

# Efecto del cálculo dentario en la morfología de fibroblastos

Traverso AE, Gonzales Silvério K, Rossa Jr C. Efecto del cálculo dentario en la morfología de fibroblastos. Rev Estomatol Herediana 2002;12(1-2) : 5-8

## RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), el efecto del cálculo dentario sobre la morfología de los fibroblastos. Diez muestras de dentina de aproximadamente 4mm<sup>2</sup>, conteniendo cálculo dentario obtenidas de raíces de dientes humanos con severo compromiso periodontal fueron autoclavadas e incubadas en placas multiorificios que contenían 2mL de solución de Eagle con  $2 \times 10^5$  céls/mL. Después de 24 horas, las muestras fueron fijadas, deshidratadas en concentraciones crecientes de etanol, colocadas en "stubs" metálicos permaneciendo en un desecador al vacío por tres días, posteriormente fueron metalizadas con oro y examinadas por SEM. Fotografías de 750x fueron evaluados por dos examinadores previamente calibrados sobre la morfología de los fibroblastos, según la escala propuesta por Gamal et al. (1998) modificado donde 0=sin células, 1=células de forma achatada, 2=células de forma redondeada y 3=combinación de células de forma achatada y redondeada. Los resultados revelaron la presencia de fibroblastos adheridos a la superficie del cálculo, predominando células de morfología achatada (escala 1) en 70% de estas. Se concluyó que el cálculo esterilizado no influyó en la morfología de los fibroblastos.

Palabras claves: Cultivo de células – Fibroblastos – Cálculo – Enfermedad periodontal.

## Effect of dental calculus in the morphology of fibroblasts.

### ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate through scanning electron microscope the effect of calculus on fibroblasts' morphology. Extracted teeth were collected from patients with severe periodontal disease, from which specimens of dentin with 4mm<sup>2</sup> of area were obtained. A total of 10 specimens were prepared and submitted to steam heat sterilization and incubated on wells with Eagle medium containing  $2 \times 10^5$  céls/mL. After 24 hours, the specimens were fixed, dehydrated with increasing concentrations of ethanol, pasted in metallic stubs and then placed into a vacuum dessicator for 3 days. After sputter coating with gold, the specimens were observed in a scanning electron microscope. The microphotographs were evaluated by two independent and calibrated examiners using the index system proposed by Gamal et al. (1998); 0= no cells, 1= flat cells, 2= round cells, 3= combination of round and flat cells. The evaluation of microphotographs presented fibroblasts attached to the calculus surfaces. In 70% of specimens the predominant morphology was flat cells. The results obtained suggest that sterile calculus would not affect the fibroblasts morphology.

Key words : Cells culture – Fibroblasts – Calculus – Periodontal disease.

Aurora Esmeralda  
Traverso Martínez<sup>1</sup>  
Karina Gonzales Silverio<sup>1</sup>  
Carlos Rossa Jr.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Maestría en Periodoncia, Doctoranda del curso de Post-gradado en Periodoncia.

<sup>2</sup> Profesor Asistente Doctor, Departamento de Diagnóstico y Cirugía, Disciplina de Periodoncia, Facultad de Odontología de Araquara, Universidad de Estadual Paulista (UNESP), Brasil.

## Introducción

Investigaciones epidemiológicas, clínicas y de laboratorio han intentado establecer la importancia, así como los posibles mecanismos de acción por los cuales el cálculo podría participar en el proceso salud-enfermedad periodontal. Sin embargo fue con el estudio de Gingivitis Experimental en Humanos donde se estableció una correlación clínica y microbiológica entre la acumulación de placa bacteriana y la inflamación de la encía marginal (10,15). A partir de estos estudios el rol del cálculo en la etiopatogénesis de la enfermedad periodontal fue aún más incierto. Por un lado, resultados epidemiológicos mostraban una asociación directa entre el cálculo dental y la enfermedad periodontal mientras que autores como Waerhaug (16) y Schröder (14) llegaban a conclusiones que la cantidad de cálculo aumentaba con la edad y por ser secundaria a la formación de placa

