

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Grado en Odontología

ANÁLISIS EXPERIMENTAL DE DIFERENTES TÉCNICAS Y MÉTODOS PARA LA OBTENCIÓN DE CORTES EN PIEZAS DENTARIAS

Madrid, curso 2022/2023

Número identificativo: 6

RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

Introducción: Las investigaciones sobre las propiedades dentales son esenciales, para ello, es necesario la obtención de cortes histológicos. En la actualidad, no existe un protocolo estandarizado para la obtención de éstos. **Objetivos:** El propósito de este estudio fue realizar una comparación entre dos protocolos para la obtención de cortes histológicos, siendo la criosección una técnica innovadora dentro del campo de la odontología y la técnica de desgaste una técnica contrastada. Se determinó adicionalmente la calidad tanto en las estructuras observadas en ambos protocolos como en la tinción en la técnica del criostato. **Materiales y métodos:** En el método de la criosección (n=16), se dividieron las muestras en cuatro grupos según la variación del protocolo. Todas las muestras fueron fijadas en formol al 10% a excepción de una muestra de cada grupo. Se descalcificaron con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), siendo supervisado bajo control radiográfico. Se embebieron en Optimal Cutting Temperature Compound (OCT). Se utiliza el mismo fijador en el método de desgaste (n=15). Se incluyeron las muestras en escayola tipo IV y se procedió a su corte con una pieza de mano. Se terminó de reducir el grosor mediante piedras abrasivas. **Resultados:** No existen diferencias significativas en el perímetro para ninguno de los cuatro grupos ($p > 0,05$). Se obtienen diferencias significativas en la densidad de los grupos con el control. Se observan adecuadamente las estructuras principales dentales (esmalte, dentina, pulpa y cemento) con la técnica de desgaste y con la criosección, a excepción del esmalte en esta última. La tinción histológica es satisfactoria. **Conclusiones:** Tanto el método de desgaste como la criosección pueden ser utilizados para la obtención de cortes histológicos, obteniendo resultados favorables en ambos casos.

Palabras clave: Odontología, histología, criosección, descalcificación, desgaste.

ABSTRACT AND KEYWORDS

Introduction: Investigations on dental properties are essential, for this reason, it is necessary to obtain histological sections of teeth. Currently, there is no standardized protocol for obtaining histological sections. **Objectives:** The purpose of this study was to make a comparison between two protocols for obtaining histological sections, one being cryosection which is an innovative technique in the field of dentistry and the other being the method for obtaining ground sections of teeth which is a contrasted technique. The quality of the structures observed in both protocols and the histological staining in the cryostat technique was also determined. **Materials and methods:** In the cryosection method (n=16), the samples were divided into four groups according to variations in the protocol. All samples were fixed in 10% formalin except for one sample from each group (n=15). The samples were decalcified with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), supervised under radiographic control. They were embedded in Optimal Cutting Temperature Compound (OCT). The same fixative is used in the method for obtaining ground sections of teeth. The specimens were embedded in type IV plaster and cut with a handpiece. The reduction of the thickness is completed with abrasive stones. **Results:** There are no significant differences in the perimeter for any of the four groups ($p > 0.05$). There were significant differences in density for all four groups. The main dental structures (enamel, dentin, pulp and cementum) are adequately observed with the ground section and with cryosection, with the exception of enamel in the latter. Histological staining is satisfactory. **Conclusions:** The cryosection method and the method for obtaining ground sections of teeth can be used to obtain histological sections, obtaining favorable results in both cases.

Keywords: Dentistry, histology, cryosection, decalcification, ground section.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	7
1.1 Estructuras dentarias	7
1.1.1 <i>Esmalte</i>	7
1.1.2 <i>Dentina</i>	9
1.1.3 <i>Cemento</i>	10
1.1.4 <i>Pulpa</i>	12
1.2. Fundamentos histológicos: motivo de su uso	14
1.2.1 <i>Fijación:</i>	14
1.2.2 <i>Descalcificación:</i>	15
1.2.3 <i>Deshidratación e inclusión:</i>	16
1.2.4 <i>Microtomía:</i>	16
1.2.5 <i>Tinción</i>	16
1.2.6 <i>Método de desgaste:</i>	17
2. OBJETIVOS	18
3.MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1 Muestras calcificadas	19
3.2 Protocolo de descalcificación	19
3.2.1 <i>Manipulación y nomenclatura de las muestras (Preparación de las muestras)</i>	19
3.2.2 <i>Protocolo de descalcificación: secuencia</i>	22
3.2.3 <i>Grupos creados de estudio</i>	25
3.2.4 <i>Procesado del tejido</i>	26
3.3 Protocolo de desgaste	27
3.3.1 <i>Manipulación y nomenclatura de las muestras (Preparación de las muestras)</i>	27
3.3.2 <i>Protocolo de desgaste: secuencia</i>	29
3.3.3 <i>Grupos creados de estudio</i>	30
3. RESULTADOS	31
3.1 Resultados de la descalcificación	31
3.2 Resultados del método de desgaste	34
3.2.1 <i>Esmalte</i>	34
3.2.2 <i>Dentina</i>	36
3.2.3 <i>Cemento</i>	38
3.2.3 <i>Pulpa</i>	38
3.3 Resultados de la técnica del criostato	40

5. DISCUSIÓN	43
5.1 Método de desgaste: estructuras histológicas y comparación de la técnica. ...	43
5.2 Criostato: novedad y comparación en la técnica. Estructuras histológicas.	43
5.3 Criostato y desgaste: contraste entre ambas técnicas.	46
6.CONCLUSIONES	47
7. BIBLIOGRAFÍA	47
8. ANEXOS	52

INDICE DE ABREVIATURAS

Solución tampón fosfato; phosphate-buffered saline (PBS)

Hematoxilina eosina (H&E)

Federación dental Internacional (FDI)

Línea amelocementaria (LAC)

Optimal Cutting Temperature (OCT)

Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)

Proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP)

Células madre de la pulpa dental propiamente dichas (DPSC)

Células madre de la papila apical (SCAP)

Receptores tipo Toll (TLR)

Ácido lipoteicoico (LTA)

Formol (F)

No formol (NF)

Exposición pulpar (a)

Ausencia de exposición pulpar (b)

1. INTRODUCCIÓN

La histología es una rama de la biología de gran importancia, ya que no sólo es utilizada en estudios forenses como método diagnóstico, sino también nos permite elaborar y fabricar órganos y tejidos nuevos, es decir, utilizarla con fines terapéuticos (1–3). Esta ciencia surge a principios del siglo XIX al fusionarse la teoría celular de Schleiden y Schwann y la anatomía general de Bichat. Su desarrollo ha permitido poder estudiar la estructura de los tejidos y órganos a nivel microscópico que constituyen el cuerpo humano (1,4).

Con respecto a la odontología, son múltiples los autores que han contribuido al conocimiento de la histología bucodental, tales como Von Ebner, Retzius, Tomes, entre otros. Estos autores han sido relevantes en el crecimiento de la disciplina en la odontología, tal es así que dan nombre a las diferentes estructuras del órgano dentario (5).

1.1 Estructuras dentarias

1.1.1 Esmalte

Es el tejido más mineralizado del cuerpo; contiene un 96% de hidroxiapatita cálcica, organizada en prismas. Los espacios que limitan los prismas, contienen cristales de esmalte (6,7). Se pueden observar distintas estructuras histológicas debido a la forma de la incorporación de los iones minerales, siendo un ejemplo, las denominadas líneas de contorno o **estrías de Retzius** (Figura 1) que se extienden desde la **unión amelodentinaria**, que relaciona el esmalte y la dentina, hacia la superficie dentaria, evidencia del crecimiento acompasado del esmalte. Los espacios entre una línea y otra indican la periodicidad de estas (8). En concreto podemos observar la **línea neonatal**, una estría irregular de Retzius agrandada que separa el esmalte prenatal del posnatal. Se puede encontrar en todos los dientes temporales y en el primer molar permanente.

Este hallazgo es de vital importancia en estudios arqueológicos, ya que nos permite calcular la edad de defunción en personas cuyos dientes aún estén en crecimiento (9).

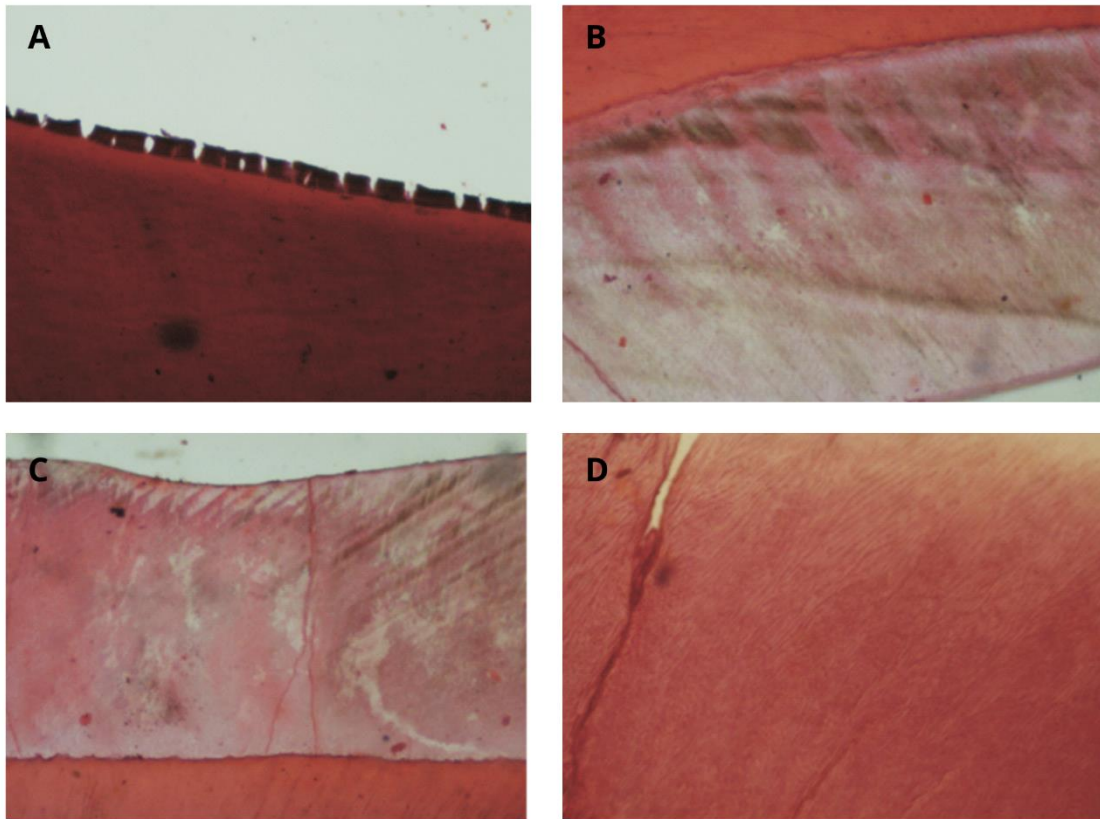


Figura 1. Imágenes de microscopía de campo claro. Cortes histológicos obtenidos por técnica de desgaste mediante descalcificación parcial y teñidos con Hematoxilina y Eosina. A) Laminillas y penachos del esmalte. B) Bandas de Hunter-Schreger; estas son oscuras y claras. C) Estrías de Retzius de color parduzco. D) Nudos del esmalte en la que se aprecia la relación de los prismas entre sí (10).

Adicionalmente, encontramos los penachos adamantinos o de Linderer (Figura 2) que se observan como sombras, debido a que las proyecciones de las fisuras se proyectan en un solo plano. Los penachos de Linderer se observan como múltiples fisuras de menor longitud, pero de mayor grosor con aspecto de arboleda en sentido vertical. También podemos observar las bandas de Hunter-Schreger (ver Figura 1), que se disponen más concentradas en aquellos dientes sometidos a una mayor carga oclusal. Las células secretoras del esmalte se conocen como ameloblastos, que se deterioran cuando el esmalte ha terminado de formarse (6,11,12).

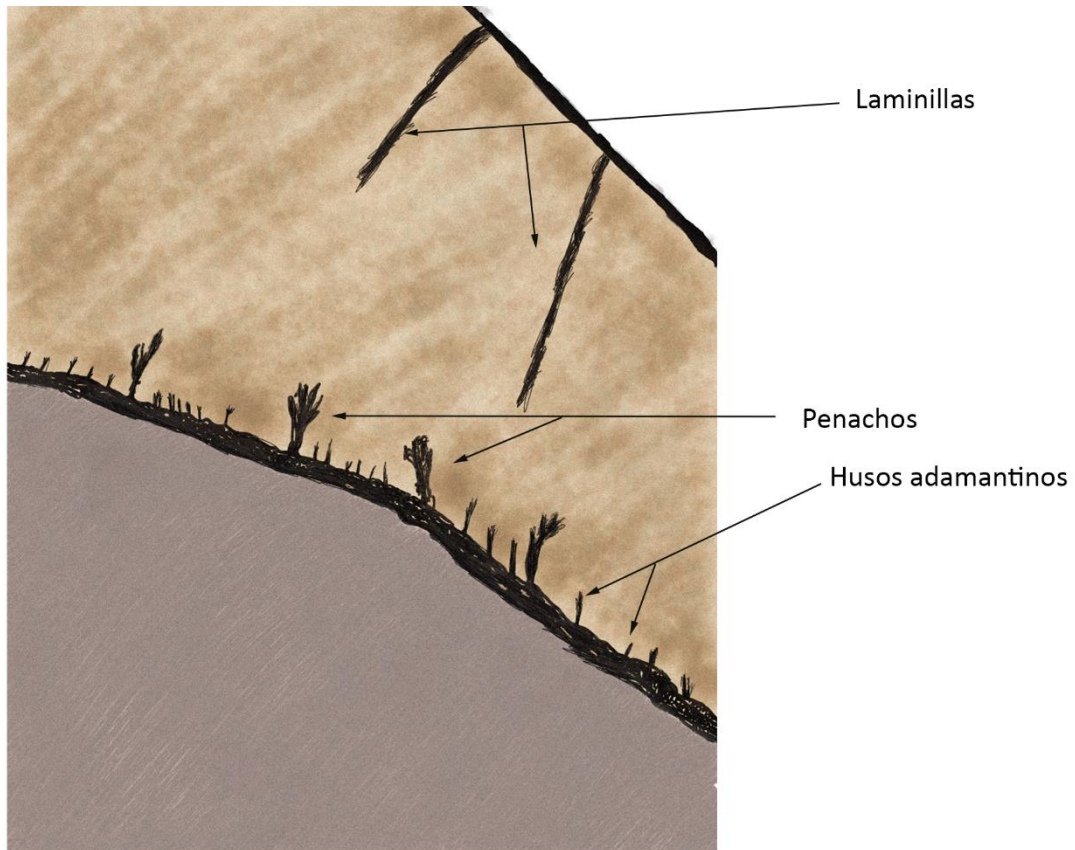


Figura 2. Dibujo ilustrativo de una sección de esmalte obtenida por técnica de desgaste. Se observa una laminilla con aspecto de fisura. La línea amelodentinaria delimita el esmalte de la dentina de forma horizontal, presentándose como múltiples líneas negras entrelazadas. Elaboración propia.

