

153
21



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

EFFECTO DE LA EXPOSICION DE ETANOL
EN LA ULTRAESTRUCTURA DE GERMENES
DENTARIOS DE RATON.

Titulo
Dalia Lopez Vujnovic

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
CIRUJANO DENTISTA
P R E S E N T A
DALIA LOPEZ VUJNOVIC

DIRIGIO: DR JUAN CARLOS HERNANDEZ GUERRERO.
DR. VICTOR MANUEL CASTAÑO MENESES.

ASESOR TECNICO: ELENA B. OLIVA RAMIREZ.



MEXICO, D. F.

1997

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A MI MAESTRA:

Q.F.B. ELENA B. OLIVA RAMÍREZ.
(Q.E.P.D.)

*La muerte no existe.
Si pierdes a un ser querido, no te desesperes:
ten la seguridad de que no ha muerto.
Sólo cambio de estado y , tarde o temprano,
lo encontrarás de nuevo.
Por eso, no lo decepciones,
huyendo de la lucha.
No pretendas ser superior a Dios:
acepta lo que Dios ha querido en su sabiduría,
y serás inmensamente feliz.*

AGRADECIMIENTOS:

A la Universidad Nacional Autónoma de México, Mi Alma Mater.

A la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología.

Al Instituto de Física.

Al Departamento de Física Aplicada y Tecnología Avanzada (FATA).

Al Dr. Juan Carlos Hernández G.

Al Dr. Victor M. Castaño Meneses.

A PAPIIT UNAM No.201293 por el aporte de los especímenes.

A los que participaron en una forma indirecta para la realización de ésta tesis:

Ing. Jorge Y. Anistro Jiménez.

M. en C. Gabriela Castaño Meneses.

M. en C. Marta Corona Tinoco.

Tec. Tomás Cruz Menéndez.

M. en C. Luis Flores Morales.

M. en C. José Guzmán Mendoza.

Dr. Luis F. Jiménez García.

M.en C. Salvador Jiménez García.

M. en C. Rosa Ma. Lima García.

Med. Cj. Durdica López Vujnovic.

Lic. en Leng. Guadalupe Mendiola G.

Tec. Pedro Mexía Hernández.

M.en C. Beatriz Millán Melo.

C.D. Galdino Ramirez Hernández.

Ing. Everardo Rentería Escalona.

Dr. José Reyes Gasca.

A mis padres y amigos por su comprensión y apoyo.

INDICE

Resumen.	1
1.0 Introducción.	2
2.0 Metabolismo Ultraestructural de Etanol.	4
2.1 Relación entre el Metabolismo y la Oxidación de Etanol.	4
2.2 Metabolismo de Etanol.	4
2.3 Energía Libre y Fosforilación Oxidativa en Mitocondrias.	5
2.4 Toxicología.	8
3.0 Síndrome del Feto Alcohólico.	9
3.1 Síndrome del Feto Alcohólico.	9
3.2 Efectos Teratogénicos del SAF.	10
3.2.1 Alteraciones del SNC.	10
3.2.2. Deficiencias del Crecimiento y Desarrollo.	10
3.2.3. Alteraciones Faciales.	11
3.3 Metabolismo Transplacentario de Etanol.	11
3.4 Diagnóstico de SFA.	12

3.5 Diagnóstico Diferencial de SFA.	12
3.6 Pronóstico de SAF.	13
3.7 Esquema Preventivo de SFA.	13
4.0 Odontogénesis y Amelogénesis.	14
4.1 Odontogénesis.	21
4.2 Bioquímica de la Odontogénesis.	22
4.3 Diferenciación Bioquímica en la Odontogénesis.	23
4.4 Amelogénesis.	26
4.5 Biomoléculas Fundamentales de la Amelogénesis.	34
5. 0 Planteamiento del Problema.	35
6.0 Justificación del Estudio.	37
7.0 Hipótesis.	38
8.0 Objetivos Generales.	39
8.1 Objetivos Específicos.	39
9.0 Material y Método.	40

9.1 Material.	40
9.1.1. Especímenes.	40
9.1.2. Material de Vidrio.	40
9.1.3. Material Diverso.	40
9.1.4. Reactivos y Substancias.	40
9.1.5 Equipo.	41
9.2. Método.	41
10. Resultados.	43.
10.1 Ultraestructura de Ameloblastos para Grupo Control y Experimental.	43
11.0 Análisis Estadístico de Resultados.	54
12.0 Análisis Fenomenológico de Resultados.	56
13.0 Discusión.	58
14.0 Conclusiones.	63
15.0 Recomendaciones.	64
16.0 Bibliografía.	65
17.0 Apéndice. Principios de MET	79

RESUMEN.

Se llevaron a cabo estudios de caracterización ultraestructural por Microscopía Electrónica de Transmisión en especímenes de ratones hembras , sometidas a una dieta con ingesta alcohólica antes y durante el periodo completo de gestación con el propósito de observar los efectos sobre la Amelogénesis de las crías. Estos estudios se realizaron a nivel celular, específicamente en las mitocondrias de los ameloblastos, a través de la preparación ultramicrotómica y la tinción preferencial de las muestras.

Se hicieron mediciones de la distribución de tamaño de las mitocondrias tanto en muestras control y en muestras afectadas encontrándose una dispersión significativa en la curva normal asignada a los especímenes alcoholizados respecto a los no alcoholizados. Dicha dispersión se obtuvo relacionando el área inicial medida por microscopía de la mitocondria contra el porcentaje de daño por etanol. Por otro lado, los cambios de energía libre muestran que existe un incremento en el transporte de H^+ a través de la membrana mitocondrial , provocando con esto la destrucción de la misma y un consecuente desequilibrio en la actividad de los organelos celulares, entre los que se encuentra el Reticulo Endoplásmico rugoso , el cual está relacionado con la síntesis de la amelogenina , precursora del esmalte.

1.0. INTRODUCCIÓN.

Con el descubrimiento del Microscopio Electrónico¹⁻¹⁰, ciencias como la Odontología Medicina , Biología y Ciencia de Materiales , por mencionar sólo algunas , se ha evolucionado en el estudio ultraestructural de la materia , tanto viva como inerte . Así , se puede tanto observar la ultraestructura celular en los seres vivos ^{11,12} , como la estructura cristalina de los materiales ^{13,14}

Como resultado de esto , el Microscopio Electrónico resultò ser el medio de enlace de diferentes campos científicos que durante siglos seconsideraron completamente independientes unos de otros. Con esto , muchos de los mecanismos que controlan la funcionalidad de los seres vivos se han aclarado en cuanto a ultraestructura celular se refiere . Aún más importante, fue el comienzo de lo que se conoce como manipulación ultraestructural dado que ya no fue necesario estudiar alguna droga administrada a un sujeto y esperar sus consecuencias sistémicas . Por ejemplo , se pudieron comenzar a formular hipótesis acerca de los efectos de drogas (Efectos de Etanol en el Síndrome del Feto Alcohólico) sobre organelos específicos dentro de una célula en conjunto con los receptores moleculares , lo que genera la Bioquímica Molecular con el consecuente nacimiento de la Ingeniería Genética . Así mismo , y también gracias al descubrimiento del Microscopio Electrónico , sabemos ahora que los procesos inherentes a los materiales inorgánicos pueden controlarse y con esto , controlar la función de las membranas celulares in vitro y así , estudiar la ultraestructura de las células . En consecuencia , las distancias que separan las fronteras de la bioquímica molecular y la química de los materiales se han acortado.

Una consecuencia del acercamiento de estas fronteras sobre la Odontología , surge del hecho de que la Amelogénesis¹⁷ es un mecanismo a nivel ultraestructural dentro de la célula viva (ameloblastos) , el cual se inicia con el transporte electrónico^{11,12} a través de la membrana mitocondrial y el aporte de energía por parte del ATP al Reticulo Endoplásmico y al Aparato de Golgi^{11,12}, generador del esmalte dental^{15,16} , cuya composición es típica de la de un material inorgánico de naturaleza cerámica¹⁸. Esto abre nuevas y amplias posibilidades en el estudio de la Odontología, ya que la investigación a nivel ultraestructural de las mitocondrias mediante el uso de Microscopia Electrónica puede emplearse para comprender la naturaleza de los esmaltes en los diferentes tipos de dientes de diversos organismos vivos y con ello , crear un enlace entre los niveles ultraestructurales y las diferentes patologías de la estructura dental (por ejemplo : caries , desmineralización del esmalte). En México , destacan los trabajos en Odontología realizados por el Dr. J. C. Hernández G.¹⁹ , quien estudia parámetros que influyen en el Síndrome del Feto Alcoholizado.

En el presente trabajo , se estudia el efecto del Síndrome del Feto Alcoholizado sobre la Amelogénesis en crías de ratas alcoholizadas desde el punto de vista de la ultraestructura celular y se plantea una hipótesis basada en las alteraciones que producen los metabolitos del alcohol en los mecanismos bioquímicos de la mitocondria . Mediante microfotografías de Microscopia Electrónica de Transmisión se observan lesiones en los organelos de los ameloblastos, específicamente en mitocondrias , lo cual se podría deber a reacciones exógenas alteradas , que provocarían un aumento descontrolado de energía y su consecuente repercusión en el metabolismo ultraestructural de los ameloblastos

2.0. METABOLISMO ULTRAESTRUCTURAL DE ETANOL.

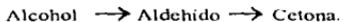
Los efectos clínicos tanto odontológicos como médicos no se deben a la molécula de etanol , más bien son consecuencia de la generación de los productos de reacción del mismo , conocidos como metabolitos y que a nivel ultracelular son específicamente los siguientes : NADH , acetaldehídos y cetonas. Así , los estudios para comprender dichos efectos deben incluir como parte central , las interacciones de los metabolitos con la célula viva , que en el caso del presente estudio serán enfocados a nivel mitocondrial. Sin embargo , para poder establecer los mecanismos de transporte a través de la membrana mitocondrial , es necesario ilustrar la secuencia de reacciones del metabolismo del alcohol

2.1. Relación entre el Metabolismo y la Oxidación de Etanol.

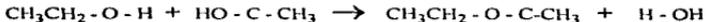
El etanol (fórmula química C_2H_6O) existe en la naturaleza como producto de la fermentación de algunos organismos vivos , este hecho sugiere que dicho compuesto está involucrado en algunos mecanismos ultracelulares formando parte del ciclo natural para el funcionamiento adecuado de la célula. Sin embargo , la regulación de las concentraciones de etanol en estos procesos de naturaleza bioquímica pueden ser alterados por agentes externos , uno de los cuales es la ingesta de alcohol.

2.2. Metabolismo del Etanol.

La secuencia más aceptada para el metabolismo ultraestructural del etanol es la siguiente ²⁰



Esta secuencia puede expresarse en término de sus fórmulas desarrolladas de acuerdo a las siguientes reacciones. 21



y además



2.3. Energía Libre y Fosforilación Oxidativa en la Mitocondria.

Basándonos en las reacciones anteriores y en los datos reportados para los potenciales estándar de óxido - reducción de muchos pares redox biológicamente importantes 12 , podemos calcular fácilmente el cambio de energía libre con la ecuación :

$$\Delta G = - F\Delta E_0$$

Entonces , para la fosforilación oxidativa , la fuerza directriz es el potencial de transferencia de electrones del NADH o del FADH₂ , y en condiciones normales se tiene que 12:

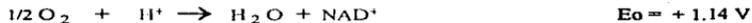




Por otro lado , si invertimos la segunda reacción obtenemos :



y la sumamos a la primera reacción , se obtiene :

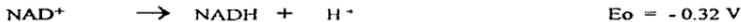


Con lo cual la energía libre de esta reacción viene dada por :

$$\Delta G = - (2) (23.06) (1.14) = - 52.6 \text{ kcal / mol}$$

La cual es la energía desprendida para el transporte electrónico en condiciones normales para la fosforilación oxidativa en la mitocondria.

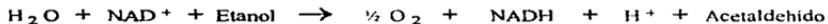
Consideremos ahora el efecto de etanol sobre la transferencia de electrones y calculemos la energía desprendida por el mismo y sus metabolitos. Así :



Con lo cual , la secuencia de reacciones es la siguiente :



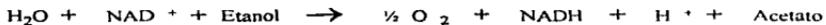
$$\Delta G = - 61.82 \text{ kcal / mol}$$



$$\Delta G = - 61.82 \text{ kcal / mol}$$



$$\Delta G = - 27.67 \text{ kcal / mol}$$



$$\Delta G = - 89.5 \text{ kcal / mol}$$

2.4. Toxicología.

Los efectos toxicológicos de la ingesta de alcohol en el ser humano , así como las consecuencias socioeconómicas ²²⁻²⁵ , sobre los individuos que padecen esta enfermedad han sido motivo de numerosos estudios con el fin de establecer los factores causales que desencadenan el Síndrome de Dependencia al Alcohol ²⁶. Estos efectos toxicológicos se reflejan en una depresión del Sistema Nervioso Central (SNC) , alteraciones en el aparato digestivo , glándulas endócrinas , en el metabolismo y funciones bioquímicas a nivel ultracelular . Por otro lado , una intoxicación aguda trae como consecuencia edema cerebral , hiperemia y edema del aparato digestivo , además , la ingesta crónica incluye cambios degenerativos en hígado , riñones y cerebro ²⁷ ; gastritis atrófica , cirrosis hepática , tolerancia , Síndrome de Wernicke - Korsakoff , dependencia física y alteración de sueño ²⁸

3.0. SÍNDROME DEL FETO ALCOHOLIZADO (SAF)

3.1. Síndrome del Feto Alcoholizado.

Se han desarrollado estudios acerca del alcoholismo durante el embarazo desde hace varias décadas , sin lograr unificar los criterios acerca de los diferentes efectos teratogénicos que se manifiestan durante el desarrollo embrional en madres alcohólicas. Sin embargo , Jones y Smith ²⁹ en su artículo seminal acerca del Síndrome del Feto Alcoholizado (SAF) , describen una embriofetopatía en hijos de madres que presentaron alcoholismo crónico y con sus estudios logran englobar las características necesarias para establecer una definición de SAF. Ellos se basan en tres características principales que son : microcefalia , deficiencia en el crecimiento prenatal y fisuras parpebrales.

En base a los estudios realizados ³⁰⁻⁴⁷ , el Síndrome del Feto alcoholizado puede considerarse como un patrón característico en el que el producto presenta embriofetopatías debido a un teratígeno (etanol y sus metabolitos *) que se manifiesta como malformaciones congénitas.