bacteriana no sería un factor causal. Para Chawla et al. (3) el cálculo actuaría como un perpetuador del proceso inflamatorio crónico en función de estar cubierto por placa bacteriana, el cual sería permeable a endotoxinas pudiendo liberar productos tóxicos para los tejidos periodontales (11). Investigaciones sobre la efectividad de la remoción del cálculo por medio de procedimientos clínicos de raspaje y alisamiento radicular a través de procedimientos quirúrgicos y no quirúrgicos han demostrado la persistencia de cálculo residual (2,4,8). Sin embargo, independientemente de la cantidad de cálculo residual la mayoría de estudios mostraron una resolución clínica e histológica del proceso inflamatorio periodontal (6,12,13). Debido a este estudio existe un interés considerable en establecer el papel de la remoción del cálculo en el tratamiento periodontal.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar a través de microscopía electró-

nica de barrido (SEM) el efecto de la presencia de cálculo en superficies radiculares, sobre la morfología de fibroblastos de linaje continuo.

## Material y Método

• *Linaje Celular* : Fueron utilizadas células Mc Coy (Instituto Adolfo Lutz-SP, Brasil) (linaje continuo de células con morfología de fibroblastos) las cuales fueron mantenidas en frascos para cultivo (Corning Incorporated-NY, USA) celular (25 cm<sup>2</sup> de área de crecimiento celular) conteniendo medio de Eagle (MEM) suplementado con 7.5% de suero fetal bovino (Cultilab-Campinas, SP, Brasil) y 40 ug/ml de gentamicina (Garamicina 60mgr/Schering-Plough-R.J., Brasil) El cultivo celular fue mantenido en una incubadora con humedad controlada de 98% a una temperatura de 37° C.

• *Test de morfología celular* : Fueron empleados dientes unirradulares, extraídos por severo compromiso periodontal. Los criterios de inclusión de los donadores fueron: ausencia de enfermedades sistémicas que tengan repercusiones sobre el periodonto, como diabetes, no uso de medicamentos en los últimos tres meses que influyeran los signos clínicos de la periodontitis (antiinflamatorios, corticoides, antibióticos, hormonas esteroideas), no fumadores y sin tratamiento periodontal previo.

Los dientes seleccionados y extraídos fueron colocados en suero fisiológico estéril y mantenidos bajo refrigeración a 4°C hasta el momento de la preparación de las muestras. Utilizando un disco diamantado para baja velocidad, cada diente fue seccionado en sentido transversal, a 2mm de la unión amelocementaria, luego se removió de la parte de la raíz que no presentaba cálculo y

placa bacteriana. Las superficies radiculares que presentaban cálculo y placa fueron seccionadas en sentido longitudinal obteniendo muestras de superficies dentinarias de 4mm<sup>2</sup>. Un total de 10 muestras fueron esterilizadas en autoclave, siendo inmediatamente incubadas por 24 horas en placas multiorificio conteniendo 2 mL de medio de cultivo (MEM) con aproximadamente 2x10<sup>5</sup> células/mL. Después del período de incubación, el medio fue removido con un pipetador eléctrico y las muestras lavadas con solución de Hanks para remover las células no adheridas. Las muestras fueron fijadas en glutaraldeído (2.5%-microscopia electrónica) por 15 minutos, después pasaron por una deshidratación seriada en concentraciones crecientes de etanol (10, 30, 50, 70, 90-100%) por 15 minutos en cada concentración. Después de 24 horas las muestras fueron colocadas en