1.1.2 Dentina

Es el tejido mineralizado que configura la estructura dental en mayor proporción. Podemos los túbulos dentinarios que albergan las proyecciones de los odontoblastos, encargados de secretar la dentina y la matriz mineralizada (6,12) (Figura 3).

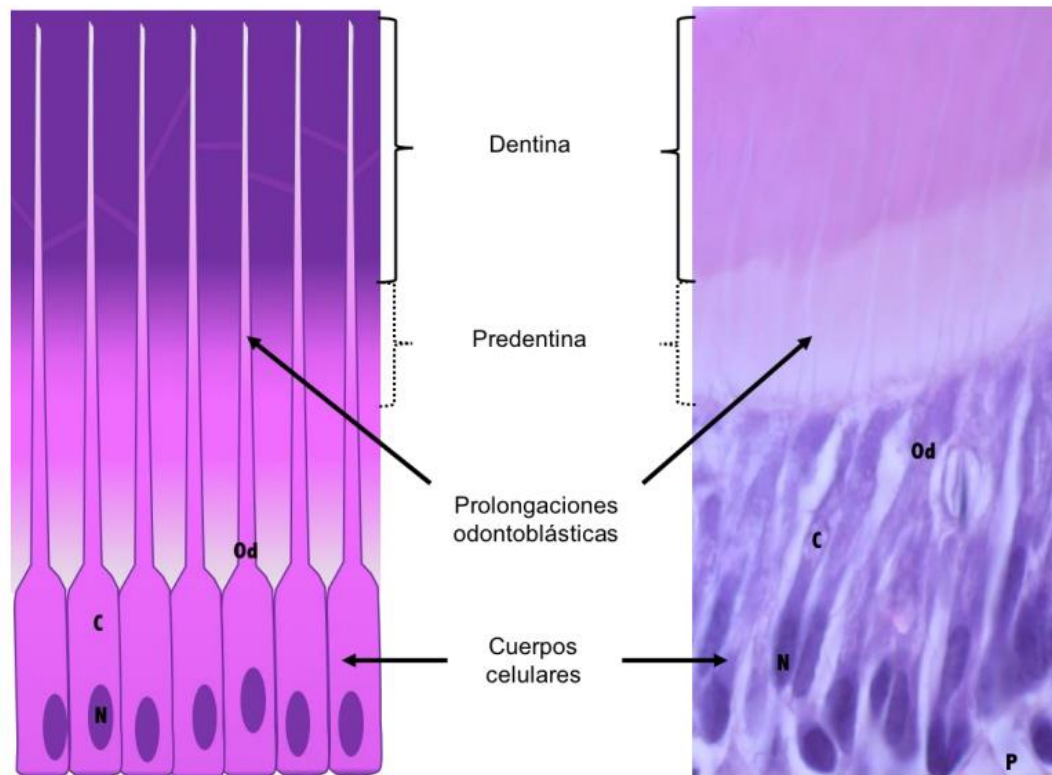


Figura 3: Contraste entre dibujo ilustrativo y corte histológico teñido con hematoxilina eosina del odontoblasto (**Od**). Presentan una forma columnar con núcleo (N) y citoplasma (C). Estos se encuentran en la periferia pulpar (P) y extienden sus prolongaciones hacia la matriz mineralizada separados por la predentina, que se puede observar de una tonalidad morada más clara en comparación con la dentina (13).

Se pueden observar líneas de crecimiento, conocidas como líneas incrementales de Von Ebner y líneas de Owen, que delimitan periodos temporales concretos del crecimiento (1,14). Encontramos también la capa granulosa de Tomes delimitando el cemento, que recibe este nombre debido a que los extremos de los túbulos dentinarios confieren el aspecto de gránulos además de una coloración oscura (15).

1.1.3 Cemento

Se encuentra recubriendo la dentina en la parte radicular. Se compone principalmente de fibras colágenas e hidroxiapatita. Los cementoblastos se encargan de sintetizar las fibras colágenas intrínsecas y los elementos de la matriz extracelular (16). En el desarrollo radicular, las fibras de cemento y dentina se entremezclan, formando la unión cementodentinaria (8). Podemos encontrar dos tipos principales de cemento; el acelular y el celular.

En el cemento acelular las fibras colágenas principales forman un elemento continuo con el ligamento periodontal en ausencia de células debido al retroceso y secreción lenta de los cementoblastos, que evitan que éstas se queden dentro del tejido. Este cemento es formado antes de la erupción dentaria. Una vez la cementogénesis se dirige apicalmente se observa la aparición de unos cementoblastos distintos, responsables del incremento en la velocidad de deposición y de la formación de las fibras colágenas. Estos cementoblastos se quedan atrapados, conociéndose como cementocitos (1,17) (Figura 4).

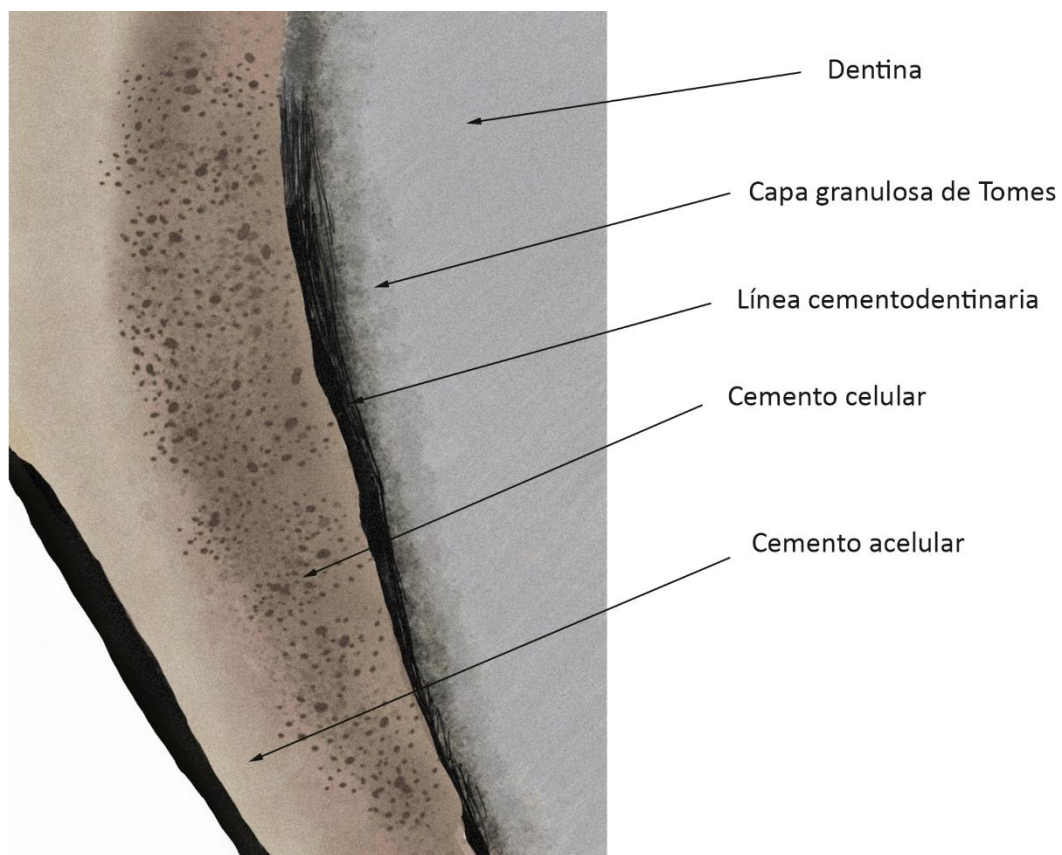


Figura 4: Dibujo ilustrativo de una sección de cemento obtenida por técnica de desgaste. Disposición del cemento acelular (externo) y el cemento celular (interno) separado de la dentina por unión cementodentinaria. Apreciación de la capa granulosa de Tomes (1).

Por otra parte, están presentes las líneas incrementales que, en el ámbito forense, se utilizan como método de identificación de sujetos (18,19) (Figura 5).

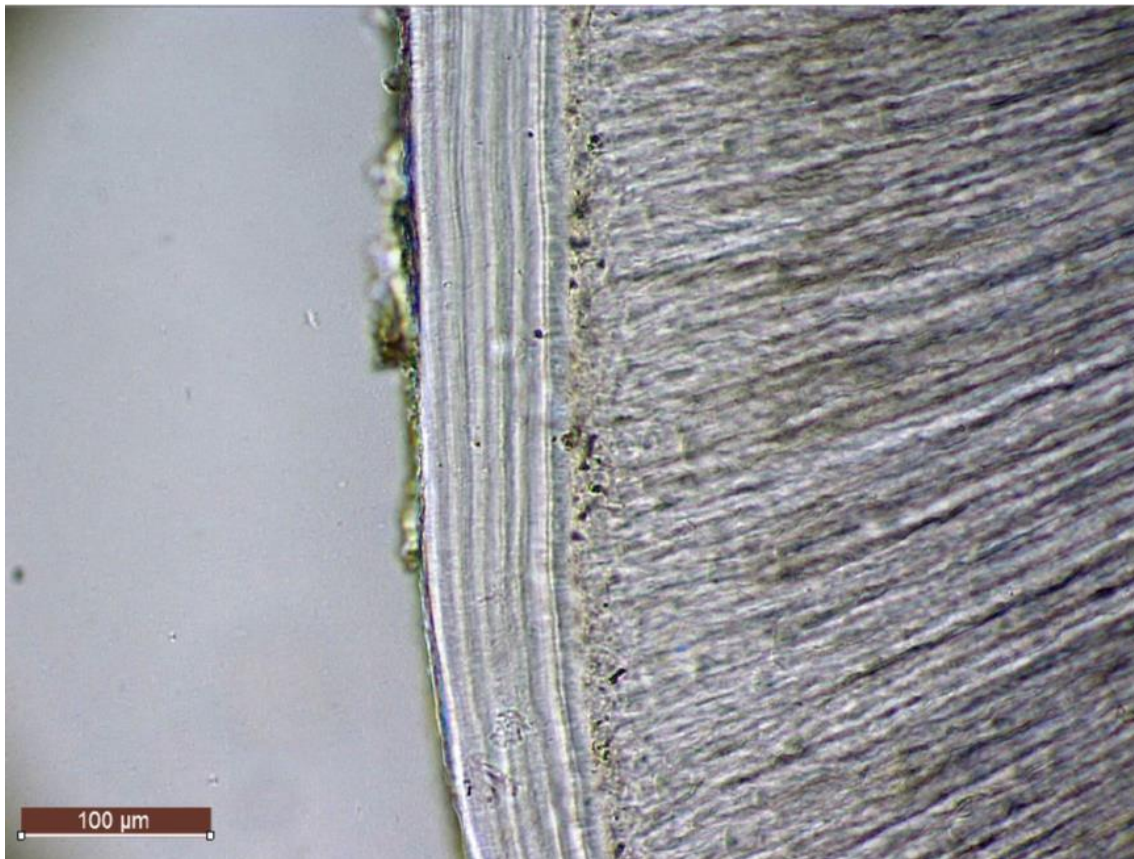


Figura 5. Fotografía de una sección transversal dental que enseña las líneas incrementales bajo microscopía de campo claro. Las líneas alternas delimitan periodos rítmicos de crecimiento (17)

1.1.4 Pulpa

Tejido conjuntivo laxo con gran inervación y vascularización conformada por múltiples elementos. Encontramos los odontoblastos mencionados anteriormente adyacentes a la predentina. Éstos, además de la secreción de dentina, se ocupan de la función defensiva; presentan receptores que reconocen patógenos (virus, hongos, bacterias) (13) y están capacitados para atraer células inmunitarias (8). En concreto, los receptores tipo Toll (TLR) tienen la capacidad de reconocer uno de los componentes de las paredes celulares de las bacterias Gram positivas, siendo este el ácido lipoteicoico (LTA). Adicionalmente, están dotados de receptores iónicos que les permiten captar estímulos biomecánicos y térmicos (13).

Asimismo, hallamos los fibroblastos, que secretan los precursores de las fibras pulpareas (reticulares, colágenas y elásticas) y a su vez la secreción de factores angiogénicos que

participan en la inflamación y en la curación. La pulpa también está constituida por macrófagos, que pueden localizarse fijos o libres y células dendríticas que se encuentran formando un retículo, principalmente a lo largo de los vasos formando parte de la respuesta inmunológica primaria (1,8,20).

Por último, encontramos las células madre pulpaes, que podemos dividir en dos tipos; las células madre de la pulpa dental propiamente dichas (DPSC) y las células madre de la papila apical (SCAP). El primer tipo se asemeja morfológicamente a los fibroblastos, el segundo tipo presenta una supervivencia elevada en casos de necrosis pulpar debido a su localización cercana al foramen apical. En este último, se encuentran marcadores que codifican proteínas reguladoras de la apoptosis, como la *survivina* (1).

La apoptosis es la forma primaria de muerte programada celular dependiente de cisteína proteasas, que son enzimas capaces de desintegrar las células de una manera controlada. Las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP) son capaces de inhibir esta muerte celular, siendo la *survivina* la proteína más pequeña de las ocho presentes en humanos. También es conocida como BIRC5. Se está estudiando su uso como diana terapéutica en el campo de la oncología (21).

En la pulpa podemos distinguir cuatro zonas principales (Figura 6):

- la **zona odontoblástica** en la periferia pulpar,
- la **zona basal de Weil**,
- una **zona rica en células** y la zona central de la pulpa en la se disponen las terminaciones nerviosas y
- los vasos sanguíneos primordiales (11,12).

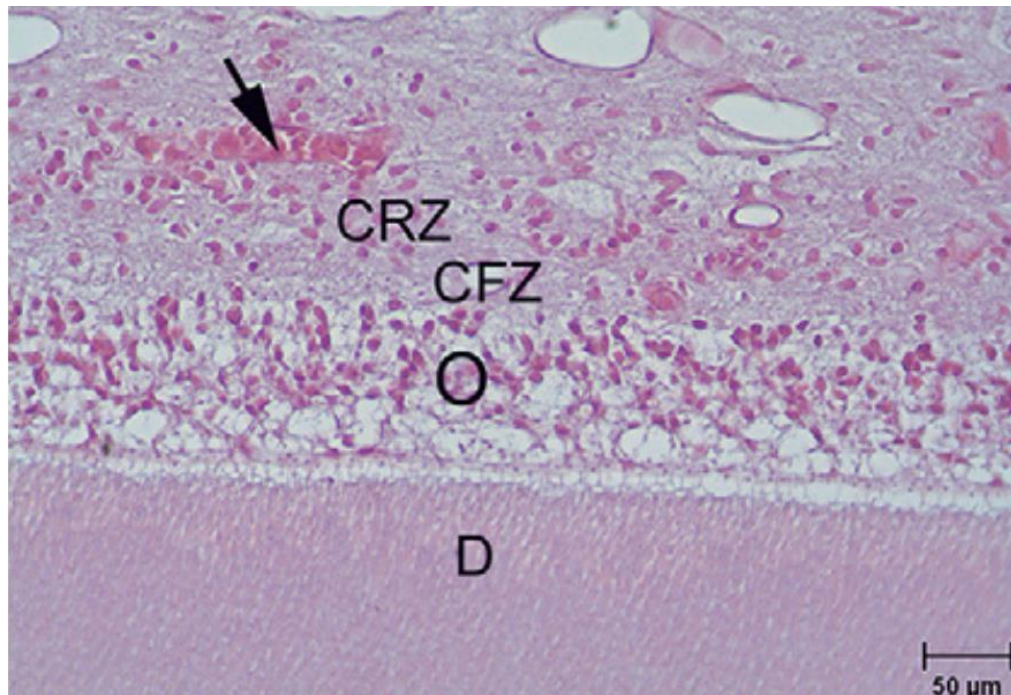


Figura 6: Pulpa teñida con hematoxilina eosina. Se indican las distintas zonas principales de la pulpa, dentina (D), odontoblastos (O), la zona basal de Weil (cfz; cell-free zone) y la zona rica en células (crz; cell-rich zone). La flecha indica vasos sanguíneos (22).