Un revisión detallada de SFA se encuentra en el trabajo de Arias R. E. ⁴⁸.

*** existen controversias acerca de los componentes verdaderos que generan la embriofetopatía, si es el etanol por sí mismo o sus metabolitos.**

3.2. Efectos Teratogénicos en SFA.

Los estudios realizados acerca de las diferentes alteraciones descritas en 49-51 muestran que éstas pueden agruparse de acuerdo a :

1. Alteraciones del Sistema Nervioso Central.
2. Deficiencias del crecimiento y desarrollo.
3. Alteraciones faciales

3.2.1. Alteraciones del Sistema Nervioso Central.

Uno de los más serios problemas asociado con la teratogenicidad del alcohol es el retraso mental ^{30,37,39,46,51,52} , lo que se manifiesta IQ's entre 16 y 105 , alteraciones en el desarrollo neuronal , que pueden manifestarse en el recién nacido como irritabilidad, hiperactividad , temblores , aparente hiperacusia , hipertonia de los miembros y displasia cerebral. Tanto la hiperactividad como la hiperkinesia se manifiestan tanto en la edad escolar como en la adolescencia.

3.2.2. Deficiencias del Crecimiento y Desarrollo.

En cuanto al crecimiento fetal , existe deficiencia tanto en el peso como en la longitud. En cuanto al peso , existen dos desviaciones en función del promedio normal , la primera es una disminución del peso promedio , la cual podría estar relacionada con la desnutrición materna más que con la ingesta de alcohol ⁵³ ; la segunda , nacimiento prematuro ⁵⁴ .

3.2.3. Alteraciones faciales.

En cuanto a alteraciones faciales se refiere, existe una tesis de Arias ⁴⁸ la cual discute en forma detallada las mismas

3.3. Metabolismo Transplacentario de Etanol.

Los estudios realizados tanto en animales como en humanos muestran que el metabolismo transplacentario se relaciona en forma íntima con el Síndrome del Feto Alcoholizado ^{51,55-63}. Siendo el etanol un compuesto orgánico de cadena muy corta, la polarización de la misma es limitada, por lo cual se favorece su solubilidad en solventes no polares, como consecuencia de esto puede atravesar libremente las membranas celulares y distribuirse, después de atravesar la placenta, en el líquido amniótico ⁵¹ y así difundirse hacia todos los líquidos y tejidos del feto. Los efectos teratogénicos descritos anteriormente, ocurren debido a la mayor afinidad del etanol a permanecer en los tejidos del feto respecto a los de la madre. Si bien la circulación materna y fetal son independientes ⁵¹, la libre distribución del etanol hacia los tejidos fetales, aunado a la inmadurez de las enzimas fetales hepáticas, en particular la alcohol deshidrogenasa, favorecen estos efectos teratogénicos a través de la serie de reacciones metabólicas del etanol en acetaldehídos y cetonas ⁵⁵. Esto provocará, durante la diferenciación celular, que algunos de los organelos celulares y en lo que aquí nos ocupa, las mitocondrias de los ameloblastos, generadores del esmalte, tengan cambios energéticos, provocando así alteraciones en la Amelogénesis.

Por otro lado, y con el descubrimiento de nuevas técnicas de caracterización, se ha observado que las tres características antes mencionadas son suficientes únicamente para definir SAF en base a estudios fenomenológicos y que no contemplaron en su momento, las vías ultraestructurales mediante las cuales se desarrollan estas tres características ⁵⁰.

Definimos entonces , desde el marco de este estudio al Síndrome del Feto Alcoholizado como:

Síndrome del Feto Alcoholizado. *Proceso que involucra deficiencia en el crecimiento y desarrollo prenatal y posnatal , que ultraestructuralmente se manifiesta como efectos teratogénicos debidos al alcohol , afectando el transporte de energía a través de membranas semipermeables , por tanto , el aporte de la misma a los diferentes organelos celulares.*

3.4. Diagnóstico de SAF.

Los estudios realizados con el fin de elaborar una historia clínica tendiente a diagnosticar SAF , se basan en los niveles de concentración en la circulación fetal de una proteína conocida como alfa fetoproteína . Rojas y Hicks ⁵¹ predicen también el riesgo a desarrollar SAF en madres que ingieren alcohol en función de la concentración de esta proteína con una exactitud del 59%. Por otro lado , se han considerado de importancia para el diagnóstico de riesgo materno - fetal se consideran de importancia los siguientes parámetros⁶⁴ : las cantidades ingeridas de etanol durante la gestación y el tiempo transcurrido de la misma y los medicamentos utilizados.

3.4. Diagnóstico Diferencial de SAF.

Los distintos síndromes susceptibles de confusión clínica son los siguientes : Síndrome de Rubinstein - Taybi , Síndrome de hidantoico , Síndrome de Noonan , Síndrome de Cornelia de Lange , Síndrome de Smith - Lemli - Opitz , Trisomía 18 , Blefarofimosis familiar. Para detalles acerca de estos síndromes , se puede consultar ⁶⁵.

3.6. Pronóstico de SAF.

De acuerdo a las estadísticas obtenidas de madres embarazadas con ingesta alcohólica , más del 50% de los productos de dichas madres van a presentar alteraciones. En base a estas estadísticas , y conociendo las numerosas alteraciones , dentro de las cuales destacan las deficiencias en el desarrollo y numerosas disfunciones del sistema nervioso central , se ha observado una incidencia mayor de alteraciones cuando la ingesta se da en el primer trimestre , y como es en éste periodo cuando ha ocurrido la diferenciación celular , con el consecuente desarrollo de las capas germinales , precursoras de los diferentes tejidos y sistemas entre los que se encuentra el sistema nervioso . enfatizaremos nuevamente que los efectos del alcoholismo materno durante el embarazo han establecido con bases firmes la acción teratogénica del alcohol por lo cual , el pronóstico en cada paciente dependerá del grado de lesión producido durante el embarazo , mismo que está en función de la ingesta alcohólica de la madre y al periodo de embarazo en el cual se encuentre. Todo esto repercute , sin duda , en el producto , no pudiéndose especificar cual va a ser el pronóstico exacto de cada individuo.

3.7. Esquema Preventivo de SAF.

Las estrategias para prevenir SAF en México podrían ser : difusión de los centros psicoterapéuticos existentes con el fin de lograr una higiene mental a nivel nacional , desarrollo de una concientización de la comunidad que abarque medidas profilácticas , investigación exhaustiva de SAF desde diferentes enfoques tales como el científico , socio-económico entre los más importantes.

4.0. ODONTOGÉNESIS Y AMELOGÉNESIS.

El esmalte dental es un material sin vida , muy duro y casi totalmente inorgánico ¹⁶. Los odontoblastos se encuentran en una capa cerca de la pared interna de la dentina , la cual es muy parecida al hueso y contiene filamentos protoplásmicos de materia viva. La matriz orgánica del esmalte es sintetizada por las células (ameloblastos) derivadas del epitelio estratificado de la cavidad bucal primitiva.

Las proteínas del esmalte son función de la edad del diente , (inmaduro y maduro). Las diferencias contemplan :

1. Contenido total de proteínas.
2. Solubilidad.
3. Composición en aminoácidos.

Durante la maduración del diente existe una pérdida absoluta entre el 90 y 100% del peso de las proteínas del esmalte ignorándose las causas de este hecho. En el diente humano , la mayor parte de las proteínas del esmalte es soluble en ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), aunque entre el 85 y 100% del esmalte en fetos es insoluble en agua y EDTA.

Antes de iniciar la discusión de la Odontogénesis , es conveniente citar el libro Azar y Necesidad ⁶⁶ , especialmente el capítulo Ontogénesis Molecular. En este capítulo se hace notar que:

" La causa por la que se forman en la célula estructuras de un orden cada vez mayor debe buscarse finalmente en la información contenida en el DNA , la cual determina la secuencia primaria de la cadena polipéptica de las proteínas , la que a su vez determina las estructuras secundarias y terciarias y la formación de complejos oligoméricos cuaternarios".

Por otro lado , es bien conocido que la interacción entre diferentes proteínas y proteínas con lípidos o ácidos nucleicos da como resultado la formación de complejos macromoleculares y estructuras mucho más complejas. Con respecto a esto De Robertis y De Robertis ⁶⁷ opinan lo siguiente:

" Un problema fundamental es determinar por cuales mecanismos se originó esta organización supramolecular en nuestro planeta para dar lugar a la formación de las células procarióticas y eucarióticas".

Cualquier explicación sobre este tema debe considerarse como especulativa , ya que está directamente relacionada con el origen de la vida.

De lo antes expuesto , parece lógico iniciar la discusión de la Odontogénesis a partir de las capas embrionarias , específicamente en el ectodermo , el cual tiene la función de diferenciar las células que generan los tejidos precursores de la dentina y el esmalte. También está establecido que el esmalte se forma a partir del órgano dental epitelial u órgano del esmalte. En referencia a esto podemos citar a Lazzari ¹⁶ :

" Los ameloblastos derivan de parte del epitelio ectodérmico que reviste la cavidad bucal. La dentina y la pulpa se forman a partir de la papila dental , la cual deriva de la mesénquima que se condensa y reside en parte , en el interior del órgano dental epitelial en forma de copa invertida. El mesénquima es un tejido embrionario no especializado , que es la fuente de todo tejido conectivo. Células , fibras , líquido tisular y sustancia fundamental amorfa son los componentes del tejido conectivo. El órgano dental epitelial y su papila dental subyacente están revestidas por el folículo del tejido conectivo : el saco dental. El cemento , ligamento periodontal y parte del hueso alveolar derivan del saco dental. Así , el órgano dental epitelial , la papila dental y el saco dental producen todos los componentes de los dientes , con exclusión del nervio y el suministro vascular. Los tejidos bucales contienen varios componentes químicos que reflejan su origen del tejido epitelial y conectivo y su estructura derivada de estos tejidos. Estas sustancias químicas comprenden mucopolisacáridos , glucoproteínas , mucinas y ciertas enzimas."

Lazzari ¹⁶ establece también un esquema histogénico del diente de acuerdo a la figura de la página siguiente .

Esquema del desarrollo del diente.

Epitelio Ectodérmico	Lámina Dental	Órgano Dental Epitelial.	Epitelio Dental Externo. Reticulo Estrellado. Estrato Intermedio Epitelio Dental Interno (ameloblastos)	Esmalte. Membrana de Nasmyth Vaina Epitelial de Hertwig.
		Papila Dental	Odontoblastos Fibras de Korff Vasos sanguíneos	Dentina Pulpa
Mesodermo		Saco Dental	Osteoblastos Fibroblastos Cementoblastos	Alvéolo Membrana Peridental Cemento.

Éste esquema sugiere la gran complejidad de la histogénesis dental , sin embargo , puede decirse que durante la gastrulación (aparición de dos o más capas de células) o generación de las capas germinales , ocurre la Odontogénesis , ya que el cuerpo de los animales superiores consta de varias capas de tejidos y órganos que pueden tener su origen en estas tres capas : ectodermo , mesodermo y endodermo . Es claro ahora que la Odontogénesis tiene su origen durante el desarrollo embrionario.

Cualquiera que sea el origen de las capas germinales (ya sea por difusión nuclear diferencial , actividad diferencial de los genes o inducción enzimática) , la morfogénesis es un proceso demasiado complejo que escapa al alcance de este trabajo y que pertenece a tópicos de Embriología e Ingeniería Genética. Partimos entonces de los procesos generados en el ectodermo y mesodermo para explicar la Odontogénesis y Amelogénesis.

Iniciaremos esta discusión a partir de la división celular en donde el citoplasma se segmenta sin crecimiento. Luego se forma la bástula , una esfera hueca donde los tejidos aún no son evidentes. Posteriormente algunas células se invaginan y se produce una serie de movimientos y migraciones celulares que corresponden a la gastrulación. Respecto a esto Robertis y Robertis ⁶⁷ afirman lo siguiente :

"En la gástrula aparecen ya los primeros signos de diferenciación morfológica. En términos moleculares , la diferenciación celular significa actividad genética variable entre las células del mismo organismo. La especialización de las células implica la síntesis preferente de proteínas específicas y con esto , las células eucarióticas expresan un porcentaje (; aunque pequeño , representativo !) de los genes que contiene."

Sin embargo , no todos los genes son específicos para un tejido. Algunos , denominados genes de mantenimiento , podrían tener actividad en todo tipo de células. Ejemplo de este tipo de genes son los necesarios para la construcción de membranas , ribosomas , mitocondrias y enzimas glicolíticas , que son componentes comunes a todos los tipos de células.

Se sabe también , que todos los núcleos embrionarios en sus comienzos son genéticamente equivalentes , por lo cual , las diferencias iniciales se deben hallar en el citoplasma que heredan. Se dice que el citoplasma contiene determinantes citoplásmicos del desarrollo , que en algún momento se distribuyen de forma desigual entre las células de un embrión , y por lo tanto , cambian la actividad de los genes , pero no se conoce el mecanismo por el cual estos determinantes son segregados en forma desigual en los embriones durante la segmentación. Además , agregan Robertis y Robertis ⁶⁷.

"Esta diferenciación celular puede ser inducida por estímulos externos y una vez establecida , puede persistir en ausencia de estos estímulos".

En muchos casos , antes de que sea posible reconocer morfológicamente que una célula se ha diferenciado , existe un periodo en el cual la célula establece la determinación y seguirá un camino específico hacia la diferenciación morfológica franca.

Así , si la información contenida en los núcleos es idéntica , entonces las diferencias iniciales entre las células estarán en el citoplasma que heredan. No obstante estas diferencias iniciales no explican todo el desarrollo , pues a medida que éste avanza , las interacciones celulares se vuelven cada vez más complejas.

Durante la gastrulación existen extensos movimientos y migraciones celulares , y diversos tejidos celulares interactúan entre sí en un proceso conocido como inducción embrionaria . Las células que se invaginan en el blastóporo forman una capa celular denominada mesodermo , el cual pronto se divide en una región central o notocordio y dos regiones laterales. El notocordio induce al ectodermo que lo recubre a transformarse en otros tejidos , tal como el tejido neural. Estas inducciones son medidas por sustancias difusibles pero a pesar de los grandes esfuerzos por aislarlas , se desconoce su naturaleza química.

Por otro lado , el núcleo y el citoplasma son interdependientes , uno no puede vivir sin el otro. Mientras que el citoplasma suministra la mayor parte de la energía de la célula por medio de la fosforilación oxidativa (la cual ocurre en las mitocondrias en su mayoría) y posee además la "maquinaria" para la síntesis proteica (ribosomas) , el núcleo por su parte aporta ARN , así , el citoplasma puede reprogramar la actividad de los genes nucleares , cuando en el mismo existan cambios producidos por agentes externos.