“stubs” metálicos utilizándose una mezcla de esmalte incoloro con grafito en polvo y llevadas a un desecador al vacío, donde permanecieron por tres días para eliminar la humedad residual. Posteriormente a la deshidratación fueron metalizadas con oro (20nm) por 120 segundos y llevadas para microscopía electrónica de barrido para evaluación por fotografía. Para la descripción de la morfología de los fibroblastos cada muestra fue fotografiada en tres áreas aleatorias con aumento de 750x. Las fotografías fueron sometidas a dos examinadores previamente calibrados. Para la descripción de la morfología de los fibroblastos se utilizó la escala propuesta por Gamal et al. en 1988 (7) modificada, donde: 0= sin células (fig. 1), 1= células de forma achatada (fig. 2), 2= células de forma redondeada (fig. 3) y 3= combinación de células de forma achatada y redondeada (fig. 4).

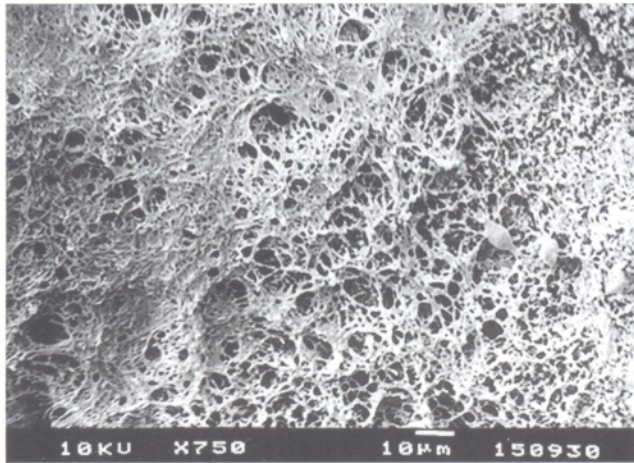


Fig. 1. Muestra de superficie radicular con cálculo, sin fibroblastos presentes. Escala 0 (750x).

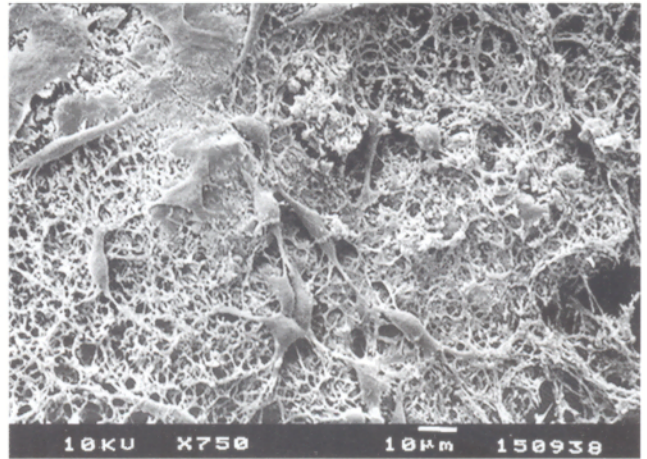


Fig. 2. Muestra de superficie radicular con cálculo, con presencia de fibroblastos achatados. Escala 1 (750x).

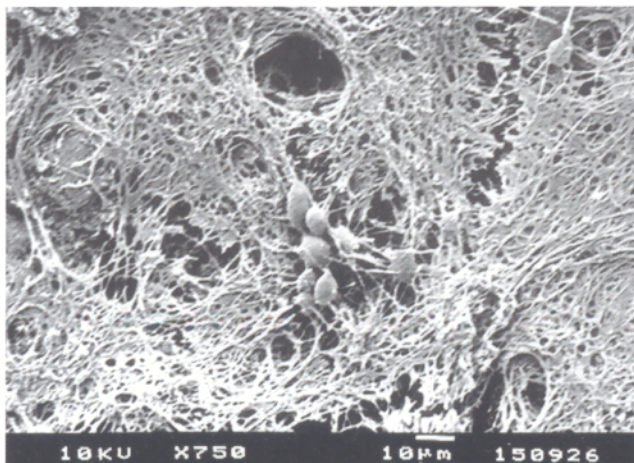


Fig. 3. Muestra de superficie radicular con cálculo, con presencia de fibroblastos redondeados. Escala 2 (750x).