1.2. Fundamentos histológicos: motivo de su uso

1.2.1 Fijación:

Cuando los tejidos son extraídos del cuerpo, comienzan a degradarse, debido a la autólisis. Para ello, se estabilizan las proteínas de los tejidos, evitando los cambios en éstos y su consiguiente deterioro mediante la fijación. Existen varias formas de fijar un tejido, se puede lograr mediante métodos químicos con soluciones fijadoras, o de manera física utilizando calor, microondas o frío, conocido este último también como criofijación. Es importante utilizar crioprotectores, tal como la sacarosa, si se va a utilizar este método, ya que reduce la formación de cristales en la muestra (23,23,24).

En cuanto a las soluciones fijadoras, hay 4 grupos principales: los aldehídos, los oxidantes, fijadores de base alcohólica y los que pertenecen al grupo metálico (25). El formaldehído es uno de los fijadores más comúnmente utilizados. Como su nombre indica, pertenece al grupo de los aldehídos. Provoca que las proteínas se entrelacen mediante puentes de metileno, confiriéndole al tejido resistencia mecánica. También

impide la autólisis mediante la inhibición de la actividad de algunas enzimas. Su acción permite cierta reversibilidad, si se suministra agua abundantemente durante las primeras 24 horas.

Existen varios factores que pueden alterar la fijación: el tiempo de ésta, el tamaño de la muestra, la temperatura del fijador, la penetración del fijador, entre otros (4,19).

1.2.2 Descalcificación:

Los tejidos altamente mineralizados deben pasar por una descalcificación previa a la inclusión para poder procesarse correctamente. La solución descalcificadora se elige en función de las técnicas de tinción que se van a realizar a posteriori, la velocidad de descalcificación o el grado de desmineralización necesitado (26). La solución de referencia (gold standard) es el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 10%. El EDTA se conoce como un quelante del calcio, se une al calcio de la hidroxiapatita y forma un complejo soluble no ionizado, es decir, “secuestra” los iones metálicos catiónicos de dos o tres cargas positivas, en este caso el calcio (Ca^{2+}), y hace que estos iones permanezcan en la solución, pero siendo menos reactivos. La capa de hidroxiapatita va disminuyendo según la descalcificación va progresando. Es un proceso muy lento pero que no provoca daño tisular ni deteriora la capacidad de tinción del tejido. La acción del EDTA es pH dependiente; para su función óptima debe de encontrarse en un pH de 7-7.4 (20,24,26).

Los ácidos inorgánicos fuertes también son comúnmente utilizados, especialmente el ácido nítrico. Este es de gran utilidad en biopsias de tamaño pequeño, ya que descalcifica rápidamente y permite establecer un diagnóstico en un plazo de veinticuatro horas en determinados casos. No obstante, provoca daño tisular con facilidad y es necesario monitorizarlo cuidadosamente, en consecuencia, suelen utilizarlo junto con un neutralizador para prevenir daños. Por otro lado, los ácidos débiles se comportan mejor con el tejido. Suelen tener una velocidad de descalcificación más lenta; entre uno y diez días, dependiendo del tamaño y tipo de muestra y de la concentración del ácido. El de uso más frecuente es el ácido fórmico. Ambos ácidos actúan solubilizando las sales de calcio, eliminándolo del tejido (24,26). Otras soluciones empleadas son la solución de Bouin (19) , Gooding Stewart, entre otras (26).

Se han de tener en cuenta los distintos factores que influyen en la velocidad de la descalcificación, como la concentración del agente descalcificador, la temperatura, el espesor de la muestra, la suspensión de la muestra y la agitación de la solución (24).

1.2.3 Deshidratación e inclusión:

Se deshidrata la muestra en soluciones crecientes alcohólicas, comúnmente empleando etanol. Si se realiza la infiltración con parafina se debe aclarar en solventes orgánicos como el xileno, ya que esta no es compatible con los componentes alcohólicos. La parafina es la más empleada; se trata de un tipo de hidrocarburo obtenido durante el refinamiento del petróleo. También es común utilizar resina epoxi en lugar de la parafina (15,24).

Existe un material de inclusión conocido como optimal cutting temperature (OCT) empleado para las secciones procesadas mediante el método de congelación; es un gel que contiene resinas y glicoles que son solubles en agua (4).

1.2.4 Microtomía:

Se realizan cortes finos, en el rango de micras, en el bloque solidificado de la parafina o resina epoxi con un microtomo. El que se encuentra más frecuentemente es el microtomo de rotación o de Minot, en el cual se mueve el bloque con una manivela y la cuchilla permanece totalmente fija. Si se ha procesado el tejido mediante el método de congelación, se utilizará un criostato, equivalente al microtomo (4).

1.2.5 Tinción

La tinción es necesaria para poder incrementar el contraste entre los elementos estructurales, la más comúnmente usada es la tinción de hematoxilina y eosina (H&E) (3,14,27). No obstante, existen otro tipo de tinciones, tales como la tinción de Masson, picrosirius red, (12) Von Kossa (23), entre otras.

Los colorantes ácidos como la eosina (3,14) reaccionan con los grupos amino ionizados de las proteínas, y son útiles para realizar tinciones selectivas de elementos que presenten acidofilia, como el colágeno, fibras extracelulares, entre otros. La hematoxilina no es un colorante básico exacto, necesita manipularse con un mordiente para que se relacione correctamente con el tejido. Suele utilizarse para realizar tinciones

de heterocromatina, nucleolos del núcleo, componentes citoplasmáticos, entre otros (14).

1.2.6 Método de desgaste:

Las muestras que no se van a someter a descalcificación se pueden estudiar histológicamente a través de la obtención de secciones longitudinales a espesores finos realizadas con discos de diamante a diferentes grosores y posterior desgaste con piedra Arkansas. Este método suele emplearse en muestras sin desmineralizar y no requiere tinción (1,26).

La justificación de este trabajo se basa en que no existe un protocolo estandarizado para la obtención de cortes en piezas dentarias. Adicionalmente, queremos resaltar la importancia de las investigaciones sobre las propiedades químicas, biológicas y físicas sobre las muestras dentales, ya que podemos aplicar los resultados que obtengamos en nuestra investigación en nuestra práctica clínica diaria (28), al ser de gran utilidad en las investigaciones de diversas patologías (29).

Pregunta de investigación

¿Es posible obtener cortes histológicos de piezas calcificadas (dientes) por criostato?

2. OBJETIVOS

Objetivos centrales

1. Análisis histológico de las estructuras del diente mediante técnicas contrastadas.
2. Valoración de nuevos sistemas de visualización de estructuras dentales por métodos histológicos poco o nada abordados.
3. Comparación de protocolos para obtención de cortes histológicos en dientes.
4. Análisis de la tinción histológica en preparaciones obtenidas al criostato.

Hipótesis

Ho: No es posible reproducir ni mejorar las técnicas histológicas para la obtención de muestras en tejidos calcificados.

Hi: Es posible reproducir y mejorar las técnicas histológicas para la obtención de muestras en tejidos calcificados.

3.MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente estudio se han valorado dos protocolos distintos; uno de descalcificación mediante un agente quelante del Calcio y criosección y otro mediante el método de desgaste. En ambos se introdujeron variaciones concretas en diferentes puntos y se procedió a su análisis. Como tejido a tratar se obtuvieron diferentes piezas dentales de procedencia humana.

3.1 Muestras calcificadas

Los dientes fueron obtenidos por indicaciones periodontales y/o quirúrgicas (n=72). El rango de edad comprendido de los pacientes era entre 21 y 70 años ambos inclusive. Se excluyeron los dientes cariados (n=23) y los temporales (n=9) haciendo un total de 32 muestras excluidas. Las 40 muestras restantes se distribuyeron de manera aleatoria entre ambos grupos: 20 muestras en el grupo de descalcificación y criosección (primer grupo) y 20 en el grupo de desgaste (segundo grupo) de tal manera que hubiese el mismo número de dientes anteriores y posteriores en cada grupo. En el primer grupo, se contaminaron 4 muestras, quedando finalmente n=16. En el segundo grupo durante el proceso de desgaste se fracturaron 5 muestras, resultando en n=15.

3.2 Protocolo de descalcificación y criosección

A continuación, se describe la secuencia utilizada en este protocolo.

3.2.1 Manipulación y nomenclatura de las muestras (Preparación de las muestras)

Las muestras fueron sumergidas en formol al 10% (Guinama S.L) una vez fueron recogidas. Se realizó una exposición pulpar en muestras determinadas para que el agente fijador penetrase mejor en la pulpa (Figura 7). La exposición pulpar se realizó a la altura de la línea amelocementaria (LAC), con fresas redondas de diamante de turbina. Se eligió realizar la apertura con una fresa 018 (Komet Dental) y una 012 (Dentalclin S.L) con una turbina (Kavo Dental).

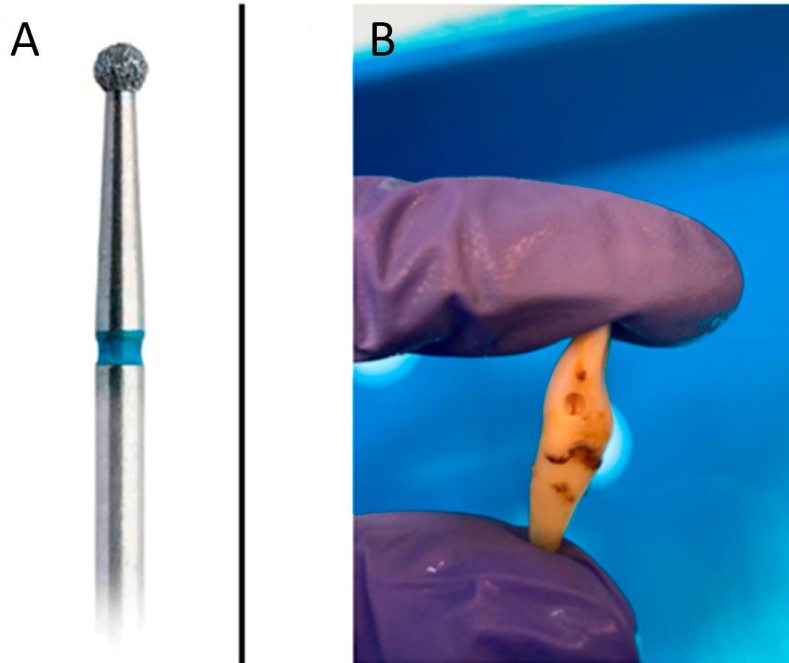


Figura 7. Exposición pulpar. A) Fresa 018 utilizada para la intervención de la muestra (imagen modificada de henryschein.es) B) Muestra 0009-21a con apertura en la cara mesial de la corona (foto propia). Se observa la cavidad pulpar a través del orificio procurado.

Se estableció una nomenclatura para facilitar la manipulación de las muestras, en la cual los primeros dígitos corresponden al número de obtención de muestra y los dígitos que están detrás del guion corresponden al número de la pieza dentaria según la Federación Dental Internacional (FDI), la cual indica el sector, el grupo y el cuadrante dentario, (Tabla 1). A su vez, la letra “a” indica la realización de la exposición pulpar, mientras que la “b” señala la ausencia de ésta. Se incluye adicionalmente la nomenclatura por nombre y ubicación en contraste a la de la FDI.

Tabla 1. Nomenclatura de las muestras dentarias empleadas en el protocolo de descalcificación

Nombre de la muestra	Número de obtención	Grupo dentario	Sector	Cuadrante	Nomenclatura según la FDI	Exposición pulpar	Nomenclatura por nombre y ubicación
0001-12b	001	Incisivo	Anterior	1	12	No	Incisivo lateral superior derecho
0002-21b	002	Incisivo	Anterior	2	21	No	Incisivo central superior izquierdo
0003-14b	03	Premolar	Posterior	1	14	No	Primer premolar superior derecho
0004-28b	04	Molar	Posterior	2	28	No	Tercer molar superior izquierdo
0005-48b	05	Molar	Posterior	4	48	No	Tercer molar inferior derecho
0006-31 ^a	06	Incisivo	Anterior	3	31	Si	Incisivo central inferior izquierdo
0007-32 ^a	07	Incisivo	Anterior	3	32	Si	Incisivo lateral inferior izquierdo
0008-33b	08	Canino	Anterior	3	33	No	Canino inferior izquierdo
0009-21 ^a	09	Incisivo	Anterior	3	21	Si	Incisivo central superior izquierdo
0010-22 ^a	10	Incisivo	Anterior	3	22	Si	Incisivo lateral superior izquierdo
0011-22 ^a	11	Incisivo	Anterior	1	22	Si	Incisivo lateral superior izquierdo
0016-14b	16	Premolar	Posterior	4	14	No	Primer premolar superior derecho
0018-46b	18	Molar	Posterior	4	46	No	Primer molar inferior derecho
0023-44b	23	Premolar	Posterior	4	44	No	Primer premolar inferior derecho
0033-12b	33	Incisivo	Anterior	1	12	No	Incisivo lateral superior derecho
0024-37b	24	Molar	Posterior	3	37	No	Segundo molar inferior izquierdo

3.2.2 Protocolo de descalcificación: secuencia

Consiste en solubilizar los iones de calcio del esmalte, disminuyendo la capa de hidroxiapatita del diente, lo que facilita el corte del tejido. Es necesario fijar la muestra previamente para evitar su deterioro. En este protocolo, se hizo el uso del criostato, el cual permite conseguir secciones finas en el rango de micras de tejido congelado, por tanto, fue necesario el uso de un crioprotector y la inclusión en un material compatible. La secuencia ordenada fue la siguiente:

1-Fijación. Como se mencionó previamente se utilizó formol al 10%. Los dientes permanecieron un mínimo de 7 días en el fijador.

2- Lavado en Tampón fosfato Salino (PBS), con el fin de retirar los restos del fijador. Contiene 2.7 mM de cloruro de potasio, 137 mM de cloruro de sodio, y 10mM de tampón fosfato (VWR Chemicals). Se preparó mezclando en un agitador magnético utilizando 10 tabletas de PBS y agua destilada en un vaso de precipitado.

3-Crioprotección. Inmersión en sacarosa (VWR Chemicals) para la eliminación del agua presente en el tejido. Se realizaron inmersiones seriadas con sacarosas al 20%, 30% y 40%.

4- Método radiográfico. Se realizaron radiografías tanto antes como después de la descalcificación de cada pieza dentaria comparando el grado de radiolucidez en cada momento. Estas habrán terminado de descalcificarse cuando no observemos radiopacidad de la muestra (Figura 8). Se siguió un proceso de revelado manual, similar al de las películas fotográficas, compuesto de revelado, aclarado, puesta en fijador, aclarado final y secado. Se observaron al negatoscopio.