Una vez establecida la diferenciación celular , estas células se organizan en modelos reconocibles y característicos para desempeñar funciones especializadas y en forma colectiva. Estas organizaciones celulares se conocen como tejidos. Dichos conjuntos celulares se reducen a cuatro tejidos fundamentales 17 .

1. Tejido Epitelial o Epitelio.
2. Tejido Conjuntivo.
3. Tejido Muscular.
4. Tejido Nervioso.

Cada una de las tres capas germinales del embrión en desarrollo contribuye a la formación de estructuras epiteliales , siendo los derivados de estas tres capas germinales el ectodermo , dividido a su vez en ectodermo de superficie y en neuroectodermo que origina al tubo neural y a la cresta neural. Así , Robertis y Robertis ⁶⁷ establecen lo siguiente:

" El ectodermo de superficie deriva a su vez el órgano del esmalte y el esmalte dentario , mientras que el desarrollo dental se origina en el neuroectodermo por influencia inductora del mesénquima , el cual se origina a su vez en la cresta neural , en la región cefálica".

Con todas estas bases , podemos ahora iniciar formalmente con la Odontogénesis.

4.1. Odontogénesis.

La mayor parte del diente está formado por la dentina , que consiste de aproximadamente 70% de hidroxapatita y 30% de material orgánico , del cual el 90% es colágeno y el resto son otras proteínas como fosfoproteínas y glucosaminoglucanos. Las células que producen la dentina se llaman odontoblastos y son de forma cilíndrica con una larga prolongación citoplásmica , llamada Proceso Odontoblástico o Fibra de Tomes. El cuerpo celular se localiza en la superficie de la dentina , específicamente en la preentina , mientras que la Fibra de Tomes se extiende dentro de la dentina. El espacio que contiene los procesos odontoblásticos se llama túbulo dentinal y se extiende a través de todo el espesor de la dentina. El citoplasma del odontoblasto contiene muchos organelos del tipo de los hallados en las células sintetizadoras de colágeno , a saber : Reticulo Endoplásmico Rugoso (REr) abundante , Aparato de Golgi prominente , gránulos de secreción , mitocondrias y ciertas vesículas.

El Aparato de Golgi contiene un precursor colágeno de forma filamentosa. La disposición ordenada de gránulos , los cuales contendrían calcio , sobre los filamentos de ciertas vesículas de Golgi , maduran por condensación hacia gránulos de secreció , iniciándose así el proceso odontoblástico. Los odontoblastos se diferencian a partir de células de la periferia de la papila dentaria. Las células precursoras tienen el aspecto de células mesenquimáticas típicas. Es decir , poseen escaso citoplasma. En su diferenciación hacia odontoblastos , aumenta el volumen citoplásmico y los organelos característicos de las células sintetizadoras de colágeno. Las células forman una capa en la periferia de la papila dentaria y secretan la matriz orgánica de la dentina llamada predentina por su polo apical (extremo celular opuesto al que está en contacto con la papila dentaria) A medida que aumenta el espesor de la predentina , los odontoblastos son desplazados hacia el centro del diente. Una onda de mineralización , que podría tener su origen en el transporte enzimático , sigue el retroceso de los odontoblastos y convierte la predentina en dentina , que es la matriz mineralizada. Por otro lado , la pulpa dentaria está compuesta de odontoblastos en su perímetro (células asociadas a la dentina) , fibroblastos , macrófagos , mastocitos y células migratrices de la sangre. Finalmente el cemento es un tejido mineralizado que cubre la raíz del diente.

4.2. Bioquímica de la Odontogénesis.

Davis ⁶⁸ establece que la Odontogénesis incluye una serie de sucesos en secuencia. Establece además que las interacciones entre el epitelio y el mesénquima al parecer tienen lugar en una serie de eventos preprogramados propios de las células que participan o de los componentes moleculares de la matriz extracelulares o de ambos.

Las etapas incluidas en su estudio son :

1. Citodiferenciación.
2. Histodiferenciación.
3. Morfodiferenciación.
4. Diferenciación Bioquímica.
5. Síntesis y Secreción de Colágena y otros componentes de la matriz.
6. Mineralización , calcificación y osificación.
7. Crecimiento por oposición.
8. Organogénesis.
9. Erupción.

De todas estas etapas , es de suma importancia en la Odontogénesis la diferenciación bioquímica , la cual se discute a continuación.

4.3. Diferenciación Bioquímica en la Odontogénesis.

Lazzari ¹⁶ propone.

" La proteína dentinal tienen una composición en aminoácidos distintivos de colágena y no se ha observado diferencia importante en la composición de aminoácidos cuando el diente madura , en combinación con la colágena la matriz dentinal tiene un componente fosfoprotéico que probablemente está enlazado covalentemente a la colágena por medio de un enlace glucosídico-hidroxisilina. El análisis de la fosfoproteína muestra un contenido de ácido aspártico , serina y fosfato de serina , además de hidroxilisina ,

aunque aún no se sabe la función de la fosfoproteína , se sugiere que éstas son solubles y junto con la matriz podrían desempeñar un doble papel ; colocar el depósito del mineral en la matriz e inhibir la calcificación de la predentina.

En los tejidos conectivos extracelulares , la colágena es la proteína mayor y funciona como proteína estructural que sirve esencialmente como el principal soporte mecánico de los tejidos. Se cree que la colágena consiste de tres cadenas dispuestas linealmente en una hélice , por otro lado , la colágena del tejido mesenquimatoso aparece formada por fibrillas que presentan estrías transversales. Químicamente la colágena contiene glicina , prolina e hidroxiprolina. Los mecanismos biológicos de la biosíntesis de la colágena son similares a los mecanismos que conducen a la biosíntesis de otras cadenas de polipéptidos protéicos. Estos polipéptidos protéicos son sintetizados por componentes que se encuentran en las fracciones microsómicas y solubles de la célula , y se reúnen en agregados de ribosomas por diferentes interacciones entre las que se encuentran las caracterizadas por la fuente de energía o sistema generador de ATP."

De lo anteriormente expuesto se puede deducir que durante el proceso de la Odontogénesis ocurre la síntesis del 30% de matriz orgánica de la dentina , lo cual involucra entre otras cosas el suministro de energía por parte de las mitocondrias en forma de ATP a las células especializadas para la Odontogénesis.

Así , la biosíntesis de los componentes de la colágena tiene estrecha relación con la síntesis del ATP generado en las mitocondrias durante la fosforilación oxidativa.

Esto sugiere que en la formación biosintética de los componentes de la colágena entran en juego enzimas fosforiladas , con lo cual el enlace entre la fosforilación oxidativa que ocurre en las mitocondrias y la Odontogenesis puede ahora establecerse.

Consideremos la transferencia enzimática de grupos fosfato al ADP. Desde el punto de vista del metabolismo , dice Lenninger 11:

" Existen dos clases de fosfatos de alto contenido energético , en los cuales los cambios de energía libre de hidrólisis es más negativa que la del ATP , y que podrían servir , por tanto , como donadores de fosfato para el ADP. Los miembros del primer grupo , entre los que se encuentran al 3- fosfogliceril-fosfato y el fosfoenolpiruvato , se generan durante la degradación enzimática , liberadora de energía o catabolismo de las moléculas combustibles. Los miembros del segundo grupo , entre los que encontramos a la fosfocreatina y la fosfoarginina , actúan como depósitos de energía química .

El que exista transferencia de grupos fosforicos desde el ATP al ADN sugiere que , el ATP puede ceder su grupo fosfato terminal a una gran variedad de moléculas capaces de aceptar el fosfato en reacciones catalizadas por enzimas específicas , dando como resultado una transferencia de un grupo fosfato desde el donador de alta energía al aceptor de baja energía , convirtiéndose éste último en un compuesto con mayor contenido de energía. Además , en casi todas las reacciones de transferencia de fosfato entre los metabolitos , el ADP desempeña el papel de aceptor intermediario , mientras que el ATP de donador intermediario. Continuando con Lenninger 11:

"Aunque el sistema ATP - ADP es el transportador obligatorio de grupos fosfatos en el flujo principal de transferencia de la energía celular , intervienen también otros fosfatos que desempeñan no solamente el papel de precursores energéticamente activos , sino que canalizan también grupos fosfato de contenido energético elevado hacia otras reacciones biosintéticas específicas. Todos estos canales se conectan con el ATP a través de la enzima

nucleotido-difosfato-quinasa , que se encuentra en las mitocondrias y en el citoplasma soluble de las células".

Con esto se ha establecido la interrelación entre la biosíntesis de los compuestos formadores de colágeno y la fosforilación oxidativa , faltando por establecer la ruta biosintética de la parte inorgánica de la dentina , la cual está compuesta por hidroxiapatita. Cualquiera que sea la biogénesis de la parte inorgánica de la dentina , bien por nucleación homogénea o por nucleación heterogénea ; la calcificación , proceso donde se involucra la precipitación tanto de iones calcio como de iones fosfatos , así como residuos de hidroxilo generará la hidroxiapatita , componente principal de la dentina.

Queda así establecida la importancia de la fosforilación oxidativa en el proceso de Odontogénesis y por tanto el papel desempeñado por la mitocondria en la misma.

Un estudio mas profundo puede encontrarse en la bibliografía sobre el tema 15-17, 67 -82

4.4. Amelogénesis.

La Amelogénesis tiene su inicio en el ectodermo superficial donde se forman los ameloblastos , los cuales en conjunto con otras células del órgano del esmalte , producen al mismo. A este respecto Ross 17 dice:

" Las principales etapas de la Amelogénesis son el período de producción de la matriz o estado secretorio y el período de maduración. También hay varias etapas transicionales o subestadios".

Lazzari ¹⁶ se refiere a la Amelogénesis en los siguientes términos :

" Se puede considerar que la Amelogénesis ocurre en dos fases conspicuas : 1) formación de matriz orgánica , 2) maduración del esmalte ".

Davis ⁶⁸ , por otro lado , divide la Amelogénesis en formación de matriz orgánica , calcificación de la matriz y resorción de la matriz del esmalte.

Reith ⁸³ , al referirse a la Amelogénesis dice :

" A pesar del gran número de artículos que se refieren a la ultraestructura de la formación del esmalte , la biología de la Amelogénesis está muy lejos de ser comprendida , aún a nivel estructural ".

Continuando con la Amelogénesis , Moe ⁸⁴ se refiere a la misma en los siguientes términos :

" Los ameloblastos jóvenes son células secretoras que producen la matriz del esmalte y consisten de material orgánico , sales minerales y agua. Los ameloblastos secretores se convierten en ameloblastos de absorción cuando la matriz alcanza su espesor final. Ellos contribuyen a la maduración del esmalte, lo cual involucra remoción desde la matriz de material orgánico y agua , así como un incremento en la cantidad de material inorgánico. Se conocen ciertos rasgos esenciales de la porción infranuclear de estas células en diferentes estados de su ciclo de vida. Estos incluyen abundancia de ribosomas libres en las células hijas , la acumulación infranuclear de mitocondrias en los ameloblastos secretores y la ocurrencia en estas células de cisternas endoplásmicas granulares."

Además , se ha observado una disminución en el número infranuclear de mitocondrias en conexión con la conversión de ameloblastos secretores a ameloblastos de absorción "

Parecería repetitivo tratar de dar una definición más de lo que se entiende por Amelogénesis debido a la gran variedad de información que se tiene al respecto , sin embargo , de los textos expuestos anteriormente se puede observar la relación existente entre la funcionalidad de la mitocondria y el desempeño normal de las células que generan al esmalte , es decir , los ameloblastos.

Es más ilustrativo tratar de explicar las transformaciones que ocurren en la mitocondria a nivel ultraestructural y los efectos que tiene la fosforilación oxidativa en el proceso de Amelogénesis , así como las diversas vías involucradas en la diferenciación celular de estos ameloblastos debidas a las transformaciones del A.T.P. Con el objetivo de explicar dichas vías , citaremos en forma algo extensa a Davis ⁶⁸ en los siguientes textos :

" El esmalte es único en los siguientes aspectos :

- 1. Se deriva del ectodermo***
- 2. Su matriz orgánica es de naturaleza no colágena.***
- 3. Sus cristales de hidroxiapatita son grandes en extremo.***
- 4. En el esmalte maduro no hay células ni prolongaciones celulares. Las células se pierden durante la erupción."***

" El desarrollo y morfogénesis del órgano del esmalte de origen ectodérmico incluye una repetida proliferación celular o mitosis combinada con cito, histo y morfo-diferenciación , así como diferenciación bioquímica y activación y expresión genética específicas. "

Davis ⁰⁸ continúa :

" Es muy probable que estos acontecimientos sean programados y controlados por la población de células ectomesenquimatosas asociadas , derivadas de las células de la cresta neural craneal , y es más probable que participen en ellos la inducción embrionaria y las interacciones entre epitelio y mesénquima."

" Los estudios de la síntesis de proteínas de la matriz del esmalte con Microscopía Óptica y con Microscopía Electrónica de Transmisión utilizando procedimientos autorradiográficos y los estudios bioquímicos de la síntesis de proteínas del esmalte , han señalado que estas proteínas son polipéptidos glucosilados sintetizados y secretados por los ameloblastos."

" La vía intracelular característica para la síntesis de proteínas incluye lo siguiente :
1) Síntesis de polipéptidos de las proteínas del esmalte en los ribosomas relacionados con el Retículo Endoplásmico rugoso bien desarrollado ; 2) transferencia y posterior glucosilación (con participación de la glucosiltransferasa) en el aparato de Golgi ; 3) empaquetamiento en vesículas secretorias ; 4) fosforilación en que participan las fosfoquinasas ; 5) secreción y 6) degradación extracelular por las peptidasas del esmalte como la esterasa de serina. El resultado final de este proceso es la formación de numerosos fragmentos de polipéptidos de peso molecular variable."

" Se han identificado dos clases diferentes de proteínas en la matriz del esmalte : enamelinas (glicina , ácido aspártico , serina y ácido glutámico) y amelogeninas (glucoproteínas hidrófilas ricas en prolina , ácido glutámico , leucina e histidina)".

" Se ha encontrado que las enamelinas poseen una gran afinidad por los cristales de hidroxapatita de calcio."

" En la matriz orgánica del esmalte también se encuentran glucosaminoglicanos , proteoglicanos y diversas clases de lípidos. Estas moléculas orgánicas pueden desempeñar un papel en la calcificación de las proteínas del esmalte."