Fig. 4. Muestra de superficie radicular con cálculo, con presencia de fibroblastos achatados y redondeados. Escala 3 (750x).

## Resultado y Discusión

El proceso de reparación de los tejidos es el resultado acumulativo de diferentes funciones celulares como son la migración, proliferación y la síntesis de moléculas extracelulares; cualquier alteración en alguno de estos procesos puede llevar al fracaso de la reparación tisular. Los fibroblastos, por ser las principales células del periodonto, están en contacto directo con diferentes agentes agresores locales como son las endotoxinas bacterianas. Estas sustancias pueden alterar las principales funciones los fibroblastos y en consecuencia afectar la reparación de los tejidos periodontales. Este trabajo por ser un estudio *in vitro*, presenta la limitación principal de que los resultados no pueden ser extrapolados *in vivo*, donde otros factores esenciales como la respuesta inmune del huésped tiene un papel fundamental. Entender los procesos celulares es una tarea difícil por ello en los últimos años los estudios experimentales están empleado cada vez mas el cultivo de células como método eficaz para evaluar el comportamiento de las principales unidades biológicas de los seres vivos.

Los fibroblastos en cultivo, para mantener su viabilidad y multiplicarse, poseen la característica particular de necesitar de una superficie de contacto conocida como sustrato. Por otro lado, cualquier contacto con sustancias tóxicas que afecten los procesos celulares se reflejan en alteraciones de la morfología celular. El cálculo por ser un factor retentivo local podría actuar como un factor modificador de la superficie radicular, impidiendo la completa adhesión de los fibroblastos a su estructura.

El cálculo dental consiste de una porción orgánica y una inorgánica, la porción inorgánica está compuesta de calcio, fosfato, magnesio, potasio, flúor y carbonato de sodio. La calcificación puede comenzar con el acumulo de depósitos de cristales como la bruxita y fosfato de octocalcio, los cuales se transforman gradualmente en cristales de magnesio y apatita (4). La porción orgánica consiste en: bacterias, residuos bacterianos y productos celulares, com-

ponentes de la saliva y fluido gingival, siendo un reservorio de sustancias tóxicas, entre ellas endotoxinas. Las investigaciones sobre el rol del cálculo en la terapia periodontal han demostrado consistentemente que independientemente de la cantidad de cálculo residual después de diferentes tratamientos periodontales, existe una resolución clínica e histológica del proceso inflamatorio periodontal (12). Estos resultados sugieren que el cálculo tendría un efecto secundario en la enfermedad periodontal y su importancia reside mas bien en el hecho de albergar a bacterias de la placa.

La observación de las características morfológicas es una técnica simple y directa para la identificación celular (5). En el presente trabajo, la evaluación de las fotografías reveló la presencia de fibroblastos adheridos a la superficie del cálculo. Encontramos que en el 70% de las muestras predominaban fibroblastos de morfología achatada (escala=1) siendo que en el 30% restante encontramos una mixtura de células de morfología achatada y redondeada (escala=3). La caracterización morfológica de los fibroblastos determina que estas células pueden asumir aspectos fusiformes (células bipolares) o estrellados (células multipolares) cuando se encuentran adheridos al sustrato. Por tal razón, los fibroblastos achatados corresponderían a células de características morfológicas normales que mantienen sus propiedades de adhesión. Por otro lado, los fibroblastos de morfología redondeada pueden estar sufriendo alteraciones en su morfología por estar en proceso de mitosis o por haber perdido sus propiedades de adhesión debido a la acción directa de agentes agresores, sobre su estructura.