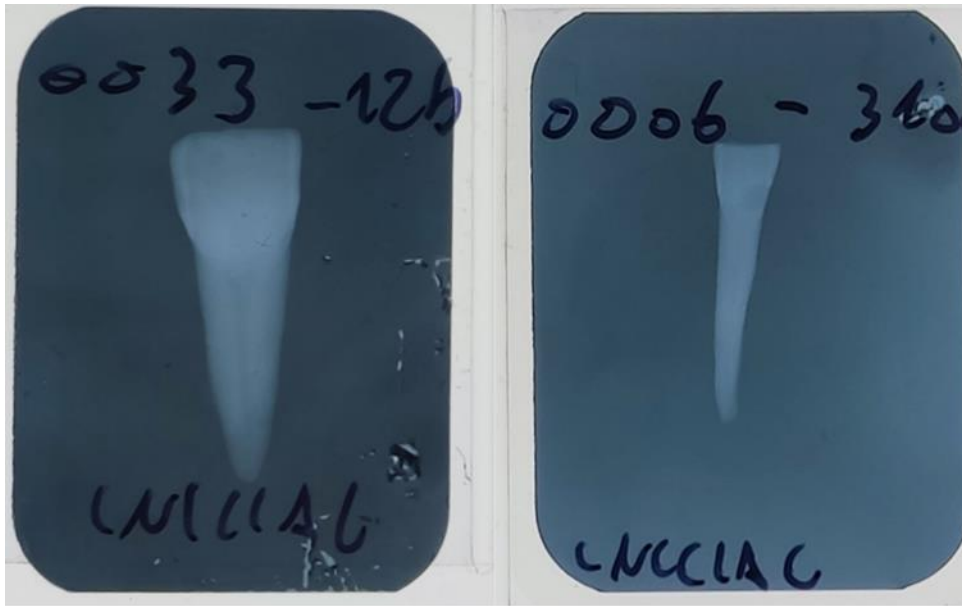


Figura 8. Radiografía de dos muestras previas al tratamiento y posterior al fresado.

5-Descalcificación. Las muestras se bañaron en unos botes con 20ml de solución de EDTA (Panreac) al 20% a pH 6-7. Al ser pH dependiente, es necesario manipular la acidez o basicidad del EDTA para conseguir que esté en su rango óptimo (Figura 10). En este caso, se encontró un pH demasiado ácido por lo que se utilizó hidróxido de sodio (NaOH) en microperlas (Panreac), ya que al tratarse de una base hace la solución más básica. Las muestras deben de encontrarse en una ratio 20:1. Se recambia el EDTA cada tres días hasta los diecisiete días, en el cual se mide el nivel de descalcificación bajo control radiográfico (ver Anexo 1).



Figura 9. Agitación del EDTA en agitador magnético. Se observa cómo se vuelve incoloro una vez ha finalizado su procesamiento.

6- Inclusión en OCT (Finetek) de las muestras en criomoldes. En una placa de Petri, se vierte un poco de OCT y se embeben las muestras por el OCT anteriormente. Todas las muestras se orientaron de igual modo en los criomoldes (Figura 11).



Figura 10. Muestras dentales listas para congelar en sus moldes. Orientación de las piezas: orificio de la exposición pulpar, izquierda; corona, superior; raíz, inferior.

7- Corte al criostato. La temperatura del bloque se fijó a 24°C, mientras que la temperatura de la cámara se fijó a 22°C. Las muestras se montan en una chincheta, creando una base previa con OCT. Se cortan las muestras en series de 10 a 35, 40, 50 y 55 micras respectivamente (Figura 11).

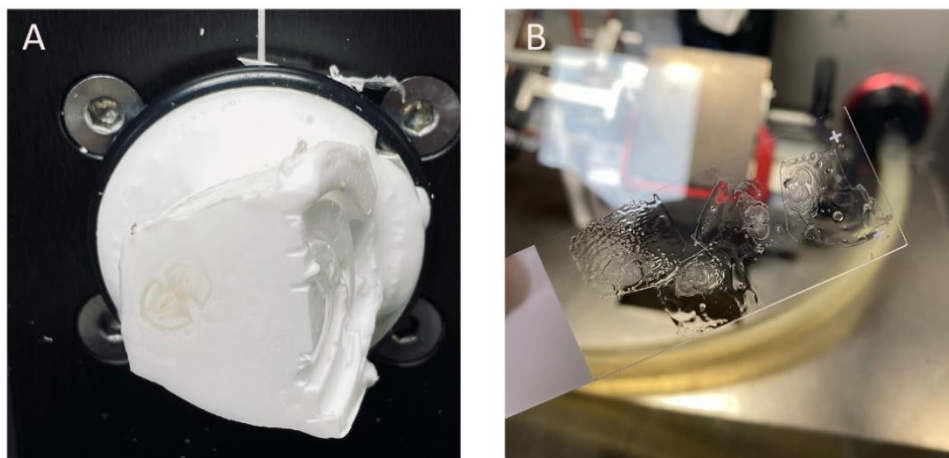


Figura 11. Proceso del criostato. A) Muestra colocada en chincheta tras su sección. B) Cortes obtenidos listos para teñir.

8.- Tinción, para una mejor observación de las estructuras. Primero, se sumerge la muestra una solución de cristal violeta y metanol (Panreac) durante cinco segundos. Seguidamente, se sumerge en eosina (Panreac) entre cinco y siete segundos y después se sumerge en un colorante basófilo (Panreac) durante diez segundos. Finalmente, se lava con agua del grifo y se deja secar (Figura 12).

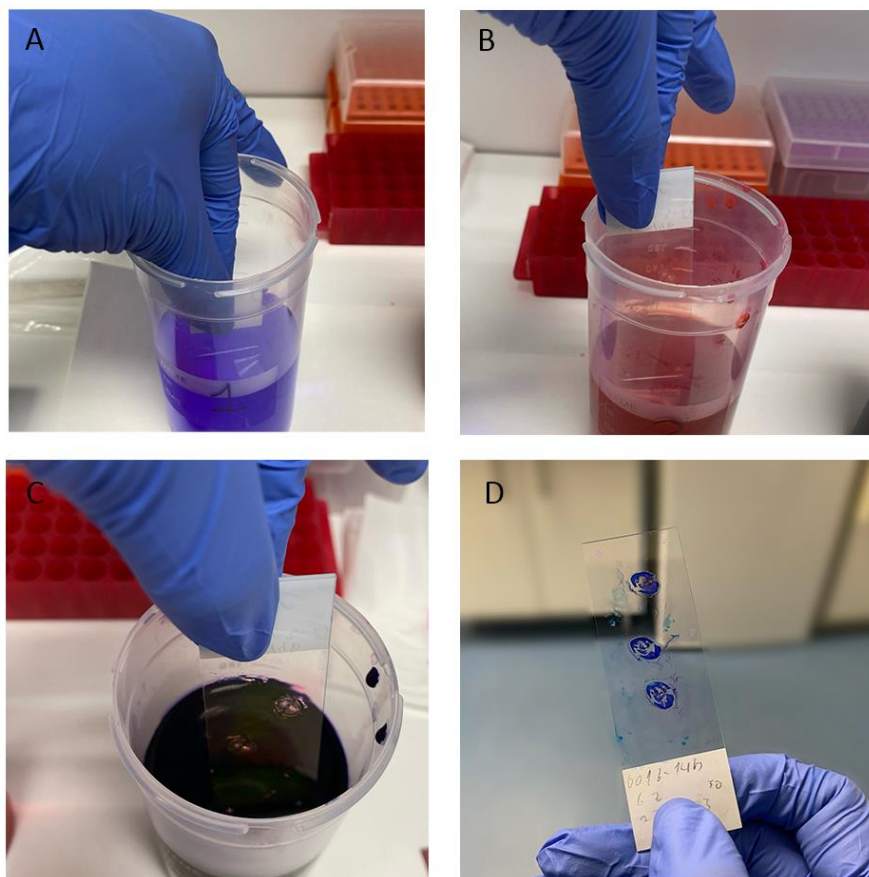


Figura 12. Proceso de tinción. A) Sumersión en cristal violeta y metanol. B) Sumersión en eosina. C) Sumersión en colorante basófilo D) Muestra lista para ser observada al microscopio

3.2.3 Grupos creados de estudio

Se realizan cuatro grupos dependiendo de las variaciones del protocolo utilizado. Cada grupo a su vez se compone de cuatro muestras en el cual se incluye al menos una muestra del grupo anterior y del grupo posterior dental (Figura 13).

- Grupo 1: 0001-21b, 0005-48b, 0009-21a, 0018-46b.
- Grupo 2: 0003-14b, 0008-33b, 0011-22a, 0016-14b.
- Grupo 3: 0002-21b, 0004-28b, 0006-31a, 00024-37b.
- Grupo 4: 0007-32a, 0010-22a, 0033-12b, 0023-44b.

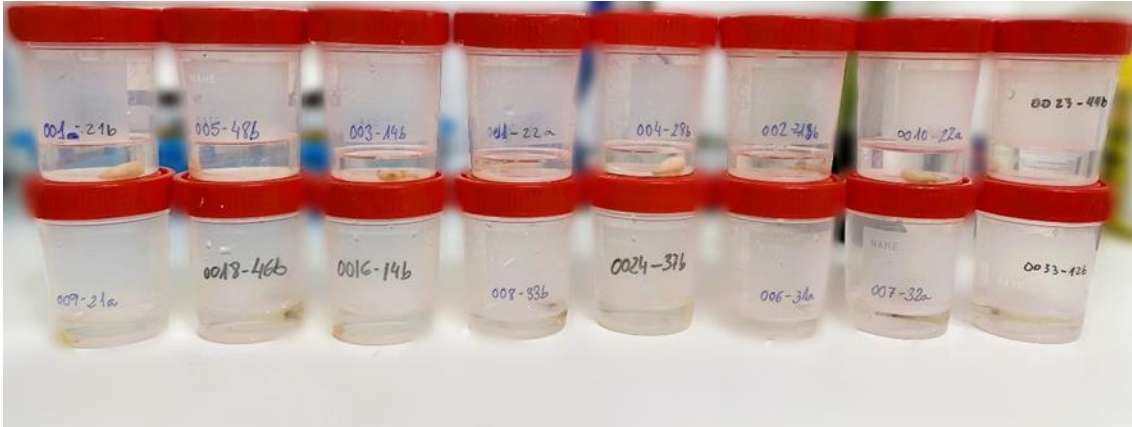


Figura 13. Muestras dentales de los grupos 1 al 4. Cada bote de la imagen contiene un único diente. El volumen utilizado del líquido descalcificador baña enteramente la muestra. Los lavados con PBS se hicieron con volumen altos al disponer de capacidad suficiente en cada vaso. El etiquetado estuvo presente tanto en el lateral del recipiente (visible en la fotografía) como en la tapa.

3.2.4 Procesado del tejido

Las muestras de todos los grupos fueron conservadas en nevera a 4°C hasta realizar la descalcificación de estas, donde fueron conservadas a temperatura ambiente. Las muestras del grupo 4 se mantuvieron constantemente en la nevera, al no realizar una descalcificación en ellas, siendo este el grupo control.

Todas las muestras fueron fijadas en formol (Guinama S.L) exceptuando una muestra de cada grupo. Se fueron realizando recambios del formol en una campana de gases (Cruma).

Los protocolos utilizados en cada grupo fueron los siguientes:

- Grupo 1: Crioprotección con sacarosa, descalcificación con EDTA, inclusión en OCT y congelación. Las muestras 0001-2b, 0005-48b y 0009-2b fueron fijadas en formol, mientras que la 0018-46b no fue fijada en éste.
- Grupo 2: Puesta en PBS, descalcificación con EDTA, inclusión en OCT y congelación. Las muestras 0003-14b, 0008-33b y 0011-22a fueron fijadas en formol mientras que la 0016-14b no fue fijada en éste.
- Grupo 3: Crioprotección con sacarosa; descalcificación con EDTA, lavado por inmersión en PBS, inclusión en OCT y congelación. Las muestras 0002-21b, 0004-28b y la 0006-31a fueron fijadas en formol mientras que la 0024-37b no fue fijada en este.

- Grupo 4: Puesta en PBS, inclusión en OCT y congelación. Las muestras 0007-32a, 0010-22a y 0033-12b fueron fijadas en formol mientras que la 0023-44b no fue fijada en este.

En todos los grupos se realizan radiografías pre y post-descalcificación. El grupo 4 se radiografía a modo de control.

En las muestras del grupo 3 se realiza un lavado por inmersión en PBS antes de embeberlas en el OCT.

Las muestras puestas en sacarosa suelen flotar, debido al contenido de agua presente en los tejidos, ya que la sacarosa se encarga de deshidratar la muestra mediante procesos de ósmosis para que no se formen cristales al llevar a cabo la congelación del tejido. Se observa que, al introducir las piezas dentarias en la sacarosa, estas no flotan y directamente se van al fondo del bote de muestra.

3.3 Protocolo de desgaste

Se explica a continuación el protocolo utilizado para la manipulación de estas muestras.

3.3.1 Manipulación y nomenclatura de las muestras (Preparación de las muestras)

Se establece la misma nomenclatura que en las muestras utilizadas en el método de descalcificación a excepción de la letra, ya que no se realizaron exposiciones pulpares en ninguna de las muestras, por tanto, esta es omitida. Se indica en su lugar si se utilizó formol en la preservación de las muestras mediante las letras “F” para indicar la utilización del formol y “NF” para indicar la no utilización de este (Tabla 2).

Tabla 2. Nomenclatura de las muestras dentarias empleadas en el protocolo de desgaste.

Nombre de la muestra	Grupo dentario	Sector	Cuadrante	Nomenclatura según la FDI	Fijación	Nomenclatura por nombre y ubicación
0025-34	Premolar	Posterior	3	34	NF	Primer premolar inferior izquierdo
0028-31	Incisivo	Anterior	3	31	NF	Incisivo central inferior izquierdo
0035-44	Premolar	Posterior	4	44	F	Primer premolar inferior derecho
0038-18	Molar	Posterior	1	18	F	Tercer molar superior derecho
0039-46	Molar	Posterior	4	46	F	Primer molar inferior derecho
0040-26	Molar	Posterior	2	26	NF	Primer molar superior izquierdo
0041-31	Incisivo	Anterior	3	31	NF	Incisivo central inferior izquierdo
0042-36	Molar	Posterior	3	36	NF	Primer molar inferior izquierdo
0043-41	Incisivo	Anterior	4	41	NF	Incisivo central inferior derecho
0044-33	Canino	Anterior	3	33	NF	Canino inferior izquierdo
0045-31	Incisivo	Anterior	3	31	NF	Incisivo central inferior izquierdo
0046-34	Premolar	Posterior	3	34	NF	Primer premolar inferior izquierdo
0047-26	Molar	Posterior	2	26	F	Primer molar superior izquierdo
0048-16	Molar	Posterior	1	16	NF	Primer molar superior derecho
0049-44	Premolar	Posterior	4	44	F	Primer premolar inferior derecho

3.3.2 Protocolo de desgaste: secuencia

Consiste en la realización de cortes finos en las muestras dentarias mediante discos de carburo de silicio y de diamante y su posterior desgaste en una piedra Arkansas o de carburo de silicio a diferentes grosores de grano para disminuir el espesor de los cortes y que estos puedan ser observados bajo el microscopio después de montarse en un medio de montaje compatible. La secuencia ordenada fue la siguiente:

- 1.- Fijación. Se utilizó formol al 10%. Los dientes permanecieron un mínimo de 24h en el fijador.
- 2.- Inclusión parcial de los dientes en bloque de escayola tipo III para crear una retención que permitiese el corte a mano alzada.
- 3.- Fijación del bloque al espacio de trabajo mediante pie de rey u otra herramienta similar para prevenir el desplazamiento de éste (Figura 14). Corte con pieza de mano (Kavo dental) con discos de carburo de silicio (Dentalclin S.L) para realizar una sección longitudinal del diente. Debe utilizarse irrigación constante para evitar la abrasión de la muestra.