" Al igual que en el hueso , la dentina y el cemento , el principal cristal del esmalte es el fosfato de calcio en forma de hidroxapatita cristalina , esto es $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, la unidad celular."

" Las células diferenciadas por completo que producen el esmalte se conocen como ameloblastos. Cuando son activas , éstas células son cilíndricas y altas en extremo , con citoplasma altamente polarizado , el ciclo vital de un ameloblasto es muy complejo."

" Los preameloblastos son células epiteliales cilíndricas bajas que se localizan más cerca del asa cervical del epitelio interno del esmalte. éstas células son inmaduras y están en el proceso de diferenciación. Con frecuencia demuestran actividad mitótica , lo que indica que aun no alcanzan su madurez. El núcleo de un ameloblasto típico es alargado y de localización central. Con el Microscopio Electrónico , los organelos citoplásmicos presentan un desarrollo insuficiente , en especial el Aparato de Golgi y el Reticulo Endoplásmico rugoso . Existen numerosos ribosomas libres , las mitocondrias , en número moderado ,

están dispuestas por toda la célula. También se encuentran filamentos citoplásmicos, las células adyacentes están unidas por desmosomas y algunas uniones comunicantes. El preameloblasto muestra numerosas prolongaciones citoplásmicas, que se extienden del citoplasma distal (que esta orientado hacia la papila dental) hacia adentro y a través de la matriz intracelular subyacente , estas extensiones citoplásmicas podrían desempeñar un papel en las interacciones entre epitelio y mesénquima ."

" Los ameloblastos secretores son células epiteliales cilíndricas altas en extremo , con una gran polarización del citoplasma. Se originan por la actividad mitótica de un sólo preameloblasto. El ameloblasto secretor es una célula diferenciada por completo , lo que significa que a llegado a ser tan especializada , que es incapaz de efectuar más mitosis . Por ello durante la Amelogénesis , debe haber una fuente constante de ameloblastos , ésta fuente es la población de preameloblastos. A medida que se diferencian los ameloblastos , bajo el control del ectomesénquima , tienen lugar varios cambios importantes en el citoplasma de los futuros ameloblastos secretores. Éstas modificaciones incluyen lo siguiente : 1) El núcleo se desplaza de su localización central a la cara proximal de la célula en diferenciación ; 2) El Reticulo Endoplásmico rugoso presenta un desarrollo extenso en el citoplasma apical ; 3) El Complejo de Golgi , antes poco desarrollado , se hipertrofia en el citoplasma supranuclear , lo que ocasiona la formación de múltiples Complejos de Golgi ; 4) La población antes moderada y dispersa de mitocondrias se acumula en el citoplasma infranuclear ; 5) numerosas vesículas (gránulos de secreción limitadas por membrana aparecen en el citoplasma distal , es decir , el citoplasma más cercano a la papila dental , y en apariencia brotan de los diversos sáculos del Aparato de Golgi ; 6) El citoplasma contiene numerosos microtúbulos y filamentos , organelos que son importantes para el desplazamiento del núcleo , el Complejo de Golgi , por el citoplasma que tiene lugar durante la diferenciación ; 7) Los microfilamentos se reúnen proximal y

distalmente para formar las terminales ; 8) Aumenta el número de contactos intercélulares , de manera específica desmosomas y uniones comunicantes , éstas últimas indican aumento de las comunicaciones intercélulares entre ameloblastos secretores adyacentes , y , 9) Por último , aparece la característica sobresaliente de un ameloblasto secretor , esto es , la formación de la Prolongación de Tomes , de localización distal en el polo secretor de la célula . A medida que los preameloblastos experimentan mitosis y la subsiguiente diferenciación , los ameloblastos secretores resultantes adoptan en su estructura fina las características de una típica célula sintetizadora y secretora de proteínas . Por ello , el ameloblasto secretor se caracteriza por la presencia de un Reticulo Endoplásmico rugoso bien desarrollado , un extenso Aparato de Golgi y numerosos gránulos de secreción limitados por membrana . Las proteínas que están siendo sintetizadas y secretadas por esta célula son las proteínas del esmalte , características de la matriz del mismo (en amelina y amelogenina) , así como algunas de las otras moléculas orgánicas mencionadas antes ."

"Además de los cambios estructurales ocasionados por la diferenciación terminal de los ameloblastos , los ameloblastos secretores también muestran signos de diferenciación bioquímica . De esta manera , las enzimas del ciclo del ácido cítrico aparecen por primera vez al mismo tiempo que las de la glucólisis . En este momento , se muestran también ATPasas y fosfatasas específicas . En general , la actividad metabólica de los ameloblastos secretorios se eleva por encima de la de los ameloblastos ."

" Cuando se completa el esmalte de la corona , los ameloblastos secretores experimentan cierto tipo de diferenciación para transformarse en ameloblastos de maduración ."

El ameloblasto ya no es una célula secretora , sino más bien una célula absorbente o resorbente . La Prolongación de Tomes desaparece y es sustituida por microvellosidades . En el comportamiento citoplásmico distal supranuclear hay predominio de lisosomas , vacuolas y mitocondrias. Las células ya no son sintetizadoras y secretoras de las proteínas del esmalte. En vez de eso , producen hidrolasas lisosómicas , que digieren el exceso de matriz orgánica del esmalte para crear el espacio necesario para la cristalización adicional de la hidroxiapatita. De esta manera , al crearse el espacio por eliminación de proteínas y agua , se puede agregar fosfato de calcio adicional a la hidroxiapatita existente para formar sus grandes cristales , tan característicos del esmalte .

El ameloblasto de maduración funciona en la absorción y captación de la matriz orgánica digerida y el agua que le acompaña."

" Para resumir , en la vía intracelular para la formación y transporte de proteínas de la matriz orgánica del esmalte participan : 1) El Retículo Endoplásmico rugoso , 2) El Aparato de Golgi , 3) los lisosomas , y 4) los gránulos de secreción. En el Retículo Endoplásmico rugoso se sintetizan los polipéptidos de las proteínas del esmalte , probablemente en sus formas precursoras , esto es proenamulina. Estas formas precursoras se transportan al Aparato de Golgi , donde ocurren modificaciones específicas de los péptidos : glucosilación , sulfatación y fosforilación . Los productos finales son empacados en gránulos de secreción donde pueden tener lugar algunas modificaciones adicionales , la mayor parte de éstos gránulos actúa como un sistema para el transporte de los productos de secreción hacia el frente de la matriz mediante microtúbulos , microfilamentos e iones calcio. Así , los ameloblastos diferenciados poseen toda la maquinaria citoplasmática necesaria para sintetizar , transportar y secretar proteínas , pero no llevan a cabo ninguna de estas actividades hasta que son activados de manera adecuada."

De esta magnífica exposición de Davis ⁶⁸ , podemos inferir que la Amelogénesis es un proceso con una organización lógica bien especificada tanto a nivel ultraestructural como histológico , sin embargo y refiriéndonos al último párrafo aquí citado , debemos preguntarnos ¿ cuáles son los mecanismos de activación que generan la fuerza impulsora para el inicio de la Amelogénesis ? y ¿ cual es (si es que existe) el papel que tienen las mitocondrias en la generación de esta fuerza impulsora ? . Para esto , debemos apoyarnos en la Termodinámica y las leyes que rigen a la misma , específicamente en la Energía Libre de Gibbs. Podemos iniciar nuestra discusión a partir del conocimiento de las biomoléculas fundamentales que componen a los preameloblastos , ameloblastos secretores y ameloblastos de maduración.

4.5. Biomoléculas Fundamentales de la Amelogénesis.

Las biomoléculas fundamentales que participan en la Amelogénesis , muestran un rasgo común , la acción de NAD y NADH en algún momento de la Amelogénesis . El que esto ocurra , es sin duda concluyente de la participación (directa o indirectamente) de los procesos que se desarrollan en la mitocondria , con lo cual se logra el enlace entre la energía liberada por las mismas mediante el ATP y la Amelogenesis , motivo central de la presente tesis. Más específicamente , todas las moléculas que participan en la Amelogénesis necesitan de aporte de energía para la síntesis del esmalte , esta energía , sin duda , la suministran las mitocondrias mediante la fosforilación oxidativa y un aporte anormal de esta energía hacia los precursores del esmalte o a las biomoléculas de las cuales se generan los mismos , provocará un desarrollo inadecuado del esmalte

5.0. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .

Dentro del ámbito social , se ha observado un incremento en el número de mujeres con ingesta alcohólica , debido principalmente a la influencia del medio ambiente . Esta influencia se refleja en problemas de salud que repercuten en la descendencia de estas mujeres cuando la ingesta de alcohol se ha vuelto crónica y/o aguda con las consecuentes malformaciones del producto , las cuales pueden ser desde deficiencias del crecimiento y desarrollo , retraso mental hasta la muerte del mismo .

Médicamente , se han propuesto diversos tratamientos para disminuir o evitar la ingesta de alcohol , sin resultados positivos en la mayoría de los casos . Por otro lado , se ha visto que esta enfermedad surge por problemas sociopsicológicos . Existen grupos dedicados a dar terapia contra el alcoholismo , pero estos no serán efectivos mientras el paciente no desee controlarse . (Así , el alcoholismo se está estudiando tanto a nivel científico como a nivel social . Como no se han visto buenos resultados , se han estado haciendo estudios en las áreas en donde se cree que está el problema , dando pauta para estudios más profundos como son a un nivel científico) .

Desde el punto de vista científico , los estudios de los probables efectos del alcohol en la Odontogénesis están poco estudiados , siendo de los estudios más importantes en México , los desarrollados por el Dr. J.C. Hernández ¹⁹

Desde el punto de vista científico , lo cual es el principal interés de éste trabajo , el problema puede plantearse tomando en cuenta los siguientes parámetros : Odontogénesis ,

Amelogénesis y efectos ultraestructurales de etanol en mitocondrias y sus repercusiones sobre los cambios de energía libre , los cuales provocarían alteraciones tanto en la matriz orgánica como en la inorgánica del esmalte .

Entonces se plantea el problema de acuerdo al siguiente esquema :

1. Investigación ultraestructural de ameloblastos
2. Investigación ultraestructural de membranas citoplasmáticas y de los organelos celulares .
3. Estudios por Microscopía Electrónica de Transmisión .
4. Caracterización de los efectos de etanol en mitocondrias .
5. Organización estadística de los datos obtenidos .
6. Correlación de los datos obtenidos con el Síndrome del Feto Alcohólico .
7. Establecimiento de posibles soluciones del problema y perspectivas de investigación relacionadas a la Odontología .

6.0. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO .

SAF ha sido estudiado desde diferentes puntos de vista , sin embargo , existen pocos estudios acerca de las técnicas de Microscopía Electrónica en México aplicadas a la Odontología .

Desde el punto de vista científico y tecnológico , este estudio enfoca el problema de la Amelogénesis a niveles ultraestructurales en la célula y su correlación con las energías libres desarrolladas en la misma , específicamente en mitocondria , por lo cual , este trabajo es genérico y podría ser el inicio de estudios más profundos dentro de las Ciencias Odontológicas.

Desde el punto de vista social el estudio abarca una problemática a nivel nacional cuya concientización aún no esta totalmente desarrollada por parte de la comunidad debido a diferentes factores.

Así , se hace necesario un estudio de SAF con el fin de adentrarse a los posibles mecanismos del mismo y aplicarlo en el ámbito profesional en nuestro país.

7.0. HIPÓTESIS.

Las lesiones observadas por Microscopía Electrónica de Transmisión en las mitocondrias de los ameloblastos provenientes de erias de ratones alcoholizados y sus efectos sobre el desarrollo del esmalte durante la Amelogénesis , podrían estar relacionadas con cambios de energía libre debidos a los mecanismos metabólicos del etanol sobre las biomoléculas primordiales precursoras de los ameloblastos.

8.0. OBJETIVO GENERAL .

Estudiar la Odontogénesis en crías de ratón CD-1 (24 horas después de nacidos) , cuyas madres fueron expuestas a un incremento gradual de ingesta de alcohol hasta una concentración constante de 20% , antes y durante todo el período de gestación .

8.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

Caracterizar por Microscopia Electrónica de Transmisión (MET) las ultraestructuras celulares en la Odontogénesis y comparar las alteraciones estructurales durante la Amelogénesis entre ratones experimentales y ratones control debidas al metabolismo del alcohol.

9.0. MATERIALES Y MÉTODOS.

9.1. MATERIALES.

9.1.1. Especímenes. Ratones hembras vírgenes control y ratones hembras vírgenes con ingesta alcohólica (origen. Centro de Animales de la Universidad de Tokio , Japón)

9.1.2. Material de Vidrio. Frascos de 5 ml , pipetas Pasteur , agitadores con gendarme , matraces de bola , matraces Erlenmeyer , matraces aforados , cajas de Pétri , cuchillas de vidrio , tubos de ensayo de diversos volúmenes , tubos capilares , vasos de precipitado de diferentes graduaciones , portaobjetos y cubreobjetos , probetas graduadas , embudos de cuello largo y cuello corto , pipetas graduadas , frascos ámbar con tapón esmerilado , vidrios de reloj ,

9.1.3. Material Diverso. algodón , gasas estériles , escobillones , navajas , pinceles , parafilm , cápsulas magnéticas , moldes para resina epóxica , envases de plásticos para deshechos , bisturí y navajas para bisturí , bata , lentes , papel filtro , papel pH , bulbos de goma , perillas , guantes , cubrebocas , pinzas de diversos calibres , tijeras curvas y rectas , mecheros Bunsen , maskin-tape , marcadores indelebles , rejillas , pisetas , cápsulas been , gradilla de madera y de plástico , jabón líquido , papel estraza , cápsulas de porcelana , papel aluminio , bolsas de plástico y de papel , franelas , fibras , portarejillas , material para fotografía.

9.1.4. Reactivos y Sustancias. Agua desionizada , alcohol etílico , paraformaldehído , sulfato de magnesio hexahidratado , ácido fosforúngico , tetraborato disódico , fosfato de sodio monobásico , fucsina , sulfato de zinc , fosfato de sodio dibásico , cloroformo , etanol absoluto, óxido de propileno , hidróxido de sodio , metanol , hematoxilina de Harris ,

cicloheptano , formaldehído , ácido clorhídrico , acetona , sulfato de amonio , cacodilato de sodio , resina epóxica , azul de toluidina , colodión , nitrato de plomo , tetróxido de osmio , óxido de zinc , xileno , fosfato de sodio monobásico , ácido cítrico monohidratado , fosfato ácido de sodio dodecahidratado , oxalato de amonio , acetato de uranio , bálsamo de Canadá , ácido acético , glutaraldehído , reactivos para fotografía

9.1.5. Equipo. Microscopio Electrónico de Transmisión (JEM 100 XC JEOL.) , ultramicrotómo (MT 6000-XI.) , campana extractora de gases , enfriador , estufa , evaporadora , Microscopio óptico y estereoscópico (WILD M3Z Leica).