En el estudio de Allen y Kerr (1), con cerdos que recibieron cálculo esterilizado y no esterilizado, los autores observaron una reacción inflamatoria severa con formación de abscesos y supuración constante en los animales tratados con cálculo no esterilizado. Los animales con cálculo esterilizado presentaron reacción inflamatoria inicial. Ellos concluyeron que si los

microorganismos estuvieran asociados al cálculo, ocurrirá la formación de procesos infecciosos crónicos, mas si el cálculo es autoclavado, puede ser considerado como un irritante leve. Podemos presumir en base de esos estudios y en las observaciones realizadas en nuestro trabajo que el cálculo al ser autoclavado permite la eliminación de los microorganismos de la placa y en consecuencia la eliminación de sus productos tóxicos secretados (endotoxinas). Esto nos demuestra que el cálculo por si solo sería un agente local modificador de la superficie radicular pero esta característica no alteraría el normal funcionamiento y adhesión de los fibroblastos del ligamento periodontal. Por otro lado debemos recordar la eliminación de los microorganismos y sus toxinas en la enfermedad periodontal sólo puede ser obtenida mediante la eliminación del cálculo con procedimientos de raspaje y alisaje radicular. Por tal razón uno de los objetivos fundamentales de los procedimientos de raspaje sería la eliminación del cálculo como factor retentivo local de placa bacteriana. En el presente estudio concluimos que el cálculo esterilizado no influenció en la morfología de los fibroblastos.

## Referencias

1. Allen DL, Kerr DA. Tissue response in the guinea pig to sterile and non-sterile calculus. *J Periodontol* 1965;36(2):121-126.
2. Caffesse R, Sweeney P, Smith B. Scaling and root planning with and without periodontal flap surgery. *J Clin Periodontol* 1986; 13(3): 205-10.
3. Chawla TN, Nanda RS, Kapoor KK. Dental prophylaxis procedures in control of periodontal disease in lucknow (rural) India. *J Periodontol* 1975;46(8):498-503.
4. Driessens FCM, Verbeek RMH. Possible pathways of mineralization of dental plaque. In: *Recent advances in the study of dental calculus*. Ed. J.M. Ten Cate, Irl Press, 1989: 7-17.
5. Freshney R. Culture of animal cells: A manual of basic technique. 3era.

- Ed. New York: Wiley-Liss, 1994, p.201-10.
6. Fujikawa K, O' Leary T, Kafrawy AH. The effect of retained subgingival on healing after flap surgery. *J Periodontol* 1988;59(30):170-5.
  7. Gamal AY, et al. Human periodontal ligament fibroblast response of PDGF-BB and IGF-1 application on tetracycline HCL conditioned root surface. *J Clin Periodontol* 1998; 25:404-12.
  8. Jones W, O'Leary T. The effectiveness of in vivo root planning in removing bacterial endotoxin from roots of periodontally involved teeth. *J Periodontol* 1979,50(5) : 225-33.
  9. Kopic TJ, O'Leary TJ, Kafrawy AH. Total calculus removal: an attainable objective. *J Periodontol* 1990,61(10):16-20.
  10. Löe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol* 1965; 36(2):177-87.
  11. Mandel ID, Gaffar A. Calculus revisited: a review. *J Clin Periodontol* 1986,13:249-57.
  12. Mombelli A, et al. Clinical and microbiological changes associated with an altered subgingival environment induced by periodontal pocket reduction. *J Clin Periodontol* 1995;22(10):780-7.
  13. Nyman S, et al. Role of "diseased" root cementum in healing following treatment of periodontal disease. An experimental study in the dog. *J Periodont Res* 1986; 21: 496-503.
  14. Schöeder HE. Formation and inhibition of dental calculus. Suiza: Hans Huber Publishers Berne, 1969:212.
  15. Theilade E, et al. Experimental gingivitis in man II. A longitudinal clinical and bacteriological investigation. *J Periodontal Res* 1966;1(1):1-13.
  16. Waerhaug J. Epidemiology of periodontal disease. In : Workshop in periodontics. Ed. Ramfjord, S. P.; Kerr, D.A.; Ash, M. M. Michigan: Ann Harbor,1966:179-211.