Figura 14. Muestra 0025-34 lista para ser seccionada mediante pieza de mano.

4.- Reducción del grosor del corte con piedra de carburo de silicio. Debe de observarse transparencia radicular.

5.- Aclaración en xileno durante un minuto. Permite el montaje de las muestras en resinas hidrófobas además de la deshidratación de la muestra. Estas se lavan durante un minuto.

6.- Realización de sobreelevación en el portaobjetos con laca de uñas de secado rápido (Rimmel London) para sellar la interfase entre el portaobjetos y el cubreobjetos debido al grosor de las secciones

7.-Inclusión en medio de montaje resinoso con base de xileno. Se utilizó DPX (Casa Álvarez). Sellado final con laca de uñas (Rimmel London) para evitar la salida del medio de montaje (Figura 15).



Figura 15. Muestra 0049-44 lista para ser observada al microscopio. Se observa la muestra incluida en el medio de montaje y la sobreelevación y el sellado realizado con laca de uñas.

3.3.3 Grupos creados de estudio

Se crean dos grupos dependiendo de las variaciones del protocolo realizado: en un grupo, las muestras deben permanecer un mínimo de 24h en formol mientras que, en el otro grupo, las muestras no son fijadas previamente al corte realizado.

3. RESULTADOS

A continuación, se exponen los resultados obtenidos divididos en dos secciones, según el método utilizado. El programa estadístico utilizado fue el SigmaStat v12.0.

3.1 Resultados de la descalcificación

Se analizó el parámetro del perímetro con el programa ImageJ en los cuatro grupos creados. Los datos estadísticos se analizaron mediante t-Student (SigmaStat v12.0), concluyendo que no había una correlación estadísticamente significativa para ninguno de los cuatro grupos ($p > 0,05$). La gráfica muestra que el perímetro previamente a la descalcificación de las muestras es ligeramente mayor que al final de ésta (Figura 16).

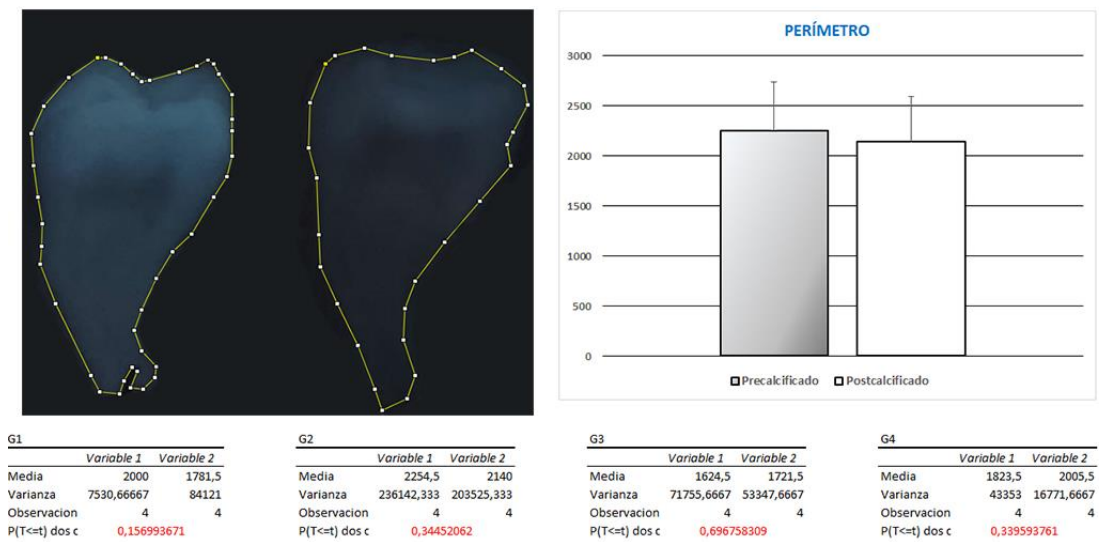


Figura 16. Gráfica representativa de los cuatro grupos. Imágenes radiográficas representando el perímetro.

Seguidamente, se analizó el parámetro de la densidad dentro de cada grupo mediante t-Student (SigmaStat v12.0). Como se esperaba, en los grupos del 1 al 3 se observó que la densidad de las muestras previa a la descalcificación era mayor que después del proceso de descalcificación. El grupo 4 no presenta diferencias al ser éste el grupo control (Figura 17), mientras que el grupo 1 es el único que presenta resultados estadísticamente significativos (a,b) respecto al resto de grupos.

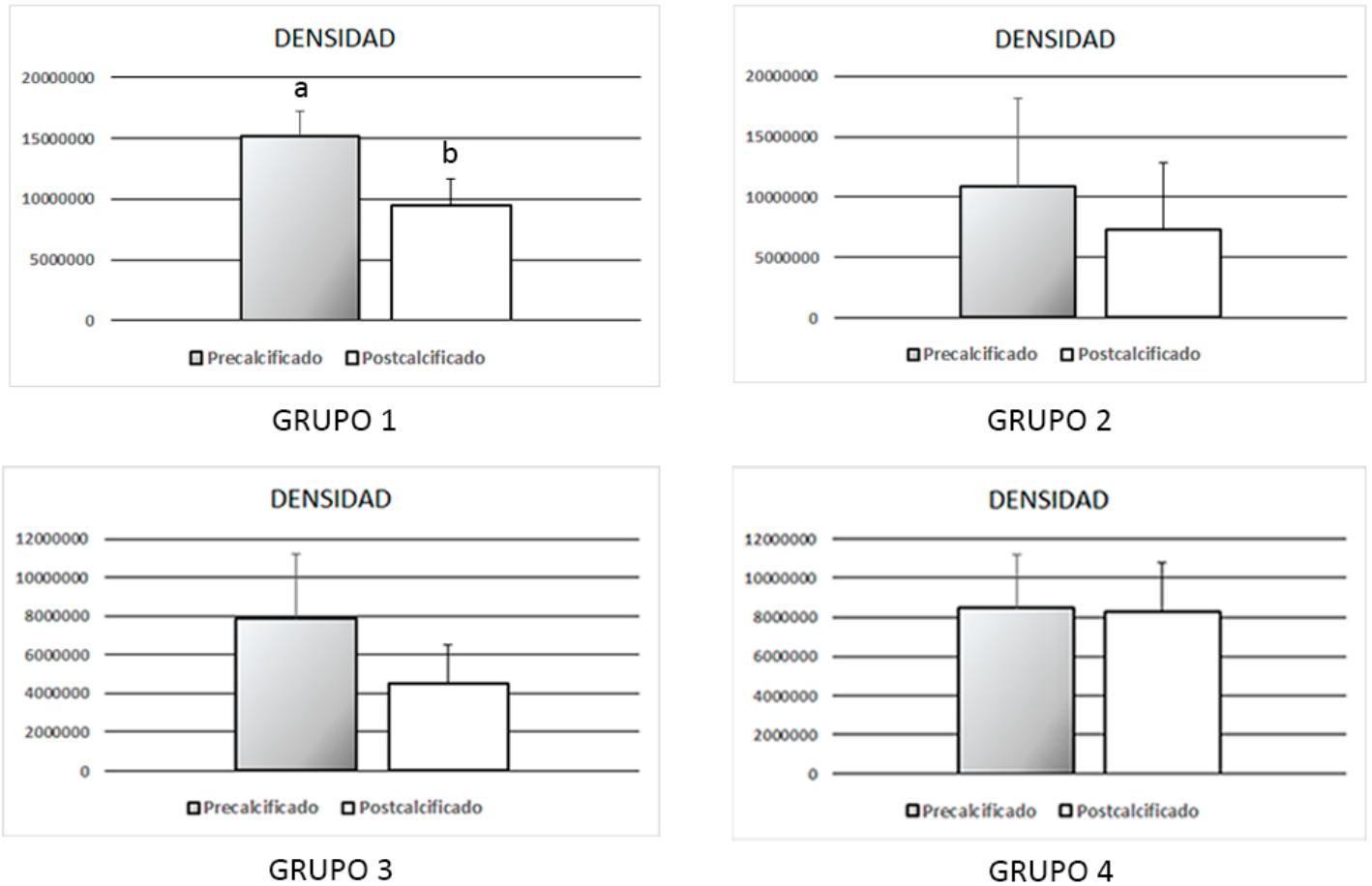


Figura 17. Gráfica representativa de las densidades de cada grupo. Las barras de error representan la desviación estándar.

Finalmente, se ilustró la diferencia entre los grupos mediante la media de éstos. Se realizó el estudio estadístico de los cuatro grupos mediante el test ANOVA (SigmaStat v12.0). La diferencia de pérdida de densidad entre los grupos 1, 2 y 3 no fue estadísticamente significativa (se señalan con la letra (a) los grupos que presentan valores estadísticos sin diferencias significativas). Los protocolos de descalcificación usados en estos grupos presentaron resultados en la pérdida de densidad similares. De la misma manera, mediante ANOVA, se comparó las pérdidas de densidad de los tres grupos con el grupo control negativo (G4, sin descalcificador); esta comparación muestra diferencias significativas de cualquiera de los tres con el G4.

	DENSIDAD					
	INICIAL		FINAL		Diferencia	DS
	Media	DS	Media	DS		
G1	15220568	2024137	9428434	2215386	5792134	464909
G2	10857581	7374180	7256790	5551027	3600791	2203985
G3	7844948	3328114	4485131	2009275	3359816	1734287
G4	8476391	2685429	8247210	2550470	229181	142157

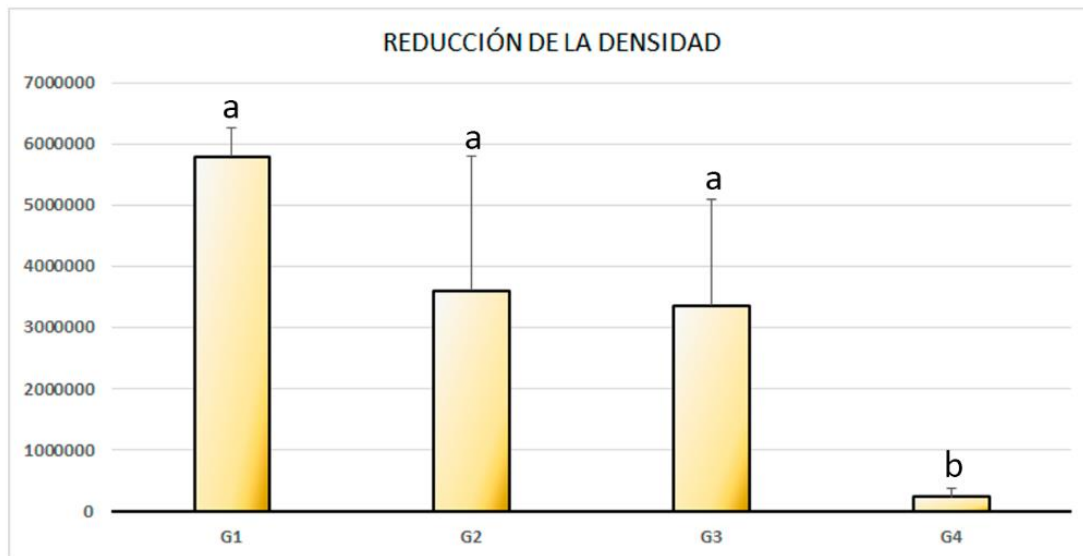


Figura 18. Gráfica representativa de las medias de la reducción de la densidad para cada grupo.

3.2 Resultados del método de desgaste

Se observaron las muestras al microscopio óptico y se tomaron fotografías de las muestras, según la zona analizada.

3.2.1 Esmalte

Se pueden observar con facilidad la mayoría de estructuras representativas de éste, como las **estrías de Reitzus**, una serie de líneas pardas que se extienden por el esmalte espaciadas entre sí (Figura 19). La **línea neonatal** o línea de Rushton-Orban se aprecia como una estría continua de gran tamaño parduzca, paralela al contorno dental (Figura 20). Las líneas de imbricación se observan como pequeñas depresiones entre una periquimatía y otra. Estas últimas se aprecian como rodetes (Figura 21).

Finalmente, encontramos los **penachos**, descritos previamente, tienen forma de arboleda, contraria a los **husos adamantinos**, siendo éstos tubulares (Figura 22).

Todas las figuras se encuentran representadas en la **Lámina 1**.

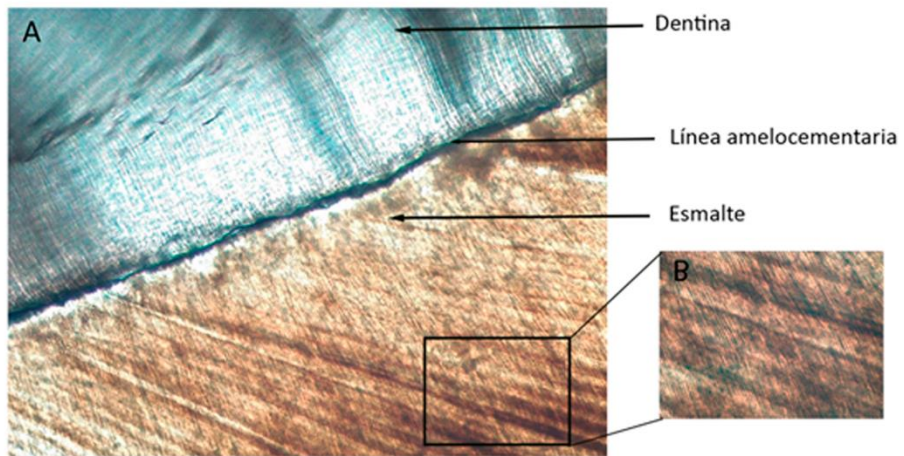


Figura 19. A) Esmalte limitando con la dentina por la línea amelodentinaría, 10x B) Imagen detallada del recuadro, estriás de Reitzus y bandas de Hunter-Schreger, 40x. Elaboración propia

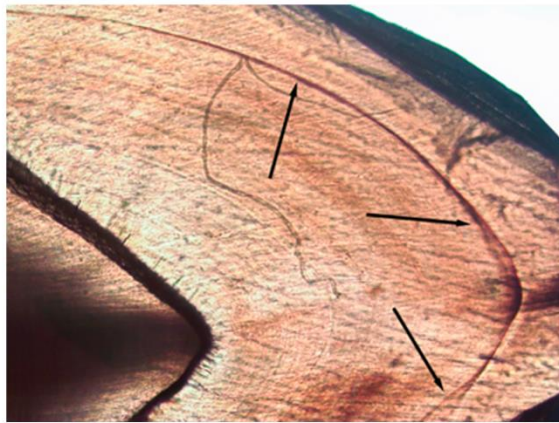


Figura 20. Imagen de microscopía óptica. Línea neonatal en el esmalte, indicada por las flechas negras, 4x. Elaboración propia.