9.2. MÉTODO.

A partir de los especímenes de ratones hembras , se obtuvieron las crías de experimentación. Los ratones hembras estuvieron sujetos a las siguientes condiciones experimentales : la temperatura y húmeda se controlaron en forma estricta y cuidadosa manteniendo elementos calentadores en el hábitat de estos especímenes y midiendo la temperatura con termómetros de mercurio , los calentadores estuvieron controlados mediante termostatos. Por otro lado , otro parámetro cuidadosamente controlado fueron los ciclos de luz / oscuridad. Dichos ciclos fueron controlados en estudios anteriores a éste. La dieta de los ratones hembra estuvo en base a F-2 Funabashi Forms , Chiba , Japan) y agua. Se seleccionaron ratones de 8 semanas de nacidos cuyo peso fluctúa entre 21 y 23 gramos. Se prepararon soluciones de alcohol en agua potable para el grupo experimental A los patrones de alcohol -agua iniciales , se les fue incrementando la concentración de alcohol en las proporciones siguientes : 1% , 5% , 10% , 15% , comenzando desde el día cero hasta el día 12.

A partir del día 13 y hasta el final del experimento , se mantuvieron con una constante de 22% y la dieta mencionada. El grupo control se alimentó con la misma dieta , pero en este caso , el agua estaba libre de alcohol. Para todos los grupos , el líquido se suministró en recipientes de plástico de 150 ml con un extremo delgado y hueco para disminuir la evaporación del etanol. Entre las semanas 14 y 16 de edad , se mezclaron ratones machos con ratones hembras en un lapso de tiempo de 1.5 horas entre las 22:30 y las 00:00 horas. La presencia de obturación vaginal ocurrió después de 12 horas de ocurrir la gestación. A partir del 7.5 día de gestación , las hembras preñadas se pesaron a diario y a partir del día 12.5 se tomaron muestras de sangre de la cavidad retro-orbital y se colectaron en tubos capilares. Los niveles de alcohol en sangre se determinaron por el método de cromatografía de gas líquido. Después de 24 horas de nacidas , las crías fueron sacrificadas. Se examinaron los especímenes sacrificados bajo el microscopio estereoscópico para poder observar anomalías físicas. Se extrajeron las mandíbulas de las crías , (tanto las de control como las experimentales). La mitad fueron fijadas con Karnovsky + amortiguador de cacodilato al 0.17 M ; y la otra mitad fueron fijadas con glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de cacodilato al 0.17 M. Una postfijación con tetróxido de osmio al 1% en peso a un pH entre 6.9 y 7.5. Deshidratación en alcoholes graduales. Preinclusión con óxido de propileno y resina epoxica. Inclusión en resina epoxi. Una vez terminados los bloques se procedió a hacer microtomía. Obtenidos los cortes histológicos para Microscopia de luz y cortes finos para Microscopia Electrónica de Transmisión (MET). Los cortes finos fueron contrastados con el fin de asegurar nitidez en las imágenes. Una vez seleccionadas las áreas de estudio , se imprimieron placas fotográficas , se revelaron e imprimieron en papel con el fin de analizarlas.

10.0. RESULTADOS.

Los resultados sobresalientes de este estudio se muestran en las siguientes tablas , gráficas morfométricas y estadísticas , así como las correspondientes ecuaciones de regresión lineal que representan el comportamiento de los parámetros investigados.

10.1. Ultraestructura de Ameloblastos para un Grupo Control y Grupo Experimental

La tabla I muestra las áreas de mitocondrias de ameloblastos de crías de ratón para un grupo control. Las crías fueron estudiadas después de 24 horas de nacidas. La tabla II muestra el efecto de etanol sobre crías de ratones cuyas madres fueron sometidas a ingesta de alcohol antes y durante todo el periodo de gestación. Por su parte , la tabla III muestra el efecto de etanol sobre áreas de mitocondria de ameloblastos , organizadas por intervalos de tamaño. Las microfotografías 1 y 2 se obtuvieron de crías de ratones control mientras que las microfotografías 3 y 4 se obtuvieron de crías de ratones con ingesta alcohólica. Debe notarse la destrucción de las mitocondrias en las crías de madres alcoholizadas. La gráfica de la figura 5 es una campana de Gauss que representa la distribución de tamaños de mitocondrias durante la Amelogénesis y la figura 6 es una gráfica correlacionando el porcentaje de daño contra área inicial para mitocondrias afectadas por etanol. Por último , la figura 7 muestra la campana de Gauss para las mitocondrias dañadas cuando se consideran para intervalos de tamaño. Debe hacerse notar en esta última campana que el daño por etanol a mitocondrias sigue también una distribución normal.

TABLA I. ÁREAS DE MITOCONDRIAS DE AMELOBLASTOS.
(Sin exposición a etanol. Grupo Control.)

MITOCONDRIA.	ÁREA. (micras ²)	MITOCONDRIA.	ÁREA. (micras ²)
1	0.1487	16	0.1263
2	0.2231	17	0.1115
3	0.1673	18	0.2231
4	0.2231	19	0.2231
5	0.2119	20	0.2231
6	0.1115	21	0.1115
7	0.1115	22	0.1115
8	0.1487	23	0.1487
9	0.1673	24	0.1487
10	0.1427	25	0.1487
11	0.2231	26	0.1487
12	0.2081	27	0.1933
13	0.2030	28	0.2231
14	0.1487	29	0.1487
15	0.1115	30	0.1487

**TABLA II . EFECTO DE ETANOL SOBRE ÁREAS DE MITOCONDRIAS DE
AMELOBLASTOS (Porcentaje de daño vs área inicial) .**

MITOCONDRIA	ÁREA INICIAL (MICRAS ²)	% DE DAÑO	MITOCONDRIA	ÁREA INICIAL (MICRAS ²)	% DE DAÑO
1	1,1672	2.19	16	0,9293	3.29
2	1,2267	8.68	17	0,8179	5.00
3	1,3013	6.82	18	0,8690	4.70
4	1,0411	6.24	19	1,0411	6.80
5	0,9993	15.90	20	0.7435	2.38
6	1,0595	8.90	21	1,0224	7.52
7	0,7527	0.00	22	0,5949	0.00
8	1,2267	5.30	23	1,4871	2.30
9	1,3013	3.86	24	2,2166	8.80
10	0,6134	5.78	25	0,7158	5.70
11	0,8365	1.41	26	0,8179	1.44
12	0,9293	8.27	27	0,7527	0.00
13	0,5855	0.00	28	0,6320	0.93
14	0,9202	7.06	29	0,9293	2.99
15	1,1152	5.20	30	0,8180	2.22

**TABLA III. EFECTO DE ETANOL SOBRE ÁREA DE MITOCONDRIAS DE
AMELOBLASTOS (Organizadas por intervalos de tamaño).**

INTERVALO (micras ²)	PORCENTAJE DE DAÑO
[0.50 - 0.75]	1.85 %
[0.75 - 1.00]	4.10 %
[1.00 - 1.25]	6.95 %
[1.25 - 1.50]	4.30 %
[1.50 - 1.75]	2.10 %
[1.75 - 2.00]	0.00 %
[2.00 - 2.25]	7.85 %

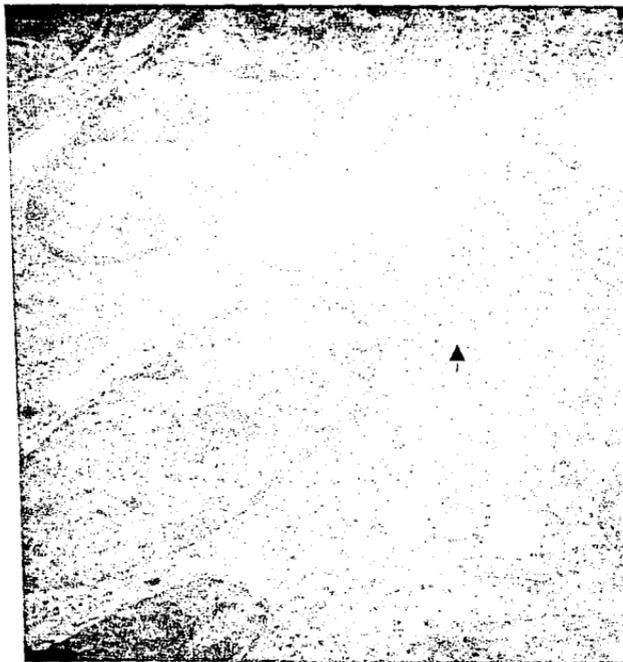


Figura 1. Micrografía de Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM) que muestra la ultraestructura de ameloblastos de ratón CD - 1 control , durante la Amelogénesis a las 24 horas de nacido el espécimen. Se muestran las mitocondrias sin alteración. Los cambios de energía libre en éstas son normales por lo cual las mitocondrias no están destruidas. (x 7000)



Figura 2. Micrografía de Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM) que muestra una amplificación de las mitocondrias formando parte de la ultraestructura de ameloblastos de ratón CD-1 control. (x 10000)



Figura 3. Micrografía de Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM) que muestra la ultraestructura de ameloblastos de ratón CD - 1 experimental , alteradas por etanol. Se pueden observar múltiples mitocondrias lesionadas (x 7000)



Figura 4. Microfotografía de Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM) que muestra otra zona de la ultraestructura de ameloblastos de ratón CD - 1 , alteradas por etanol.

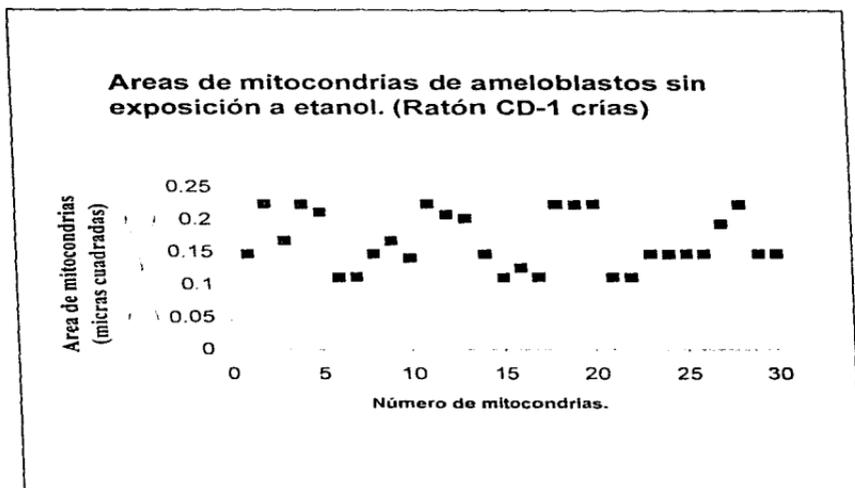


Figura 5.- Gráfica que representa la distribución de tamaños de mitocondrias durante la Amelogénesis. La gran cantidad de mitocondrias que se observan en las micrografías 1 y 2 y esta campana generada por la tabla I son evidencia de la constancia de tamaño debido a un funcionamiento normal de los ameloblastos.

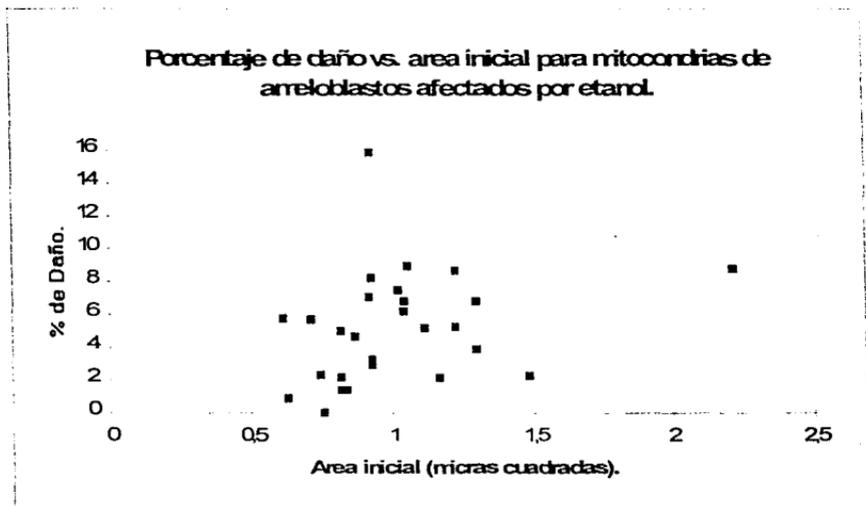


Figura 6.- Gráfica que relaciona el porciento de daño vs. el área inicial para mitocondrias afectadas por etanol.

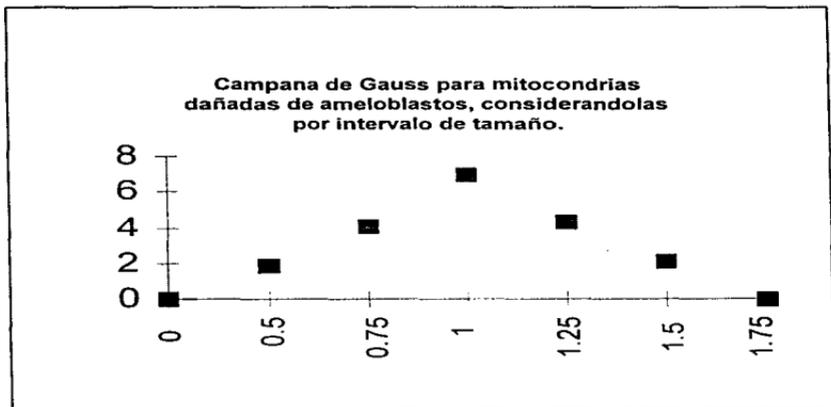


Figura 7.- Campana de Gauss para las mitocondrias dañadas por etanol cuando se consideran por intervalos de tamaños.

11.0. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE RESULTADOS.

