de piezas dentarias (7).

BIBLIOGRAFIA

1. Boyde A, Jones SJ, Reynolds PS. Quantitative and qualitative studies of enamel etching with acid and EDTA. *Scanning Electron Microsc* 1978;II:991-1002.
2. Martin LB, Boyde A, Grine FE. Enamel structure in primates: A review of scanning electron microscope studies. *Scann Microsc* 1988;2:1503-26.
3. Retief DH. Effect of conditioning the enamel surface with phosphoric acid. *J Dent Res* 1973;52:333-41.
4. Dong J, Gu TT, Simmons D, Mac Dougall M. Enamel maps to human chromosome 4q21 within the autosomal dominant amelogenesis imperfecta locus. *Eur J Oral Sci* 2000;108:353-8.
5. Wright JT, Butler WT. Alteration of enamel proteins in hypomaturation amelogenesis imperfecta. *J Dent Res* 1989;68:1328-30.
6. Seow WK. Clinical diagnosis and management strategies of amelogenesis imperfecta variants. *Pediatr Dent* 1993;15:384-93.
7. Seow WK, Amaratunge FA. The effects of acid-etching on enamel from different clinical variants of amelogenesis imperfecta: an SEM study. *Pediatr Dent* 1998;20:37-42.

8. Sánchez-Quevedo MC, Ceballos G, García JM, Gómez de Ferraris MEG, Rodríguez IA, Campos A. Quantitative analytical electron microscopy of calcium in hypomineralized amelogenesis imperfecta. *Scanning* 23:2001;152-3.
9. Sánchez-Quevedo MC, Ceballos G, Rodríguez IA, García JM, Campos A. Quantitative X-ray microanalytical and histochemical patterns of calcium and phosphorus in enamel in human amelogenesis imperfecta. *International Journal of Developmental Biology* 2001;45:115-6.
10. Sánchez-Quevedo MC, Ceballos G, García JM, Rodríguez IA, Gómez de Ferraris MEG, Campos A. Scanning electron microscopy and calcification in amelogenesis imperfecta in anterior and posterior human teeth. *Histol Histopathol* 2001;16:827-32.
11. Wright JT, Duggal MS, Robinson C, Kirkham J, Shore A. The mineral composition and enamel ultrastructure of hypocalcified amelogenesis imperfecta. *J Craniofac Genet Dev Biol* 1993;13:117-26.
12. Zambrano M, Nikitakis NG, Sánchez-Quevedo MC, Rivera H. Oral and dental manifestations of vitamin D-dependent rickets type I: Report of a pediatric case. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol and Endodontics* 2003;95:705-9.
13. Ceballos A, Ceballos G. Estudio de una familia con amelogenesis imperfecta. *Avances en Odontostomatología* 1988;4 (3):125-8.
14. Campos A, Rodríguez IA, Sánchez-Quevedo MC, García JM, Nieto-Albano OH, Gómez de Ferraris ME. Mineralization of human premolar occlusal fissures A quantitative histochemical microanalysis. *Histol Histopathol* 2000;15:499-502.
15. Sánchez-Quevedo MC, Nieto-Albano OH, García JM, Gómez de Ferraris ME, Campos A. Electron probe microanalysis of permanent human enamel and dentine. A methodological and quantitative study. *Histol Histopathol* 1998;13: 109-13.
16. Statham PJ, Pawley JB. A new method for particle X-ray microanalysis on peak to background measurements. *Scanning Electron Microsc* 1978;1:469-78.
17. Small JA, Heinrich KFJ, Newbury DE, Myklebust RL. Progress in the development of the peak-to-background method for the quantitative analysis of single particles with the electron probe. *Scanning Electron Microsc* 1979;II:807-16.
18. López-Escámez JA, Campos A. Standards for X-ray microanalysis of calcified structures. *Scanning Electron Microsc* 1994; 8:171-85.
19. Sánchez-Quevedo MC, Ceballos G, García JM, Luna JD, Rodríguez IA, Campos A. Dentine structure and mineralization in hypocalcified amelogenesis imperfecta: a quantitative X-ray histochemical study. *Oral Diseases* 2004;10: 94-8.
20. Warley A. Quantitative X-ray microanalysis of thin sections in biology: appraisal and interpretation of results. En: Sigeo DC, Morgan AJ, Sumner AT, Warley A, eds. *X-ray microanalysis in biology. Experimental techniques and applications*. Cambridge: Cambridge University Press; 1993. p. 47-57.
21. Warley A. *X-ray microanalysis for biologists*. London: Portland Press. 1997
22. Silverstone LM, Saxton CA, Dogon IL, Fejerskov O. Variation in the pattern of acid etching on human dental enamel examined by scanning electron microscopy. *Caries Res* 1975;9:373-87.
23. Risnes S. Multiplane sectioning and scanning electron microscopy as a method for studying the three-dimensional structure of mature dental enamel. *Scann Microsc* 1987;1:1893-902.
24. Wright JT, Deaton TG, Hall KI, Yamauchi M. The mineral and protein content of enamel in amelogenesis imperfecta. *Conn Tiss Res* 1995;32:247-52.
25. Aldred M, Savarirayan R, Crawford P. Amelogenesis imperfecta: a classification and catalogue for the 21st century. *Oral Diseases* 2003;9:19-23.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo ha sido parcialmente financiado por el proyecto PB97-0804 del Ministerio de Educación y Cultura y el Proyecto AECl/98/01 de la Agencia Española de Cooperación Internacional. Nuestro agradecimiento a M^a Ángeles Robles por su competente asistencia técnica.