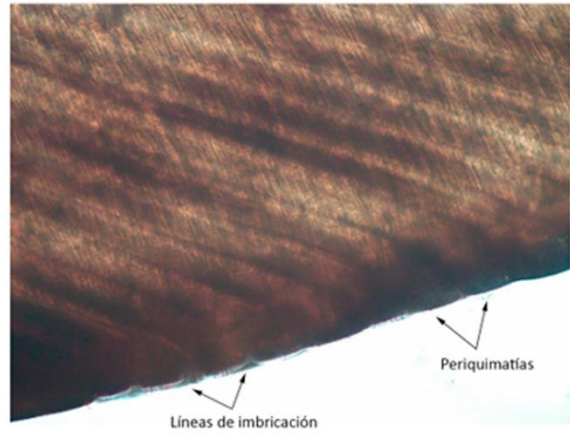


Figura 21. Líneas de imbricación y periquimatias en el esmalte, 20x. Elaboración propia.

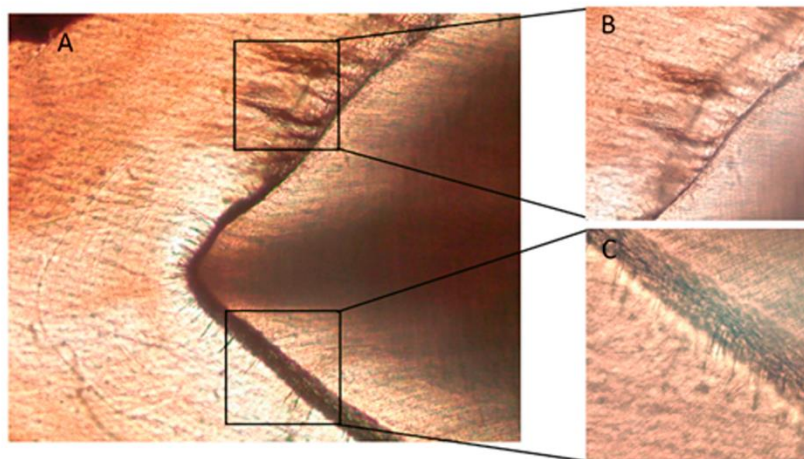


Figura 22. A) Esmalte dental, presencia de penachos y husos adamantinos, 4x B) Imagen detallada de los penachos C) Imagen detallada de los husos adamantinos, 10x. Elaboración propia.

Lámina 1. Representa todas las estructuras encontradas en el esmalte dental.

3.2.2 *Dentina*

En la dentina podemos encontrar los **túbulos dentinarios**, representativos de ésta. La dentina interglobular, conocida también como **espacios de Czermak**, se aprecia como unas indentaciones oscuras. La limitación con el esmalte está marcada por la línea amelodentinaria. En el esmalte, se ven bandas alternas claras y oscuras, correspondientes a las bandas de **Hunter-Schreger** (Figura 23). A mayor aumento, se puede apreciar la forma de S itálica característica de los **túbulos dentinarios** (Figura 24). Además de limitar con el esmalte, la dentina también limita con el cemento en la **unión o línea cementodentinaria**, apreciándose una transición en bisel entre ambas líneas (Figura 25).

Todas las figuras se encuentran representadas en la **Lámina 2**.

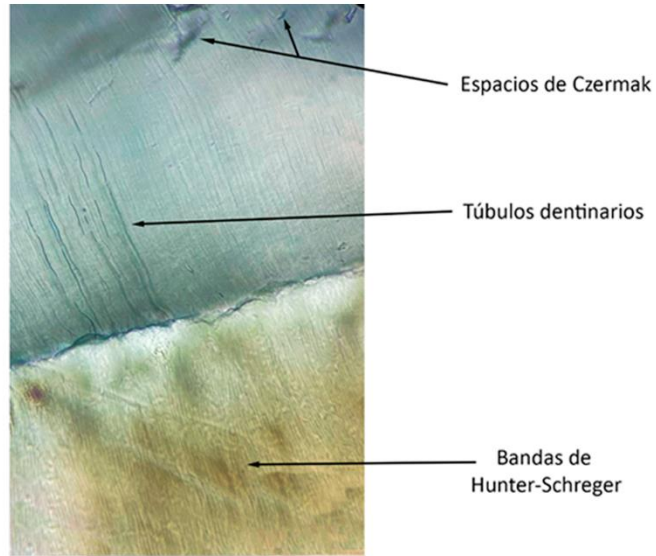


Figura 23. Túbulos dentinarios y espacios de Czermak. Bandas de Hunter-Schreger en el esmalte, 10x. Elaboración propia

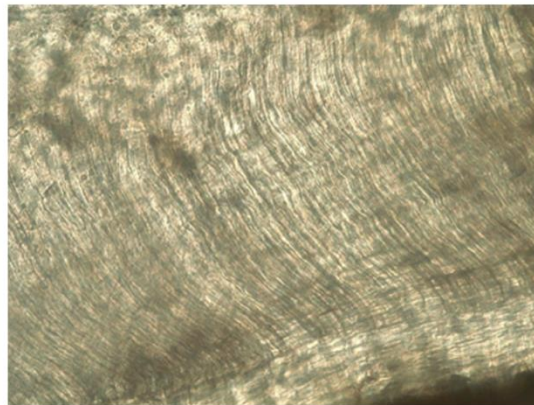


Figura 24. Túbulos dentinarios, 20x. Elaboración propia.

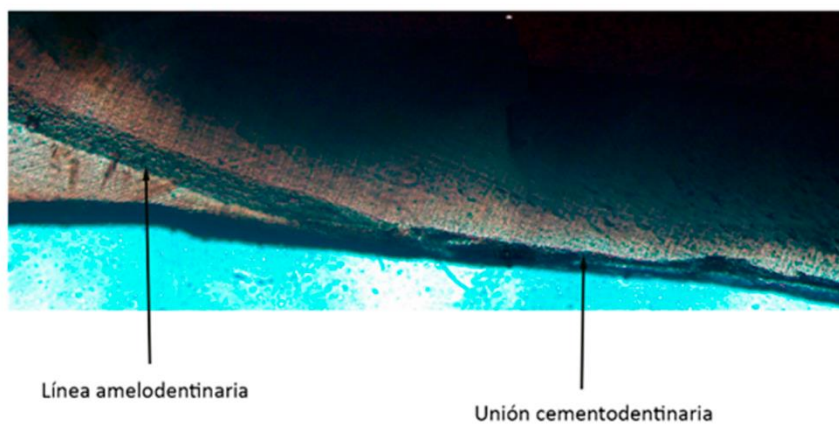


Figura 25. Línea amelodentinaría y unión cementodentinaría, 4x. Elaboración propia.

Lámina 2. Representa todas las estructuras encontradas en la dentina.

3.2.3 Cemento

La **capa granulosa de Tomes** se encuentra paralela y próxima a la unión cementodentinaria, en la periferia de la dentina radicular. Se aprecia la marcada diferencia entre el cemento celular y el acelular (Figura 26). Se observan los **conductillos calcóforos** o lagunas de color negro, con una estructura ovoidea de la que parten ramificaciones en los cuales se alojan los cementocitos (Figura 27).

Todas las figuras se encuentran representadas en la **Lámina 3**.

3.2.3 Pulpa

En la técnica de desgaste se suele preservar exclusivamente materia inorgánica, por tanto, comúnmente se observa la cavidad pulpar como un espacio lleno de aire. En este caso, se logró preservar el tejido, mostrándose la **pulpa** dentro de la cavidad, la cual sale por un orificio, siendo éste el **ápice** (Figura 28). Se aprecia la coloración rojiza de ésta (Figura 29).

La figura representativa se incluye en la **Lámina 3**.

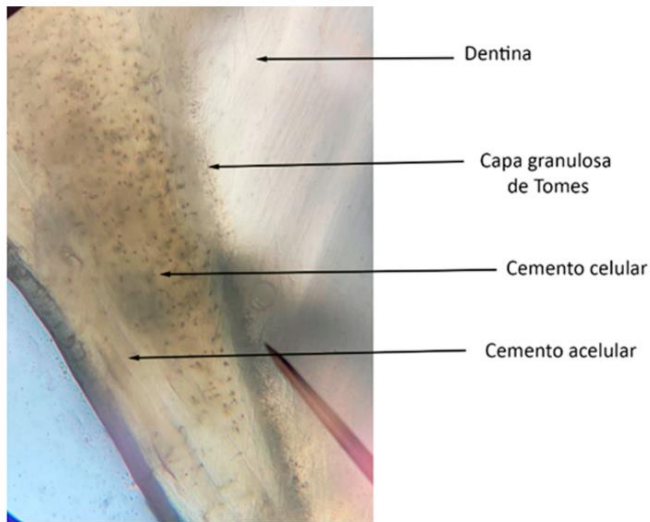


Figura 26. Dentina, capa granulosa de Tomes paralela a la unión amelodentinaria, cemento celular y acelular, 10x. Elaboración propia.

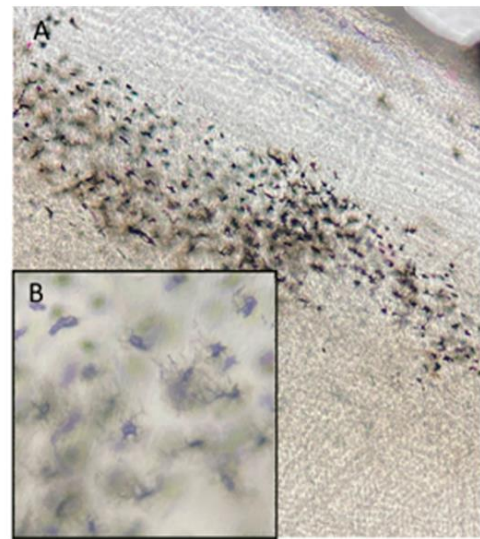


Figura 27. Conductos calcóforos, 10x. B) Imagen detallada de los conductos calcóforos, 20x. Elaboración propia.

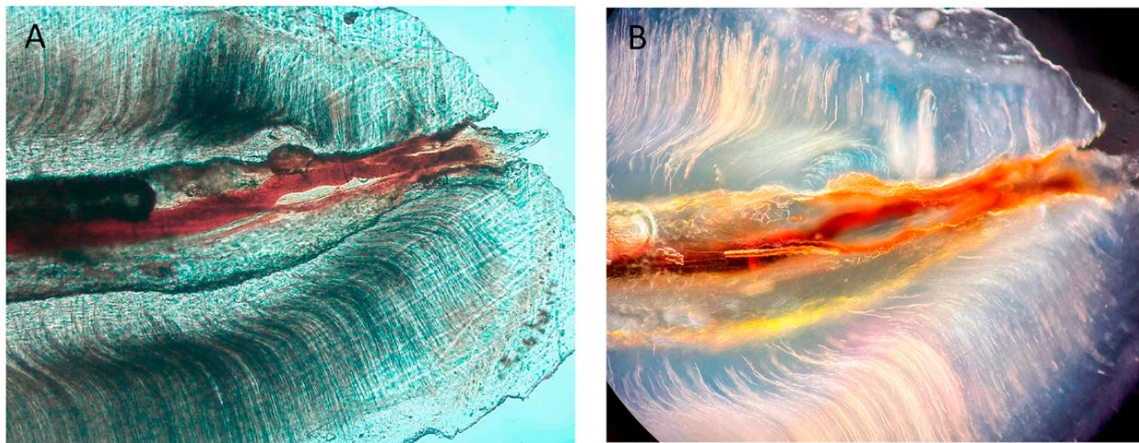


Figura 28. A) Pulpa dental, túbulos dentinarios y ápice, 4x. B) Pulpa dental, misma muestra, 10x. Elaboración propia

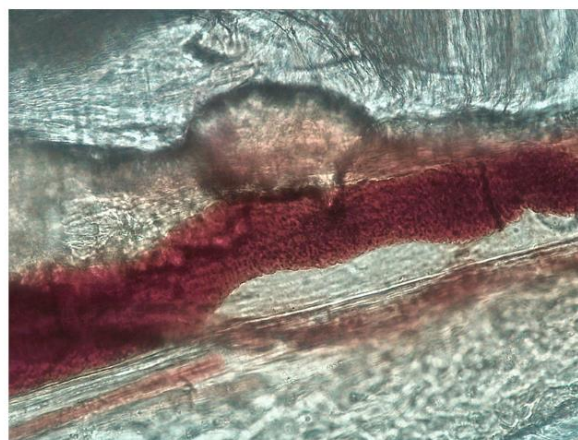


Figura 29. A) Detalle de pulpa dental, 20x. Elaboración propia

Lámina 3. Representa todas las estructuras encontradas en el cemento y en la pulpa.

3.3 Resultados de la técnica del criostato

Se obtienen los resultados de los grupos 1, 2 y 3. El grupo 4 no pudo ser cortado debido a la dureza de éste. Al analizar los diferentes grupos por estructuras dentarias, pudimos observar que el **esmalte** no pudo ser estudiado en ninguno de los tres grupos, al haberse realizado una descalcificación previa.

En el grupo 1, podemos observar la **dentina** con una ligera desorganización de los túbulos dentinarios (Figura 30) y el **cemento dental**, mostrando con gran detalle las anulaciones de éste (Figura 31), estando ausente la presencia de la pulpa dental.

En el grupo 3, la **dentina** también se encuentra presente, hallándose con precisión los túbulos dentinarios de ésta (Figura 32). En este grupo, podemos encontrar la **pulpa dental**, en la cual distinguimos la **zona odontoblástica**, la **zona oligocelular** y la **zona central pulpar** (Figura 33).

Todas las figuras de los grupos 1 y 3 se encuentran representadas en la **Lámina 4**.

En el grupo 2, se presenta la **pulpa dental** observándose todas las estructuras mencionadas anteriormente además de la presencia de **vasos sanguíneos** (Figura 35). Se pueden observar con claridad los **odontoblastos** circundando ésta (Figura 36). Por último, encontramos la dentina (Figura 37), pudiendo ser observados con precisión los túbulos dentinarios (Figura 38).

Todas las figuras del Grupo 4 se encuentran representadas en la **Lámina 5**.

G1



Figura 30. Túbulos dentinarios y dentina, 20x. Elaboración propia.

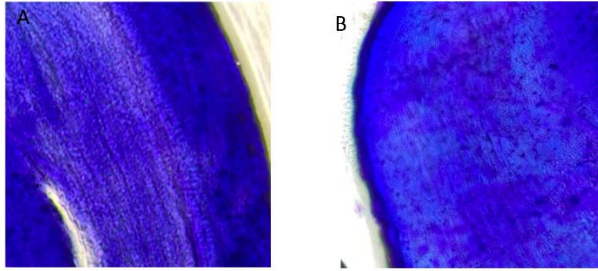


Figura 31. A) Cemento dental, detalle de las anulaciones, 20x. B) Detalle del cemento celular, 20x. Elaboración propia.