Las tablas y gráficas anteriores sirven para estandarizar el comportamiento de las mitocondrias con respecto al daño provocado por etanol , como función de las áreas iniciales de las mismas. Un análisis de regresión lineal para todo el conjunto de mediciones proporciona los siguientes resultados :

$$\% D = 0.0136 + 4.5517 A_1$$

con los siguientes parámetros estadísticos :

Daño Promedio = 4.7871

Desviación Estandar = 2.4057

Intervalo de Confianza [2.3814 , 7.1928]

Por otro lado, el análisis de los datos en la muestra total indican que existe una dispersión en el tamaño de las mitocondrias , sin embargo , un análisis más cuidadoso da como resultado diferentes intervalos de tamaño en mitocondrias y un porcentaje de áreas dañadas que está en función del mismo. Lo anterior sugiere un comportamiento selectivo de las mitocondrias respecto a su interacción con etanol , si esto es cierto , el siguiente análisis estadístico es válido .

La curva normal de la figura 7 genera las siguientes ecuaciones lineales por regresión con mínimos cuadrados

[0.50 , 0.75]	%D = - 0.088 + 2 . 7472 A1	(Ecuación 1)
[0.75 , 1.00]	%D = - 0.066 + 4 . 6158 A1	(Ecuación 2)
[1.00 , 1.25]	%D = - 0.059 + 6 . 2977 A1	(Ecuación 3)
[1.25 , 1.50]	%D = 1.240 + 0 . 2196 A1	(Ecuación 4)

Además , para los intervalos

[1.50 , 1.75]	el % D = 2.1
[1.71 , 2.00]	No hubo mitocondrias
[2.00 , 2.25]	el % D = 7.85

Todos estos datos sugieren que existe una tendencia a la interacción con etanol mayor en las mitocondrias que están en proceso de desarrollo y crecimiento, disminuyendo la misma conforme la mitocondria madura y aumentando en forma abrupta en mitocondrias que están a punto de iniciar el proceso de bipartición. Este aumento abrupto en el momento de la bipartición podría deberse al adelgazamiento de las membranas lipoprotéicas , que permeabilizan el interior de las mitocondrias. Se sabe que las membranas mitocondriales son impermeables al paso de diferentes sustancias , es decir , absorben substratos en forma selectiva cuando funcionan en forma normal y libres de agentes patógenos o agresivos.

12.0. ANÁLISIS FENOMENOLÓGICO DE RESULTADOS

Siendo la Amelogénesis un proceso que depende de la diferenciación celular , a su vez , relacionada con secreciones cuya génesis está en el Reticulo Endoplásmico rugoso y Aparato de Golgi , podemos conectar la misma a la actividad biológica de las mitocondrias y la energía proporcionada por las mismas a los organelos antes mencionados. Así , si observamos los datos de la tabla 1 y los correlacionamos con las microfotografías de las figuras 1 y 2 y con la gráfica de la figura 5, podemos inferir que la gran cantidad de mitocondrias que se observan son una evidencia de la constancia de tamaño de las mismas , la cual es debida a un funcionamiento normal de los ameloblastos. Siendo la energía libre proporcionada por las mitocondrias a los organelos secretores la correcta , la Amelogénesis en este caso se desarrollará de acuerdo a las reacciones bioquímicas de las biomoléculas primordiales. En este caso , es de esperarse un desarrollo normal del esmalte dental de las crías. Ahora bien , si comparamos las microfotografías de las figuras 1 y 2 con las de las figuras 3 y 4 podremos observar que las mitocondrias han sido lesionadas en cuanto a su tamaño y área se refiere. Esto induce a pensar en cambios anormales de Energía Libre de Gibbs que serían provocados por un flujo eléctrico mayor al normal.

Si esto ocurre , el transporte de energía inducido por la formación de ATP varía afectando , así los organelos de la secreción de ameloblastos durante la diferenciación celular tendrían una sobrecarga energética. Los efectos de esta sobrecarga energética se reflejan a su vez en los resultados plasmados en las figuras 6 y 7. Dichas figuras muestran un gran descontrol en el desarrollo normal de las mitocondrias. Así , las biomoléculas primordiales responsables del buen funcionamiento de las mitocondrias se verán afectados y con esto resultaría una Amelogénesis impropia. Ahora bien , los datos de la figura 7 y la tabla 3 muestran que la sobrecarga energética afecta en mayores proporciones a las mitocondrias en

proceso de desarrollo y a las envejecidas pues el porcentaje de daño en ambos casos es mucho mayor que para las mitocondrias maduras.

Así , podemos inferir que el daño en las mitocondrias sería debido a la sobrecarga energética que tiene su origen en los efectos de etanol o sus metabolitos en la formación de ATP. Si las mitocondrias no aportan la energía adecuada para el proceso de Amelogénesis , el esmalte dental tendrá un desarrollo anormal.

13.0. DISCUSIÓN .

La ultraestructura de ameloblastos durante la formación de la matriz y la maduración del esmalte han sido estudiadas por diferentes investigadores ^{83 - 85} llegándose a la conclusión que la formación del esmalte dental ocurre en dos etapas principales: formación de la matriz del esmalte y maduración del mismo.

Por otro lado, los componentes característicos ultraestructurales de los ameloblastos han sido estudiados con técnicas de Microscopía Electrónica, estableciéndose la siguiente hipótesis a partir de los estudios de varios autores: " las observaciones hechas en dientes de roedores son aplicables a órganos dentarios humanos " ⁸⁶ Así, Reith ⁸⁷ estudiando los estados iniciales de la Amelogénesis en dientes de ratones jóvenes encuentra que el Proceso de Tomes se desarrolla rápidamente después de iniciar la Amelogénesis. Kallenbach ⁸⁸ investiga la estructura de los ameloblastos durante el segundo período de la Amelogénesis, es decir, durante la maduración del esmalte. Él propone un diagrama de los ameloblastos para los incisivos de ratones en el estado de postsecreción basándose en estudios por Microscopía de luz, en éste diagrama podemos observar en el interior del ameloblasto dos grupos de mitocondrias: mitocondrias basales (se encuentran principalmente por debajo del nivel de las barras terminales del ameloblasto) y mitocondrias apicales (se encuentran justo abajo de la terminal apical cercana a los extremos estriados). Por su parte, Jessen ⁸⁹ estudia la morfología y distribución de mitocondrias en ameloblastos de incisivos en ratas, encontrando inclusiones helicoidales en las mitocondrias de los ameloblastos, en estados específicos de la Amelogénesis por ejemplo, en el estado de formación de la matriz, detecta mitocondrias elongadas agregadas en grupos en el extremo proximal de los ameloblastos. Mientras que en el extremo distal de los mismos encuentra otro grupo de mitocondrias elongadas que se asocia a la membrana distal del citoplasma. Jessen concluye que más allá de la capacidad de las

mitocondrias para producir energía a través de la fosforilación oxidativa , las mitocondrias podrían tener la capacidad de sintetizar proteínas.

Por otro lado , Garant y Nalbandian ⁹⁰ estudiando la ultraestructura de ameloblastos y la función que el Aparato de Golgi tiene en la Amelogénesis sugiere que el mismo es un sitio donde se producen proceso digestivos intracelulares , así como el lugar acumulación de productos secretorios. Ellos encuentran que ocurren secreciones de gránulos durante el Proceso de Tomes en los ameloblastos concentrando su atención en la población de mitocondrias , ellos observan una distribución uniforme a través del citoplasma e interpretan la misma como debida a la satisfacción de uno de los axiomas bioquímicos conocido como Principio Fundamental de Economía Celular , es decir , dentro de los ameloblastos las mitocondrias se reproducirán única y exclusivamente en la medida que la Amelogénesis requiera de la energía de la misma.

Matthiesen ⁹¹ ha encontrado que la forma de secreción de los ameloblastos humanos tiene mucho en común con la de gatos y ratas , en donde los gránulos de secreción se forman en el Complejo de Golgi y se mueven mediante el Proceso de Tomes a través de la membrana de citoplasma .

De todo esto se observa que de los animales experimentales , los ratones son los más ampliamente utilizados para estudiar la formación de tejidos dentales , tanto bajo condiciones normales como bajo condiciones patológicas. Sin embargo , también se observa que la mayoría de estudios estructurales durante la década de los 60's se enfocó en las bases iniciales de la formación del esmalte y en particular en la fase de producción de la matriz o secretoria.

Los estudios de la zona de maduración comenzaron en la década de los 70's mediante un estudio de fijación del órgano de esmalte en incisivos de ratas ⁹² encontrándose dos tipos diferentes de ameloblastos designados ameloblastos de extremos ondulado y ameloblastos de extremo liso. Por su parte , Kallenbach ⁹³ estudiando los efectos de tetraciclinas en el órgano de esmalte de incisivos en ratas , encuentra lesiones en la zona de secreción que se manifiesta como ameloblastos distorsionados y lo atribuye a una hipermineralización . Esto a su vez se manifiesta como pigmentación oscura en los dientes primarios.

Moe y Mikkelsen ⁹⁴ estudian los efectos de diferentes agentes químicos sobre los ameloblastos secretorios y lo relacionan con la polaridad de los mismos ; encontrando cambios substanciales en la mayoría de los organelos en especial las mitocondrias , las cuales se encontraron muy cerca de la base de la célula , pero con el núcleo dispuesto en dirección distal cuando normalmente éste se sitúa en el centro de la célula , encontraron también que entre la mitocondria y el núcleo apareció un área citoplasmática y la parte distal del Proceso de Tomes había perdido su material granular.

Los estudios por un lado de Mikkelsen y Matthiessen ⁹⁵ por el otro acerca de los daños provocados por agentes externos en los ameloblastos de diferentes especies de roedores y en humanos condujeron a investigar más específicamente los organelos que existen en el citoplasma de los ameloblastos

Así la ultraestructura de ameloblastos y sus precursores (preameloblastos) ha quedado descrita por los diversos autores mencionados. Continuando con los procesos teratogénicos inducidos por los agentes químicos durante la Amelogénesis , Chen y Eisenman ⁹⁶ estudian el efecto del flúor sobre la ocurrencia del material granular entre el frente de mineralización y

los ameloblastos secretores sin encontrar relación en la formación de éste material y la preservación ultraestructural de la célula.

A pesar de la cantidad de estudios de agentes químicos sobre ameloblastos y de los resultados obtenidos hasta mediados de la década de los 80's los cuales muestran lesiones en los organelos de los ameloblastos , es claro que estos estudios son específicos de ciertos tipos de drogas cuyos efectos no son de frecuencia normal. Los investigadores enfocaron su atención hacia el efecto provocado por etanol en la Odontogénesis. Matthiessen en sus estudios precusores ⁹⁷⁻⁹⁹ encuentra que las cantidades de etanol consumidas por los mini-pigs preñados son comparables con el consumo moderado de humanos bebedores. Él describe cambios ultraestructurales específicamente en el tamaño y forma de las mitocondrias de los ameloblastos de los fetos de éstos mini-pigs encontrando que éste efecto es independiente en apariencia , de la cantidad de etanol administrada a las madres y propone que sus efectos tienen influencia sobre la función secretora de los ameloblastos , y por tanto , sobre la formación de esmalte. Concluye la dificultad para encontrar una conexión entre la aparición de mitocondrias anormales y estos efectos.

A partir de estos estudios , se han iniciado diversas investigaciones acerca de los efectos de etanol sobre la estructura de ameloblastos en fetos tanto de ratones como de otras especies , encontrándose diversos tipos de lesiones en los organelos de los mismos ¹⁰⁰⁻¹¹¹. Sin embargo, poco se ha dicho acerca de la actividad de las mitocondrias y la generación de energía en forma de ATP de las mismas.

Matthiessen estudia la ocurrencia de mitocondria anormales en el citoplasma de hepatocitos en fetos de mini-pigs con ingesta alcohólica crónica , encontrando cambios ultraestructurales de gran similitud respecto a la de los humanos alcohólicos en cuanto al daño

mitocondrial se refiere. Estudios más recientes ¹¹²⁻¹¹⁴ sugieren efectos dañinos debidos a la ingesta de etanol en el metabolismo de las mitocondrias (tanto en su estructura como en su función) proponiéndose alteraciones en la composición de las proteínas y los lípidos debidas a etanol , así como cambios en las actividades bioquímicas de los organelos.

Los resultados encontrados en el presente estudio sugieren que los efectos de etanol sobre los organelos de los ameloblastos ocurren debido a alteraciones en el transporte energético el cual surge de la fosforilación oxidativa , generada en la mitocondria. Este nuevo enfoque se basa en los cambios de polaridad celular que podrían ocurrir debido a una sobrecarga energética , con la consecuente alteración en la entropía celular. Siendo los ameloblastos sistemas isotérmicos , el cambio en energía libre encontrado en el presente estudio y que es debido a las reacciones exogermicas provocadas por etanol y sus metabolitos , sería la fuerza impulsora para la destrucción de las mitocondrias. Así se vería afectada la fosforilación oxidativa debido a probables rupturas de la cadena lateral de los aminoácidos , sillares de las lipoproteínas , macromoléculas constituyentes de la membrana mitocondrial. Si esto es cierto , el flujo electrónico a través de dichas membranas quedara desequilibrado , éste desequilibrio afectara la funcionalidad de los organelos que requieren de la energía proporcionada por la mitocondria para sus funciones bioquímicas

Los resultados obtenidos de los diferentes investigadores acerca del daño mitocondrial por etanol no contemplan dichos cambios de energía libre , por esta razón se deben enfocar desde un punto de vista nuevo , la formación anormal del esmalte durante la Amelogénesis .

Ésta clase de estudios específicos involucran niveles bioquímicos e investigaciones del tipo propuesto por Rassow y colaboradores ¹¹⁵.