G3

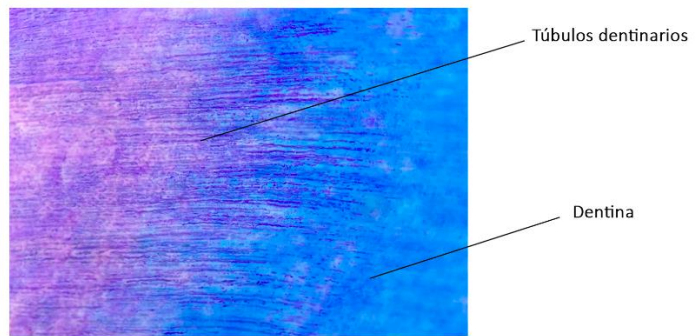


Figura 32. Túbulos dentinarios y dentina, 20x. Elaboración propia.

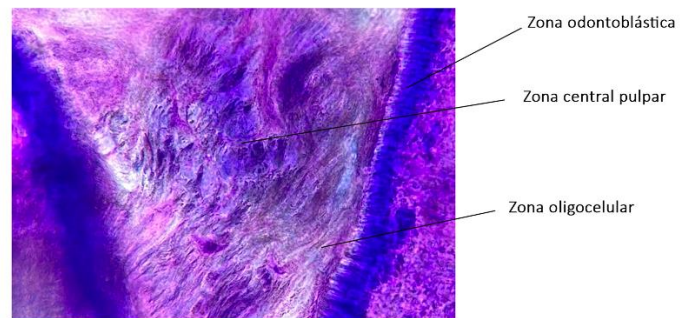


Figura 33. Zonas de la pulpa dental, 20x. Elaboración propia.

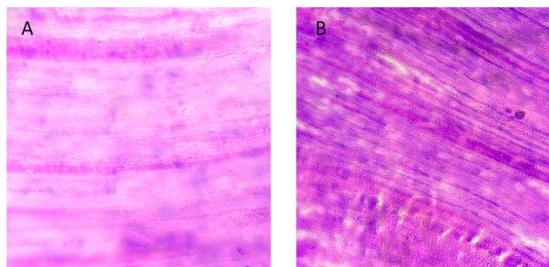


Figura 34. A) y B) Cemento dental. Detalle de las anulaciones, 20x. Elaboración propia.

Lámina 4. Representan las estructuras de los Grupos 1 y 3 visualizadas a través del método de criostato.

G1

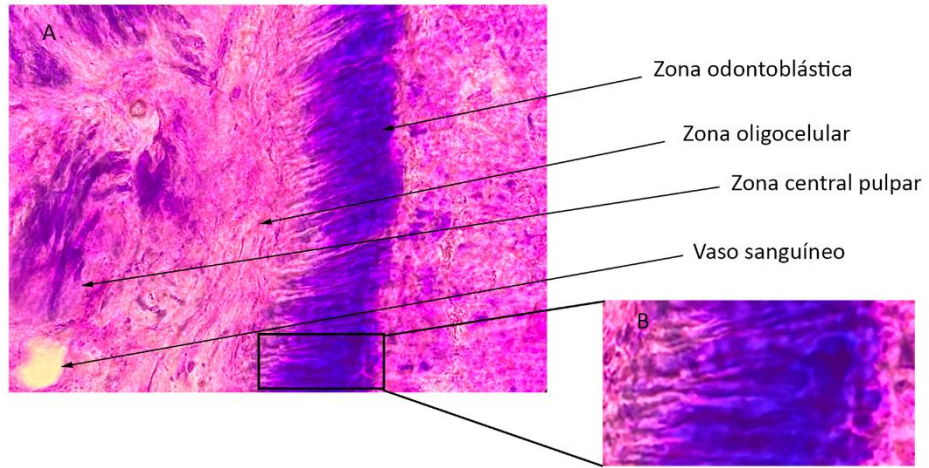


Figura 35. A) Zonas de la pulpa dental, 40x. B) Detalle de odontoblasto, 40x. Elaboración propia.

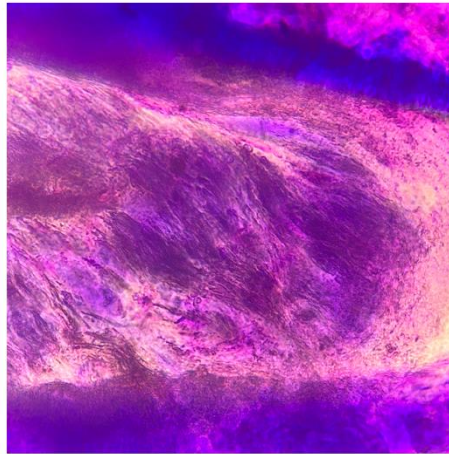


Figura 36. Odontoblastos circundando la pulpa dental, 40x. Elaboración propia.

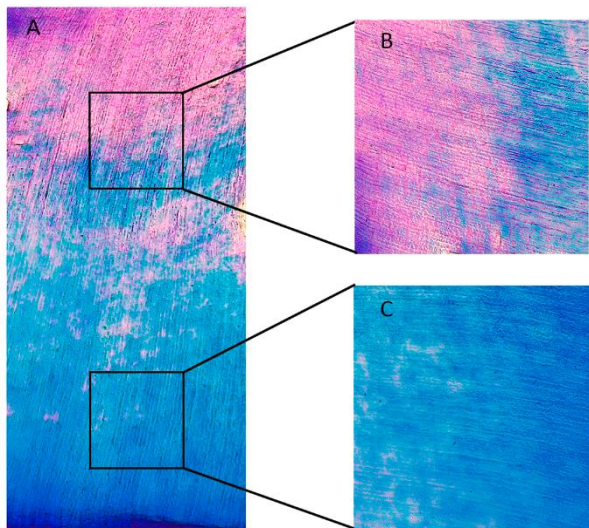


Figura 37. A) Túbulos dentinarios en dentina. B) y C) Imágenes detalladas de los recuadros. Túbulos dentinarios en distintas zonas de la dentina, 40x. Elaboración propia.

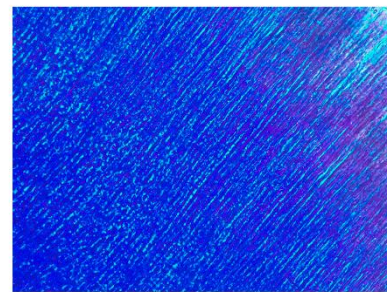


Figura 38. Imagen de microscopía óptica. Detalle de los túbulos dentinarios en la dentina, 40x. Elaboración propia.

Lámina 5. Representa las estructuras del Grupo 2 visualizadas a través del método del criostato

5.DISCUSIÓN

5.1 Método de desgaste: estructuras histológicas y comparación de la técnica.

Dentro de esta categoría, existen múltiples formas de tratar la muestra, siendo una de ellas, la inclusión en resina epoxi y su posterior procesado mediante electro pulidoras (7,16,30,31). Este procedimiento preserva las estructuras principales del esmalte, la dentina y el cemento, sin embargo, existen limitaciones, como la deformación de alguna de éstas, además del alto coste de la aparatología utilizada (32,33).

Múltiples autores proponen la utilización de pieza de mano y piedra Arkansas o de carburo de silicio como una alternativa económica para obtener cortes histológicos (18,33,34), siendo el protocolo de elección en esta investigación.

La pieza de mano se emplea con la mano dominante mientras se sujeta la muestra dental con la otra. Como rasgo característico o diferenciador de este TFG se optó por incluir el diente previamente en escayola tipo IV con el fin de disminuir el riesgo de corte del operador, referido en materiales y métodos. No obstante, esto implicó un tiempo de trabajo incrementado, debido al corte simultáneo de la muestra y la escayola.

Una vez se obtiene la sección, ésta se desgasta en la piedra elegida manualmente, hasta obtener secciones finas. Tanto en el protocolo utilizado y tal como los autores Yadav. et al (2019) y Singh y Gorrea (2006) indican, este paso puede dañar los dedos, debido a la fricción producida sobre la superficie abrasiva (32,33). Para aumentar la seguridad del procedimiento, en nuestro caso se utilizó doble guante además de revisar periódicamente la presencia de rotura en estos. Se debe de tener en consideración la facilidad de rotura de las muestras dentales si se reducen demasiado. A pesar de ser un proceso tedioso y lento, se preservan adecuadamente las estructuras dentales.

Existen ciertas variaciones del protocolo, como la realización de una descalcificación parcial de la muestra (10) o la reducción del diámetro inicial mediante electro pulidoras (31,35,36), siendo el resultado histológico final similar al del protocolo realizado.

A nivel histológico, se observan las estructuras principales del esmalte, tales como las estrías de Retzius, las laminillas de éste (10), estructuras de la dentina como los túbulos dentinarios (33,35,37) y las estructuras del cemento como las líneas de crecimiento (34),

cementocitos (36), entre otras estructuras descritas anteriormente, siendo éstas semejantes en color, textura y diámetro a las descritas por los artículos.

5.2 Criostato: novedad y comparación en la técnica. Estructuras histológicas.

Es difícil hallar artículos que empleen la técnica de corte al criostato para muestras calcificadas. Esta técnica se suele emplear en tejido óseo y médula ósea (38,39) siendo una novedad su uso en la obtención de cortes dentarios.

La criosección en los tejidos altamente mineralizados es dificultosa, por ello, es frecuente realizar una descalcificación previa de éstos. Se eligió el EDTA como descalcificante en esta investigación debido a que éste es el que mejor preserva la integridad tisular, a pesar de necesitar unos tiempos de procesado prolongados (35,40–42).

La descalcificación por EDTA no tiene un periodo de tiempo estandarizado: Kong et al en 2010 procesaron las muestras durante dos semanas (43), mientras que Mischi et al en 2016 y Teryama et al en 2020 las procesaron durante tres meses (44,45). En esta investigación, se optó por descalcificar las muestras durante catorce días, según el estudio de Kong et al, tras comprobar bajo valoración radiográfica que éstas habían pasado por un adecuado nivel de descalcificación. El estudio estadístico de la pérdida de densidad demostró que hubiese sido necesario extender el proceso, debido a la dificultad de corte de las muestras, apreciándose una diferencia de descalcificación notable en ciertas partes de éstas, resultando en desgarramiento del tejido en múltiples ocasiones.

El grupo 1 fue el que presentó una mayor facilidad de corte en comparación a los grupos 2 y 3. Se estima que puede deberse a las variaciones dentro del protocolo de descalcificación. Una de ellas fue la ausencia o la realización de un lavado previo en PBS antes de incluirse en OCT y previo a la descalcificación. Esto pudo haber provocado una mayor penetración del agente quelante, haciendo más sencilla su posterior sección.

Una gran desventaja de la descalcificación es la pérdida de estructura mineralizada, además de verse perjudicadas la actividad enzimática y la antigenicidad de las muestras, no obstante otros autores han podido preservar la estructura mineralizada al no realizar descalcificaciones tan agresivas empleando un sistema de cintas adhesivas, siendo el

más común el CryoJane Tape-Transfer System, que facilita el proceso de obtención de éstas (46–48).

El único reporte existente en el cual el criostato es utilizado para obtener cortes histológicos dentales data del año 2000 en un estudio realizado por Kawamoto y Shimizu, en él se emplean unas cuchillas de tungsteno especiales para cortar tejido sin descalcificar, un sistema de cintas adhesivo especial y modificaciones del criostato, como la colocación de un ventilador (49).

Debido a la limitación de recursos, se simplificó el protocolo, utilizándose únicamente un sistema de cintas adhesivas económicas, similar a la propuesta por Serowoki et al en 2018 (50), en muestras parcialmente descalcificadas.

Se obtuvo un mejor resultado histológico en aquellas muestras procesadas mediante el sistema de cintas adhesivas, observando una mejor preservación y como consecuencia una mejor tinción del tejido y una mayor preservación estructural de éste. La pulpa, la dentina y el cemento se consiguieron visualizar de manera correcta, no obstante, no se logró conservar el esmalte. La calidad de la tinción fue similar para los tres grupos, siendo ligeramente superior en los grupos 2 y 3.

La tinción mediante tintes acidófilos y basófilos resultó satisfactoria, obteniendo resultados similares a los de Widbiller et al en 2021 (27), en el cual la pulpa y la dentina se tiñen debido a su alto contenido en colágeno. Sin embargo, se aprecia una coloración más oscura de la capa odontoblástica en nuestras tinciones. Esto se debe a que el proceso de descalcificación permite la rotura del enlace de los átomos de calcio con el fosfato, estos grupos fosfatos no ocupados confieren un carácter ácido al tejido. Por otro lado, los procesos de los odontoblastos, con su contenido citoplasmático más básico, se teñirán con el colorante basófilo, es decir, de color rosa (51–53).

En cuanto al cemento, se obtienen resultados similares a los de Perrone et al. en 2022 y Sarbeen y Jayaraj en 2015 pudiéndose observar con detalle las anulaciones de éste en nuestro trabajo (17,54).

La tinción mediante estos tintes acidófilos y basófilos es económica y fácil de utilizar, no obstante, no es capaz de teñir toda la microanatomía, por tanto, debe complementarse con otras tinciones siempre cuando sea posible (2).

5.3 Criostato y desgaste: contraste entre ambas técnicas.

En la actualidad, no existen estudios que comparen ambas técnicas, por tanto, esta investigación se considera novedosa en el ámbito de la medicina y la odontología.

Una de las desventajas del método de desgaste es la pérdida de tejidos blandos (31), sin embargo, se preservó correctamente la pulpa en nuestro protocolo gracias al uso de fijadores (formol). Se aprecian diferencias entre este protocolo y el descrito anteriormente (protocolo de desgaste), observándose dicho tejido mayor detalle en la criosección, en particular, la capa odontoblástica.

El esmalte no pudo ser observado en la criosección, debido a la descalcificación previa utilizada. La microanatomía de la dentina si pudo ser analizada, observándose con mayor precisión los túbulos dentinarios que en la técnica de desgaste, aunque otros detalles anatómicos tales como las líneas de crecimiento no se pudieron observar con claridad.

En términos de coste, la técnica de desgaste tiene un mejor coste-beneficio que la técnica del criostato, sin embargo, si se quieren explorar otros aspectos inmunohistoquímicos se debe utilizar esta última, ya que la técnica de desgaste no permite un análisis tan detallado debido a que el grosor del tejido es mayor en ésta.

6.CONCLUSIONES

1. Los resultados histológicos obtenidos en el estudio mediante la técnica de desgaste son equiparables a los de la bibliografía consultada.
2. Es posible la utilización del criostato como un nuevo sistema de visualización de estructuras dentales, no obstante, son necesarios más estudios para poder estandarizar el protocolo.
3. Tanto el método de desgaste como la criosección pueden ser utilizados para la obtención de cortes histológicos en dientes, siendo el esmalte la única estructura que difiere entre ambos protocolos, observándose sólo en el protocolo de desgaste. Es posible la preservación de la pulpa dental en ambos protocolos.
4. Todos los elementos estructurales del diente se consiguieron teñir con tintes ácido-base en todos los grupos a estudiar satisfactoriamente, menos el grupo no descalcificado cuyo corte al criostato no fue posible.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Gómez de Ferraris ME. Histología, Embriología e Ingeniería Tisular Bucodental. 4.^a ed. Editorial Médica Panamericana; 2019.
2. Alturkistani HA, Tashkandi FM, Mohammedsaleh ZM. Histological Stains: A Literature Review and Case Study. Glob J Health Sci. 25 de junio de 2015;8(3):72.
3. Salazar L, Moreno F. Comparación de tres tipos de tinciones histoquímicas en secciones histológicas de paladar y lengua de rata Wistar. Salut Sci Spirit. 30 de diciembre de 2016;2:2463-1426.
4. Montuenga Badía L, Esteban Ruiz FJ, Calvo González A. Técnicas en histología y biología celular/. Barcelona: Elsevier-Masson; 2009.
5. Universidad Nacional de Córdoba-Facultad de Odontología, Gómez de Ferraris ME. Reseña histórica sobre la Histología y Embriología en Odontología y de la Cátedra "B" desde su creación a la actualidad, en la facultad de Odontología Universidad Nacional de Córdoba. Rev Fac Odontol. 14 de diciembre de 2017;27(3):3-9.
6. Wheater PR, Woodford P, O'Dowd G. Wheater's histología funcional : texto y atlas en color / Barbara Young, Geraldine O'Dowd, Phillip Woodford [Internet]. 2014 [citado 10 de noviembre de 2022]. Disponible en: <https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=cat06387a&AN=crai.77416&site=eds-live>
7. Petrone S, Garizoain G. Análisis histológico del esmalte dentario desde una perspectiva antropológica. Técnica de corte delgado para microscopía óptica. 1 de enero de 2017;4:108-16.
8. Orban BJ, Bhaskar SN, editores. Orban's oral histology and embryology. 11th ed. St. Louis: Mosby Year Book; 1991. 489 p.
9. Petrone S, García-Mancuso R, Inda A, Salceda S. Importancia del análisis microestructural del esmalte de la dentición decidua para la reconstrucción de la cronología del desarrollo dentario: una perspectiva antropológica. RevCsMorfol. 2 de julio de 2018;Volumen 19(2):37-50.
10. Singh H, Padel V, Kundendu AB, Urvashi T, Magesh K. A unique method to study different histological structures using Hematoxylin and Eosin staining in partially decalcified ground sections of teeth : A research article. Univ J Dent. 8(3).
11. Gartner LP. Textbook of histology. Fifth edition. Philadelphia, PA: Elsevier; 2021.
12. Antonio Nanci. Ten Cate's Oral Histology - E-Book : Development, Structure, and Function [Internet]. 2018 [citado 10 de noviembre de 2022]. Disponible en: <https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=nlebk&AN=1903248&site=eds-live>
13. Simancas-Escorcía VH. Fisiopatología de los odontoblastos: una revisión. Duazary. 23 de septiembre de 2019;16(3):87-103.

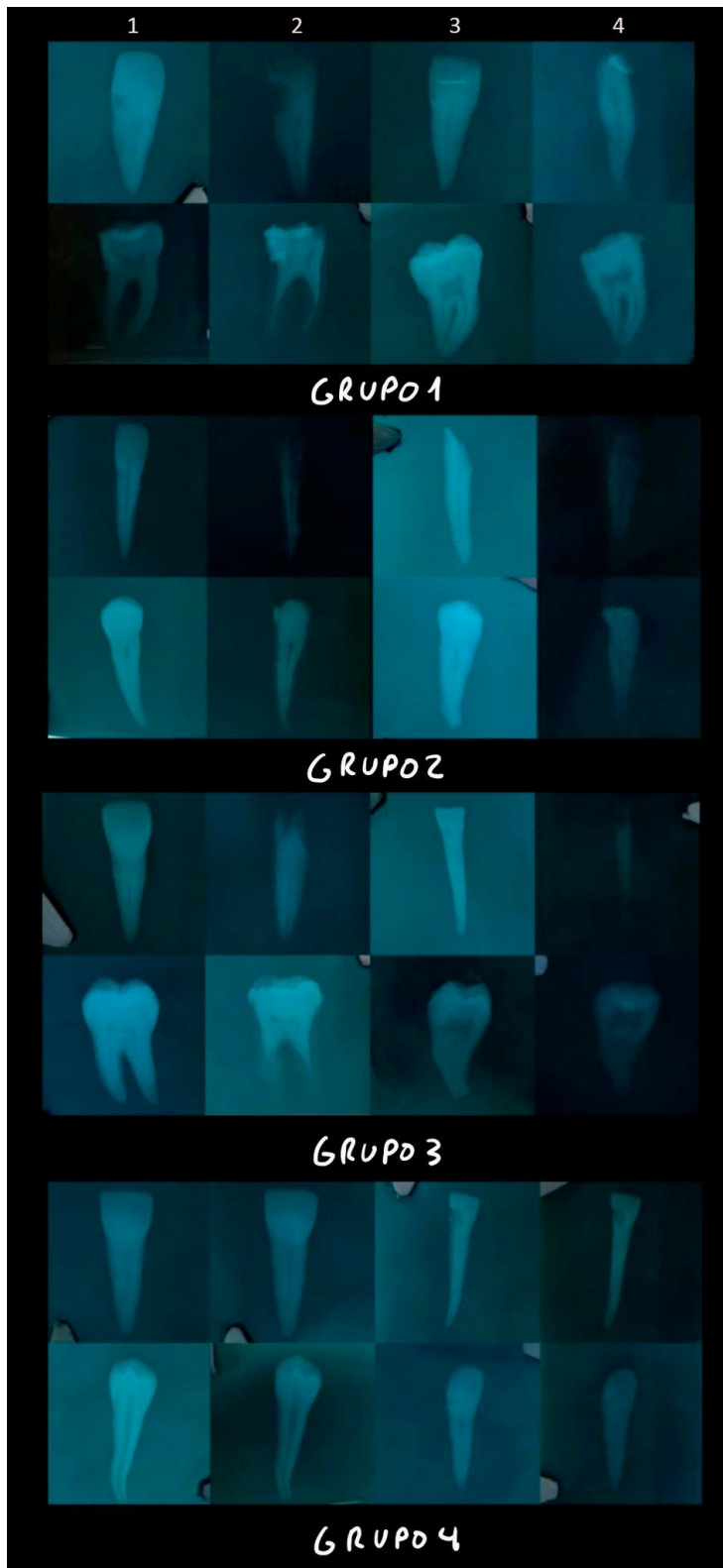
14. Ross MH, Montes de Oca Luna R, Pawlina W, Alday A. Histología : texto y atlas : correlación con biología celular y molecular / Michael H. Ross, Wojciech Pawlina [Internet]. 2016 [citado 10 de noviembre de 2022]. Disponible en: <https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=cat06387a&AN=crai.84156&site=eds-live>
15. Fortoul van der Goes TI. Histología y biología celular. 3ª ed. México D.F.: McGraw Hill; 2017.
16. Affur MC, Gili MA, Bessone GG. Análisis del espesor de los tejidos duros en la dentición permanente humana. *Odontol Sanmarquina*. 13 de noviembre de 2020;23(4):401-7.
17. Perrone V, Gocha TP, Randolph-Quinney P, Procopio N. Tooth Cementum Annulation: A Literature Review. *Forensic Sci*. 20 de julio de 2022;2(3):516-50.
18. Pradeep L, Kokila G, Gopinathan P, Guruswamy S, Nazir S, Chatterjee A. Age estimation with cemental annulation using light, phase contrast and polarized microscopy. *J Microsc Ultrastruct*. 2021;9(2):55.
19. Petrovic B, Pantelinac J, Capo I, Miljkovic D, Popovic M, Penezic K, et al. Using Histological Staining Techniques to Improve Visualization and Interpretability of Tooth Cementum Annulation Analysis. *Int J Morphol*. febrero de 2021;39(1):216-21.
20. Cohen S, Hargreaves KM, Berman LH, Rotstein I. Cohen : vías de la pulpa. 12ª ed. Barcelona: Elsevier; 2022. (Vías de la pulpa).
21. Wheatley SP, Altieri DC. Survivin at a glance. *J Cell Sci*. 1 de abril de 2019;132(7):jcs223826.
22. Bicakci A, kocoglu Altan B, Celik-Ozenci C, Tekcan Altun M, Babacan H, Gungor-Ordueri N. Histopathologic evaluation of pulpal tissue response to various adhesive cleanup techniques. *Am J Orthod Dentofac Orthop Off Publ Am Assoc Orthod Its Const Soc Am Board Orthod*. 1 de julio de 2010;138:12.e1-7
23. Day CE, editor. *Histopathology: Methods and Protocols* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2014 [citado 30 de diciembre de 2022]. (Methods in Molecular Biology; vol. 1180). Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-1050-2>
24. Dey P. *Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology* [Internet]. Singapore: Springer Singapore; 2018 [citado 30 de diciembre de 2022]. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/978-981-10-8252-8>
25. Thavarajah R, Mudimbaimannar V, Rao U, Ranganathan K, Elizabeth J. Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2012;16(3):400.
26. *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques* [Internet]. Elsevier; 2019 [citado 30 de diciembre de 2022]. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/C20150001435>
27. Widbiller M, Rothmaier C, Saliter D, Wölflick M, Rosendahl A, Buchalla W, et al. Histology of human teeth: Standard and specific staining methods revisited. *Arch Oral Biol*. julio de 2021;127:105136.

28. Nawrocka A, Łukomska-Szymańska M. Extracted human teeth and their utility in dental research. Recommendations on proper preservation: A literature review. *Dent Med Probl.* 28 de junio de 2019;56(2):185-90.
29. Thamer SJ, Khudhair MY, Ibrahim MK, Mohammed MAAR. Evaluation of bone marrow preparations and sections of teeth prepared with modified Bouin's solution. *Biotech Histochem.* 3 de julio de 2020;95(5):389-95.
30. Williamson R. Histological preparation of teeth and tooth growth. *Arch Oral Dent Res.* 7 de marzo de 2015;www.vipoa.org/oraldent:1-6.
31. Ganapathy D. Histological Comparison Of Ground Section, Decalcified Section and Resin Embedded Section Of Bone - A Review. *Int J Dent Oral Sci.* 18 de marzo de 2021;2115-8.
32. Singh A, Gorea R. Few tips for making ground sections of teeth for research purpose. *J Punjab Acad Forensic Med Toxicol.* 1 de enero de 2006;6:11.
33. Yadav SM, Wakode R, Kumar S, Jadhav A. Ground sections of teeth: histopathological study modality. *Int J Res Med Sci.* 27 de marzo de 2019;7(4):1384.
34. Sultana A, Zainab H, Jahagirdar P, Hugar D, Shaimaa. Age estimation with cemental incremental lines in normal and periodontally diseased teeth using phase contrast microscope: an original research. *Egypt J Forensic Sci.* 1 de diciembre de 2021;11.
35. Astekar M, Kaur P, Dhakar N, Singh J. Comparison of hard tissue interrelationships at the cervical region of teeth based on tooth type and gender difference. *J Forensic Dent Sci.* 1 de mayo de 2014;6:86-91.
36. Tan N, Thentamil A, Jacob M. Hard Tissue Architecture of Tooth – No Strain with Stain. *J Acad Dent Educ.* 19 de enero de 2018;3:5.
37. Vangala ManognaRL, Rudraraju A, Rv S. Mounting ground sections of teeth: Cyanoacrylate adhesive versus Canada balsam. *J Oral Maxillofac Pathol.* 1 de enero de 2016;20:20.
38. Kopp HG, Hooper A, Shmelkov S, Rafii S. Beta-galactosidase staining on bone marrow. The osteoclast pitfall. *Histol Histopathol.* 1 de octubre de 2007;22:971-6.
39. Lim J, Kim Y, Lee W, Kim M, Lee EJ, Kang CS, et al. Fresh-frozen, optimal cutting temperature (OCT) compound-embedded bone marrow aspirates: a reliable resource for morphological, immunohistochemical and molecular examinations. *Int J Lab Hematol.* febrero de 2010;32(1p1):e34-9.
40. Prasad P, Donoghue M. Comparative Study of Various Decalcification Techniques. *IJDR.* 1 de octubre de 2013;24(3):302-8.
41. Kapila SN. Driving the Mineral out Faster: Simple Modifications of the Decalcification Technique. *J Clin Diagn Res [Internet].* 2015 [citado 15 de octubre de 2022]; Disponible en: http://jcdr.net/article_fulltext.asp?issn=0973-709x&year=2015&volume=9&issue=9&page=ZC93&issn=0973-709x&id=6569
42. Sanjai K, Patil A, Jayaram S, Kumarswamy J, Papaiah L, Krishnan L. Evaluation and comparison of decalcification agents on the human teeth. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2012;16(2):222.

43. Kong X, Cao M, Ye R, Ding Y. Orthodontic Force Accelerates Dentine Mineralization during Tooth Development in Juvenile Rats. *Tohoku J Exp Med.* 2010;221(4):265-70.
44. Meschi N, Hilkens P, Lambrichts I, Van den Eynde K, Mavridou A, Srijbos O, et al. Regenerative endodontic procedure of an infected immature permanent human tooth: an immunohistological study. *Clin Oral Investig.* mayo de 2016;20(4):807-14.
45. Terayama AM, Benetti F, de Araújo Lopes JM, Barbosa JG, Silva IJP, Sivieri-Araújo G, et al. Influence of low-level laser therapy on inflammation, collagen fiber maturation, and tertiary dentin deposition in the pulp of bleached teeth. *Clin Oral Investig.* noviembre de 2020;24(11):3911-21.
46. Golubeva Y, Smith R, Sternberg L. Optimizing Frozen Sample Preparation for Laser Microdissection: Assessment of CryoJane Tape-Transfer System®. *PLoS One.* 21 de junio de 2013;8:e66854.
47. Yang Y, Liu Q, Zhang L, Fu X, Chen J, Hong D. A modified tape transfer approach for rapidly preparing high-quality cryosections of undecalcified adult rodent bones. *J Orthop Transl.* enero de 2021;26:92-100.
48. Salie R, Li H, Jiang X, Rowe DW, Kalajzic I, Susa M. A Rapid, Nonradioactive In Situ Hybridization Technique for Use on Cryosectioned Adult Mouse Bone. *Calcif Tissue Int.* 1 de septiembre de 2008;83(3):212-21.
49. Kawamoto T, Shimizu M. A method for preparing 2- to 50- μ m-thick fresh-frozen sections of large samples and undecalcified hard tissues. *Histochemie.* 1 de mayo de 2000;113:331-9.
50. Serowoky MA, Patel DD, Hsieh JW, Mariani FV. The use of commercially available adhesive tapes to preserve cartilage and bone tissue integrity during cryosectioning. *BioTechniques.* octubre de 2018;65(4):191-6.
51. Nelson DL (David L, Cox MM, Lehninger AL. *Lehninger principios de bioquímica.* 5a. ed. Barcelona: Omega; 2009. (Principios de bioquímica).
52. Mathews CK, Van Holde KE (Kensal E, Ahern KG, González de Buitrago JM. *Bioquímica.* 3a. ed. Madrid: Addison Wesley; 2002.
53. Baynes JW, Dominiczak MH. *Bioquímica médica.* Quinta edición. Barcelona: Elsevier; 2019.
54. Sarbeen J, Jayaraj G. Light Microscopic Study of Cementum Under Different Histological Stains. *J Pharm Sci Res.* 1 de septiembre de 2015;7:720-3.

8. ANEXOS

ANEXO 1



Las columnas 1 y 3 muestran los dientes previos a la descalcificación y las columnas 2 y 4 los dientes tras el proceso de descalcificación.