14.0. CONCLUSIONES .

- 1. Ingesta de etanol durante el embarazo en ratones CD -1 puede provocar un desequilibrio energético en los procesos de flujo electrónico a través de las membranas mitocondriales , la cual provoca a su vez la destrucción de las mismas .**
- 2. El desequilibrio energético en el flujo electrónico induce una producción inadecuada de ATP al afectarse las biomoléculas primordiales .**
- 3. La producción inadecuada de ATP por las mitocondrias induce a su vez un desequilibrio en los organelos secretores de ameloblastos (REr y A. Golgi) .**
- 4. Desequilibrio en la actividad de organelos celulares provocando alteraciones en la función normal de ameloblastos .**
- 5. La alteración en la función de ameloblastos provoca un desarrollo anormal de las matrices de esmalte (orgánica e inorgánica) .**
- 6. Todos estos efectos energéticos tienen una gran influencia en el desarrollo del Síndrome del Feto Alcoholizado .**
- 7. Los análisis por MET y estadísticos refuerzan las seis conclusiones anteriores .**

15.0. RECOMENDACIONES .

- 1. En primer lugar extender los estudios a nivel de posgrado con el fin de proponer campos de investigación alternativas para el problema de SAF .**
- 2. Investigar los efectos colaterales de fármacos ingeridos durante el embarazo y su interacción con etanol , así como sus repercusiones sobre la Amelogénesis y proponer un cuadro de fármacos no recomendables.**
- 3. Correlacionar éstos estudios con MET para acercar las fronteras entre la Odontología y las Ciencias exactas .**
- 4. Enfocar los estudios de Odontogénesis y Amelogénesis a nivel ultraestructural , es decir , resaltar la importancia que tiene las funciones individuales de los organelos celulares responsables de la formación de los órganos dentarios .**

16.0. BIBLIOGRAFÍA.

1. Sabatini David D , M.D., Klaus Bensch ,M.D., and Russell J. Barnett, M.D. : **Cytochemistry and Electron Microscopy** : The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation . J. Cell Biol. . 1963 ; 17 : 19 .
2. Palade G.E. , M.D. : A study of fixation for electron microscopy . J. Experim. Med. 1952 ; 95 : 285 .
3. Mercer , D.H & M.S.C. Birbeck : **Electron Microscopy** . A hand book for biologists . , 2nd ed. . Oxford , Blackwell Scientific Publications , 1966 .
4. Bowen D. K. , C.R. Hall : **Microscopy of Materials** . Modern imaging methods using electron , X-ray and Ion beams . 5st ed. . London , Macmillan Press LTD , 1975 .
5. Thomas Gareth , Michael J. Goringe : **Transmission electron microscopy of materials** . U. S. A. , Johon Wiley & Sons Inc . , 1979 .
6. J. Sommerville & V. Scheer : **Electron microscopy in molecular biology an practical approach** . Oxford Whashington D. C. , Edit by J. Sommerville & V. Scheer IRL PRESS . 1987 .
7. Becker , Deamer : **The world of the cell** , 2nd ed. California , Cummings publishing company . INC . 1991 .
8. Dykstra Michael J. : **A manual of applied techniques for biological electron microscopy** . New York , Plenum Press . 1992 .

9. **Bozzola , J. J. & L. D. Russell . Electron microscopy , principles an techniques for biologists . Boston , Jones Bartlett publishers . 1992 .**
10. **Cárbaz Trejo Alfonso. Curso de Microscopia Electrónica I : Aplicaciones Biológicas. Sociedad Mexicana de Cristalografía. 1996**
11. **Lehninger Albert L. : Bioquímica , las bases moleculares de la estructura y función celular .2da ed. Barcelona , Omega SA . 1982 .**
12. **Stryer Lubert : Bioquímica . 3ra. ed. Barcelona , Reverté SA.1990 .**
13. **Sigee David C. , A John Morgan , Adrian T. Sumner , Alice Warley : X-ray microanalysis in biology . Experimental techniques and applications. Cambridge , University Press . 1993 .**
14. **Askeland Q. D. Introducción a la Ciencia de Materiales. Ed Iberoamericana. 1995**
15. **Davis Walter L. , B. S. , M. S. : Oral histology . Cell structure and function . 1st. ed. U.S.A. , W.B. Saunders Company . 1986 .**
16. **Lazzari Eugene P. : Bioquímica Dental . 2da. ed. México , Interamericana . 1978 .**
17. **Roos Michael H. , Eduward J. Reith , Lynn J. Romrell : Histología . Texto y atlas a color . 2da. ed. . México , Editorial Médica Pamamericana . 1992 .**

18. Parmelee Cullen W. , E.D. Lynch , A.L.Friedberg : Ceramic Glazes . 2nd ed. Illinois , Industrial publications Inc . 1951 .
19. Hernández Guerrero J. C. : Morphologic effects of maternal alcohol intake on skull , mandible and tooth of the offspring in mice . Japan. J. Oral Biol. 1990 . 32 ; 1 .
20. Goth Andres M. D : Medical Pharmacology , Principles and Concepts. 4a. ed. USA , the CV Mosby Co. 1968
21. Solomons T. W. G. : Química Orgánica México , Limusa 1981.
22. Pilstrom L. , Kiessling K. H. : Alcohol Problems , a report by the cooperative commission on the study of alcoholism . Acta Pharmacol Toxicol 1967 ; 25 : 225.
23. Benovides De Larraza G: Alcoholismo y Genética . Rev. Med. Hosp. Gral. Méx. 1979 ; 42 : 133.
24. Bustamante M. E. : El Alcoholismo , problema médico y social. Aspectos Epidemiológicos. Gac. Méd. Méx. 1980 ; 116 : 240.
25. Calderón Narvaez G. : El Alcoholismo , problema médico y social. Gac. Méd. Méx. 1980 ; 116 : 239
26. Edwards G. , Gross M. , Keller M. , Moser j. : Alcohol Dependence : Provisional Description of a clinical syndrome. Brit. Med J. 1976 ; 1 : 1058.

27. Robertson William , Dreisbach Robert H. : Manual de Toxicología Clínica , 6a ed. México , Manual Moderno , 1992.
28. Newsholme E. A. , Leech A. R. : Bioquímica Médica , 1a ed. México , Interamericana 1986.
29. Jones K. L. Smith D. W. : Recognition of the fetal alcohol syndrome in early infancy. Lancet , 1973 ; 2 : 999.
30. Jones K. L. , Smith D. W. , Ullceland C. N. , Streissbuth A. P. : Pattern of Malformation in offspring of chronic alcoholic women. Lancet , 1973 ; 1: 1267
31. Bannigan John , Burke Paul : Ethanol Teratogenicity in Mice: A Light Microscopy Study. Teratology. 1982 ; 26 : 247.
32. Ferrier P. , Nicod I. , Ferrier S. : Fetal Alcohol Syndrome . Lancet . 1973 ; 2 : 1496 .
33. Hanson J. W. , Jones K. L. , Smith D. N. : Fetal Alcohol Syndrome . JAMA . 1976 ; 235 : 1458 .
34. Jones K. L. , Smith D. W. , Streissguth A. P. , et al : Outcome in offspring of chronic alcoholic women. Lancet . 1974 , 1 : 1076 .
35. Jones K. L. , Smith D. W. : The Fetal Alcohol Syndrome . Teratology . 1975 ; 12 : 1

36. Havliceck V. , Childaeva R. : EEG component of fetal alcohol syndrome . Lancet .1976 ;
2 : 477 .
37. Mulvihill J. J. , Yeager A. M. : Fetal alcoholic syndrome . Teratogen update . Teratology .
1976 ; 13 : 345 .
38. Chernoff G. F. : A mouse model of the fetal alcohol syndrome. Teratology. 1975 ; 11 : 14.
39. Iosub S. , Bingol N. , Fuchs M. : Maternal alcoholism and fetal abnormalities. Pediatr.
Research. 1975 ; 9 : 284.
40. Mestres-Estartús J , Urue J , González-Merlo J. : Síndrome alcohólico fetal , una nueva
entidad clinica. Rev. Esp. Obstet. Ginecol. 1977 ; 36 : 253.
41. Palmer R. H. , Ouellette E. M. , Warner L. , Leichtman S. R. : Congenital malformations in
offspring of the chronic alcoholic mother. Pediatrics. 1974 ; 53 : 490.
42. Tenbrinck M. S. , Buchin S. Y. : Fetal alcohol syndrome : A report of a case. JAMA.
1975 ; 232 : 1144.
43. Qazy Q. H. , Mazakawa A. : Altered sex ratio in fetal alcohol syndrome. Lancet. 1976 ;
2 : 42.
44. Sandor , S. and D. Amels. : The action of ethanol on the prenatal development of albino
rats. Rev. Roum. Embryol. Cytol. Serie Embryol. 1971 ; 8 : 105.

45. Moore K. L. , Persaud : Embriología Clínica. 5a ed. México. Interamericana. 1993.
46. Clarren S. K. , Alvord E. C. Jr , Sumi S. M. : Brain malformation related to prenatal exposure to ethanol . J. Pediatr. 1978 ; 92 : 630.
47. Calandra Dante. Ecología Embrionaria y Fetal. 2a ed. México. Panamericana. 1975.
48. Arias Rivera E. M. : Inmunoexpresión del factor de crecimiento epidérmico en crías de madres por ingesta crónica de alcohol , un modelo experimental. México D. F. Universidad Nacional Autónoma de México. 1994 Tesis (Licenciatura en Odontología)
49. Kronick J. N. : Teratogenic Effects of ethyl alcohol administered to pregnant mice. Am J. Obstet. Gynecol. 1976 ; 124 : 676.
50. Streissguth A. P. , Clarren S. K. , Jones K. L. Natural History of the Fetal Alcohol Syndrome. : A 10 year follow-up of eleven patients. Lancet. 1985 ; 13 : 85.
51. Vilar Rojas C. , Hicks J. J. : Síndrome del alcoholismo fetal. Estudio de revisión. Ginec. Obst. Méx. 1990 ; 58 : 226.
52. Pierce DR , Goodlett West Jr. : Differential neuronal loss followin early posnatal alcohol exposures. Teratology. 1989 ; 40 : 113.
53. Abel , Sokol. : Incidence of Fetal Alcohol Síndrome and Economic Impact of FAS - Related Anomalies. Drug Alcohol Depend. 1987 ; 19 : 5170

54. Hoyset S. K. , Jones P. J. H : Minireview : Ethanol induced teratogenesis : Characterization, mechanisms , and diagnostic approaches. Life Sciences. 1989 ; 44 : 643.
55. Kesäniemi Y. A. , Sippel H. W. : Placental and Foetal Metabolism of Acetaldehyde in Rat I : Contents of Ethanol and Acetaldehyde in Placenta and Foetus of the Pregnant Rat during Ethanol Oxidation. : Acta Pharmacol. et Toxicol. 1975 ; 37 : 43.
56. Horiguchi T. , Suzuki K. , Adamsons K. : Effect of ethanol on Fetal Cerebral Function. Am. J. Obstet. Gynecol. 1971 ; 109 : 910.
57. Idanpaan-Heikkila J. E. : Placental Transfer of C¹⁴- ethanol. Am. J. Obstet. Gynecol. 1971 ; 109 : 910.
58. Mann L. I. , Bhakthavathsalan A. : Effect of alcohol on fetal cerebral function and metabolism. Am. J. Obstet. Gynecol. 1975 ; 122 : 845.
59. Murray R. F., Matulsky A. G : The metabolism of ethyl alcohol. Science. 1971 ; 171 : 71.
60. Watman R. , Iniquez E. : Placental transfer of ethanol and its elimination at term. Obstet. Gynecol. 1972 ; 40 : 180.
61. Kloos K. , Vogel M. : Patologia del periodo perinatal 3a ed. Barcelona. Salvat. 1985.
62. Winick Myron. : Nutrition, intrauterine growth retardation and the placenta. - A review - Trophoblast Research. 1983; 1 : 7.

63. Villet Claudie A. : Enzymes , receptors , metabolism , and placental function - A review - Trophoblast Research. 1983 ; 1 : 175.
64. Zubirán Salvador , Arroyo P , Avila H. : La nutrición y la salud de las madres y los niños mexicanos. México , FCE , 1990.
65. Carrera M. J. M. : Biología y Ecología Fetal. : 2a ed. Barcelona. Salvat. 1981.
66. Monod J. : Chance and necessity . New York , Random House. Inc , 1971 .
67. De Robertis E. D. P. , De Robertis E. M. F. : Biología celular y molecular . 11de. Buenos Aires , El Atenco . 1990 .
68. Davis Walter L : Histología y embriología bucal. 2a ed. México Interamericana. 1990.
69. Díaz Zagoya Juan C. , Hicks Juan José : Bioquímica e Inmunología , Vol 1. 1a ed. México, Ed Piensa , Facultad de Medicina UNAM . 1988.
70. Villet Claude A. : Biología , 7a ed. México , Interamericana , 1988.
71. Di Fiore S. H. : Diagnóstico Histológico . Tomo I . Buenos Aires . El Atenco . 1986 .
72. Cormack H. D. : Fundamentos de Histología . México . Harla . 1984 .
73. Tencate A. R. : Histología Oral . 2a. ed Buenos Aires . Panamericana . 1991 .

74. Provenza Vincent D. :Histología y Embriología Odontológica . México. Interamericana . 1974 .
75. Langman : Embriología Médica . 7a. ed. Buenos Aires . Panamericana . 1996
76. Lesson C. R. , Lesson T. S. : Histología . 5a. ed. México . Interamericana 1988 .
77. Fischer A. : Compendio de Embriología Humana . 2a. ed. Barcelona . Labor .1960 .
78. Hib J. : Embriología Médica . 5a. ed. México . Interamericana . 1992 .
79. Fawcett : An Atlas of fine structure . The Cell . Philadelphia , U.S.A. 1966
80. Araiza Velázquez L.F. : Biología Celular , Aspectos Fundamentales . Alhambra Mexicana . México. 1986 .
81. Porter . Bonneville . : Fine structure of cells and tissues . 3rd. ed. Philadelphia . Lea & Febiger . 1968 .
82. Scott F. G. : Development Biology . 4th. ed. Sunderland Massachuset . Sinauer Associates Publishers . 1994 .
83. Reith J. Edward : The Early Stage of Amelogenesis As Observed in Molar Teeth of Young Rats . J. Ultrastruct. Res . 1967 : 17 ; 503 .

84. Moe : Morphological changes in the infranuclear portion of the enamel - producing cells during their life cycle . J. Anat. 1971 : 108 ; 43 .
85. Ham W. A. , Cormack H. D. . Tratado de Histología . 8a. ed. México . Nueva Editorial Interamericana . 1985 .
86. Rönnholm E. : An Electron Microscopic Study of the Amelogenesis in Human Teeth . J. Ultrastruc. Res. 1962 : 6 , 229 .
87. Reith E. : The Ultrastructure of Ameloblasts during Matrix formation and the Enamel . J. Biophys. Biochem. Cytol . 1961 : 9 ; 825 .
88. Kallenbach E. : Fine Structure of Rat Incisor Ameloblasts during Enamel Maturation . J. Ultrastruc. Res. 1968 : 22 ; 90 .
89. Jessen H. : The Morphology and Distribution of Mitochondria in Ameloblasts with Special Reference to a Helix - Containing Type . J. Ultrastruc. Res. 1968 : 22 ; 120 .
90. Garant P. R. , Nalbandian J. : Observations on the Ultrastructure of Ameloblasts with Special Reference to the Golgi Complex and Related Components . J. Ultrastruc. Res. 1968 : 23 ; 427 .
91. Matthiessen M. E. , Bulow F. A. : The Ultrastructure of Human Secretory Ameloblasts . Z. Zellforsch . 1969 : 101 , 232 .

92. Josephsen K. : A Technique for Isolating the Enamel Organ of the Rat Incisor for Histologic Studies . Scand J. Dent. Res. 1974 : 82 , 229 .
93. Kallenbach E. : Microscopy of Tetracycline - Induced Lesions in the Rat Incisor Enamel Organ . Arch Oral Biol . 1979 : 24 ; 869 .
94. Moe H. , Mikkelsen H. : Light Microscopical and Ultrastructural Observations on the Effect of Vinblastine on Ameloblasts of Rat Incisors in vivo . Acta Pathol. Microbiol. Scand. 1977 : 85 ; 73 .
95. Matthiessen M. E. , Romert P. : Ultrastructure of the Human Enamel Organ . Cell Tissue Res. 1981 : 250 ; 370 .
96. Chen S. , Eisenmann R. D. : Ultrastructural Study of the Effects of Fixation and Fluoride Injection on Stipped Material during Amelogenesis in the Rat . Archs Oral Biol . 1984 : 29 : 681 .
97. Romert P. , Matthiessen M. E. Alcohol - induced Injury of Mitochondria in Hepatocytes of Mini - pig Fetuses . Virchows Arch. Pathol. Anat. 1983 : 399 ; 299 .
98. Romert P. , Matthiessen M. E. : Ethanol - induced Changes of Granular Endoplasmatic Reticulum in Hepatocytes of Mini - pig Fetuses . Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. 1983 : 91 ; 413 .
99. Matthiessen M. E. , Romert P. : Changes of Secretory Ameloblasts in Mini - pig Fetuses Exposed to Ethanol in vivo . J. Dent. Res. 1988 : 67 , 1402 .

100. Wice G. E. , Fan W . : Immunolocalization of transforming growth factor beta in rat molars . J. Oral Pathol . Med . 1991 : 20 ; 74 .
101. Uchida T. , Warshawsky H. : Zinc Iodide-Osmium Tetroxide Impregnation of the " Tubulo - Vesicular System " in Tomes Process of the rat incisor Ameloblast . Anat. Rec. 1992 : 232 ; 325 .
102. Smid J. R. , Monsour P. A. , Rousseau E. M. , Young W. G. : Cytochemical Localization of Dipeptidyl Peptidase II Activity in Rat Incisor Tooth Ameloblasts . Wiley - Liss , Inc. 1992 : 233 ; 493 .
103. Casasco A. , Calligaro A. , Casasco M. : Proliferative and functional stages of rat ameloblast differentiation as revealed by combined immunocytochemistry against enamel matrix proteins and bromodeoxyuridine . Cell Tissue Res. 1992 : 271 : 415 .
104. Warshawsky H. : Reviewer's Comments on the Paper Entitled : " Correlation of the Arrangement Pattern of Enamel Rods and Secretory Ameloblasts in Pig and Monkey Teeth : A possible Role of the terminal Webs in Ameloblasts Movement During Secretion , " by S. Nishikawa . Anat. Rec. 1992 : 223 ; 479 .
105. Inai T. , Nagata K. , Kukita T. , Kurisu K. : Demonstration of Amelogenin in the Enamel Free Cusps of Rat Molar Tooth Germs . Immunofluorescent and immunoelectron Microscopic Studies . Anat . Rec . 1992 : 288 : 580 .

106. Nishikawa S. : Correlation of the Arrangement Pattern of Enamel Rods and Secretory Ameloblasts in Pig and monkey Teeth - A Possible Role of the Terminal Webs in Ameloblast Movement During Secretion . Anat . Rec. 1992 ; 2 82 ; 466 .
107. Kassem M , Rungby J , Mosekilde L , Eriksen E. : Ultrastructure of human osteoblasts and associated matrix in culture . APMIS 1992 ; 100 ; 490 .
108. Wise G. E. , Lin F. , Fan W. : Culture and characterization of dental follicle cells from rat molars . Cell Tissue Res . 1992. : 267 ; 483 .
109. Bosshardt D. D. , Schroeder E. H. : Inicial formation of cellular intrinsic fiber cementum in developing human teeth . Cell Tissue Res. 1992 ; 267 ; 321 .
110. Diekwisch T. , Sasson D. , Bringas P. Jr., Santos Va. Slavkin C. H. : Antisense inhibition of AMEL2 translation demonstrates supramolecular controls for enamel HAP crystal growth during embryonic mouse molar development . Development . 1993 . 117 ; 471 .
111. Bronckers J. J. L. A. , Bervoets T.J.M. , Lyaruu D.M.L. : Degradation of Hamster Amelogenins during Secretory Stage Enamel Formation in Organ Culture . Matrix Biology . 1994 ; 14 ; 533 .
112. Thayer W. S. , Rottenberg H. : Comparative Effects of Chronic Ethanol Consumption on the Properties of Mitochondria from Rat Brain and Liver . Alcohol Clin. Exp.Res . 1992 ; 16 ; 1 .

113. Romert P. , Matthiessen E. M. : Ultrastructural and Morphometric Study of Hepatocytes from Near - Term Minipig Fetuses Exposed to Ethanol in vivo . *Acta Anat.* 1992 . 143 ; 301 .

114. Trenti T. , Sternieri E. , Ceccarelli D. , Gallesi D. , Masini A. : Production of lipid hydroperoxides and depletion of reduced glutathione in liver mitochondria after acute ethanol administration to rats . *Toxic Lett.* 1992 . 64 / 65 ; 751 .

115. Rasso J. , Voos W. , Pfanner N. : Partner proteins determine multiple functions of Hsp70 . *Trends In Cell Biology* . 1995 . 5 . 207 .

116. Alberts B. , Bray D. , Lewis J. , Raff M. , Roberts K. , Watson J. : *Molecular Biology of The Cell* , 3rd edition , USA , Garland Publishing Inc. 1995 .

17.0 APÉNDICE

Principios y Técnicas Básicas en Microscopia Electrónica de Transmisión.

De acuerdo a Di Fiore ⁷¹ :

Los microscopios electrónicos son de dos diseños básicos :**Microscopio Electrónico de Barrido (SEM)** y **Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM)**.

Ambos son similares y basan su funcionamiento en la utilización de un haz de electrones para producir una imagen. Sin embargo , los instrumentos tienen diferentes mecanismos para formar la imagen final. Los límites de resolución espacial del Microscopio Electrónico de Transmisión se sitúan en 5 \AA° , lo cual es ideal para el estudio de estructuras celulares , virus y proteínas , es decir , para el estudio ultraestructura del protoplasma y sus derivados. Figura A1 .

Desde el punto de vista de la formación de la imagen , la cual se forma por la acción de un conjunto de lentes sobre el haz electrónico, emitido por un filamento de tungsteno llamado cátodo. El cátodo está colocado cerca de una abertura circular en una camisa metálica conocida como **Cilindro Wehnelt** . Un voltaje negativo sobre el cilindro ayuda a controlar la emisión de electrones y la forma del haz. En el otro extremo del cilindro está el ánodo , a 0 volts y a 50-100 kv menos que el cátodo. Esta diferencia en voltaje , llamada **voltaje de aceleración** provoca la aceleración de los electrones cuando pasan a través del cilindro. Cuando el haz electrónico deja la región superior del sistema de lentes condensadores, entra a otra serie de lentes electromagnéticas. Los lentes por sí mismos son un espacio influenciado por un campo electromagnético. Así , cuando varios lentes se arreglan en un conjunto , ellos pueden controlar la iluminación , foco y amplificación.

El lente condensador es el primer lente que afecta al haz electrónico . Su función es colimar el haz para iluminar al espécimen . La mayoría de microscopios electromagnéticos utilizan un sistema de lentes condensadores a base de dos lentes para lograr el mejor enfoque del haz electrónico . El siguiente componente, los **lentes objetivos** , es la parte más importante del sofisticado sistema de lentes de un microscopio electrónico . El espécimen se coloca sobre la platina dentro de los lentes objetivos , el cual en conjunto con el lente intermedio y el lente proyector produce una imagen final sobre una pantalla visual de sulfuro de zinc que fluoresce cuando es golpeada por el haz de electrones .

¿ Cómo se forma una imagen por la acción de estos lentes sobre un haz electrónico ?

Como el haz electrónico generado por el cátodo pasa a través del sistema de lentes condensadores y se encuentra con el espécimen , al golpearlo algunos electrones son dispersados por la muestra , mientras otros continúan su trayectoria en forma relativamente libre . esta dispersión electrónica es un resultado de propiedades creadas en el espécimen por el procesamiento de preparación . En otras palabras , la preparación del espécimen , imparte una densidad electrónica selectiva al mismo , es decir , algunas áreas se vuelven más opacas a los electrones a diferencia de otras . Dichas áreas con densidad electrónica del espécimen aparecerán oscuras debido al poco flujo de electrones a través de ellas , mientras otras áreas aparecen brillantes debido al mayor número de electrones viajando a través de las mismas .

En contraste entre luz , oscuridad y áreas intermedias del espécimen crea la imagen vista sobre la pantalla . El hecho de que la imagen se forme por diferentes cantidades de electrones transmitidos a través del espécimen aclara el término de Microscopía Electrónica de Transmisión Figura AII

Para muestras biológicas Albert y colaboradores ¹¹⁶ , aclaran la importancia de observar éstas muestras en vivo debido a las altas presiones de vacío en el Microscopio Electrónico. Así , los tejidos deben preservarse por fijación , primero con glutaraldehído , el cual une en forma cruzada y covalente las moléculas de proteínas a sus cercanos y entonces con el tetróxido de osmio , cual enlaza y estabiliza las bicapas de lípidos y al mismo tiempo las proteínas. Como los electrones tienen un poder de penetración muy limitado , los tejidos tienen que ser cortados en secciones extremadamente delgadas (50-100 nm de espesor) antes de ser observados. Esto se logra deshidratando el espécimen y permeabilizando con una resina monomérica que polimeriza para formar un bloque sólido de plástico . El bloque se corta entonces con un vidrio fino o con una cuchilla de diamante sobre un ultramicrotomo para éste efecto. Estas secciones delgadas y libres de agua y otros solventes volátiles , se colocan sobre una rejilla pequeña , circular y metálica para observarse en el microscopio.

El contraste en el Microscopio Electrónico depende del número atómico en el espécimen. Mientras más alto es el número atómico, más electrones son dispersados y más grande es el contraste. Las moléculas biológicas están compuestas de átomos de bajo número atómico (C,N,H,O). Para hacerlas visibles , generalmente se impregnan (antes o después) con sales de metales pesados tales como uranio y plomo. Los diferentes constituyentes celulares se revelan con varios grados de contraste de acuerdo a su grado de impregnación o "tinción" con éstas sales. Los lípidos , por ejemplo , tienden a teñirse de tonos oscuros después de la fijación con osmio , revelando con esto las membranas celulares.

La importancia de la preparación previa de los especímenes biológicos para su posterior observación en el MET involucra la conservación de las condiciones

fisiológicas lo más cercanamente posibles a las condiciones **prevalcientes** en la célula cuando ésta funciona en condiciones óptimas, es decir , conservando la morfología y química de la **ultraestructura celular** . Esto es debido a la degradación rápida y espontánea del material biológico al ser separado de las condiciones vitales

Por otro lado, la autólisis (descomposición por enzimas existentes en el tejido) se **acelera** en función de la riqueza en enzima en el material biológico y por efectos de cambios de **temperatura** en el mismo

Macroscópico límite inferior 0.1 mm.	{ Simple Vista (Ojo humano) Lupa	} Desde 0.1 mm	} Organos	} Anatomía
Microscópico Límite inferior 0.1 micra	Microscopio Simple: Objetivo seco.	} Desde 100 micra Hasta 0.20 micra	} Tejidos	} Histología
	Microscopio Óptico: Objetivo inmersión	} Desde 1 micra Hasta 0.20 micra		
	Microscopio de Contraste de fases	} Células	} Citología	
	Microscopio de iluminación lateral (fondo oscuro)			
	Microscopio de Rayos Ultravioletas			} Desde 1 micra Hasta 0.1micra (1000 Å)
Microscopio de Interferencia de fase				
Submicroscópico Límite inferior 5 Å	Microscopio de polarización Microscopio electrónico	} Desde 1000 Å Hasta 5 Å	} Estructuras Celulares Virus Proteínas	} Ultraestructura del protoplasma y sus derivados
Amicroscópico (métodos indirectos) Límite inferior 1 Å	Luz Polarizada Difracción de rayos X	} Desde 10 Å Hasta 1 Å		

La Figura A1 es un esquema comparativo de los diferentes límites de resolución para varios microscopios y sus principales aplicaciones.

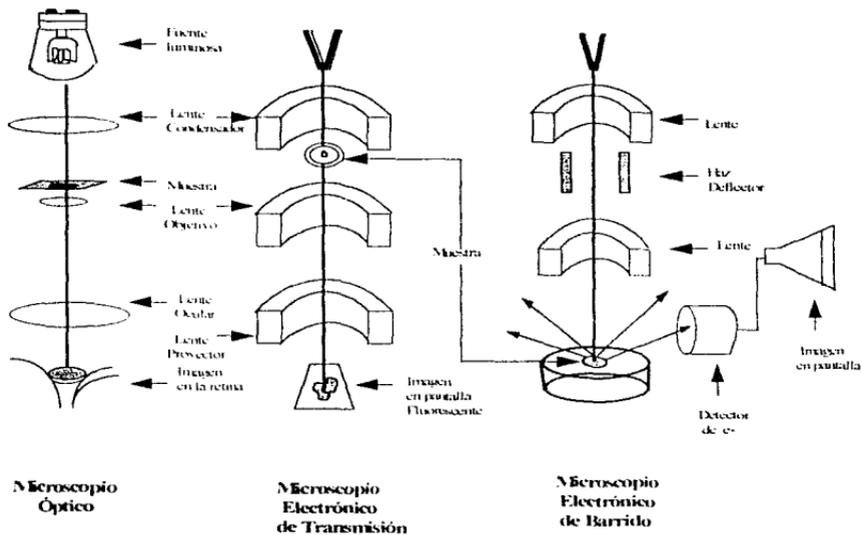


Figura A11. Diagrama Esquemático de tres tipos de Microscopios.