



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

20  
2e  
MEX

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

IN VITRO: ESTUDIO CUANTITATIVO DE LA EROSION DEL ESMALTE POR LA EXPOSICION A REFRESCOS Y/O BEBIDAS REFRESCANTES NO ALCOHOLICAS

TESIS PROFESIONAL  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
CIRUJANO DENTISTA  
P R E S E N T A N :  
LUZ DEL CARMEN ANDRADE DELGADO  
CARLOS MAGAÑA REYES

DIRECTOR DE TESIS:  
DR. JUAN CARLOS HERNANDEZ GUERRERO



MEXICO, D. F.

1998.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

260923



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 mis padres:

En especial a mi madre María Elena Delgado Flores

por su cabal apoyo, amor, dedicación y fortaleza.

A mis hermanos con gran amor:

Aurea, Laura, Fernando, Leonardo y Rafael.

De distintas formas me impulsaron a concluir este trabajo.

A mis abuelitos, por ser el eje y ejemplo de amor

Raúl Delgado Padilla † y Ma. Elena Flores Gómez.

A mis Tíos y primos, que con su gran amor y apoyo me dieron

un alivio permitiendo mi desarrollo profesional.

En especial a mis tíos Enrique y Mary Carmen

que con confianza, apoyo y amor paternal me

dieron los principales fundamentos para la vida.

Al Dr. Gerardo Maupomé Carvantes, que ni con la enorme distancia que nos separa se puede opacar su gran amistad, confianza y diligencia en el desarrollo de este trabajo, con su entereza y cabal ejemplo me mostró profundos valores para la vida.

A nuestro Padre DIOS

porque en todo momento te haces presente mostrándome  
tu gran amor y bondad y eso me recuerda día a día  
que hay que esforzarse para ser mejores.

A todos mis amigos y compañeros, en especial a  
Carlos que me ha acompañado en este trabajo,  
Enrique mi primazo del alma y a todos los que me  
estimularon a concluir este trabajo, MIL GRACIAS.

A mis padres:

José Ma. Magaña †, y en especial a mi madre

Gudelia Reyes de Magaña por su apoyo y

ayuda en todo momento.

A mis hermanos:

José Angel y Yadira Elizabeth

A mi primo Rodolfo Carreón R por ser la  
pauta que me condujo hacia esta  
maravillosa profesión.

**A mi abuelita Zenaida**

**y mi tía Lidia.**

**A mi sobrina Karen Magaña G.**

**A mi primas Elisa y Antonia.**

**A todos mis amigos y compañeros,  
a todas aquellas personas que de  
alguna manera contribuyeron a este  
proyecto de vida, especialmente a  
Luz por haberme invitado a ser  
parte de esta investigación.**

A Dios porque con su guía  
hizo que mi vida cambiara,  
siendo así el estímulo constante  
de superación y la razón  
principal de este proyecto  
de vida.

A nuestro asesor:

Dr. Juan Carlos Hernández Guerrero

por su gran apoyo, estímulo y diligencia.

A todos nuestros profesores y en especial

al Dr. Gerardo Maupomé Carvantes.

A la Universidad por brindamos la  
oportunidad de desarrollarnos como  
ciudadanos y profesionales probos.

A nuestra Facultad de Odontología, a la  
División de Estudios de Posgrado e  
Investigación y a todo el personal que  
labora en ellos.

**Al Instituto de Física:**

**En especial al Dr. Victor M. Castaño Meneses**

**Al Instituto de Materiales:**

**En especial al Dr. Gabriel Torres Villaseñor.**

**Al Instituto de Ingeniería:**

**En especial al Ing. José Luis Rodríguez Pérez.**

## ÍNDICE

I.	Resumen.	1
II.	Introducción y Antecedentes.	3
2.1	Esmalte.	4
2.1.1	Propiedades Físicas.	4
2.1.2	Propiedades Químicas.	5
2.1.2.1	Fig. 1: Tabla de porcentajes de los principales componentes del esmalte, dentina y cemento.	6
2.2	Estructura del Esmalte.	7
2.2.1	Prismas.	7
2.3	Estructura Submicroscópica.	7
2.3.1	Estrías transversales.	8
2.3.2	Orientación de los prismas.	9
2.3.3	Bandas de Hunter-Schreger.	9
2.3.4	Estrías de Retzius (Líneas incrementales).	10
2.4	Estructuras Superficiales.	10
2.4.1	Cutícula del esmalte.	12
2.4.2	Laminillas o fisuras del esmalte.	12
2.4.3	Penachos del esmalte o de Linderer.	14
2.4.4	Límite amelodentinario.	14
2.4.5	Fibrillas de Tomes y husos adamantinos.	15
2.5	Origen, Composición y Funciones de la saliva.	15
2.5.1	Generalidades de las glándulas salivales.	15
2.5.2	Clasificación de las glándulas salivales.	16

2.5.2.1	Por su tamaño.	16
2.5.2.2	Por su secreción.	18
2.5.3	Composición química de la saliva.	18
2.5.3.1	Fig. 2: Tabla de componentes electrolíticos en mEq/litro y orgánicos en mg/100 mL de las glándulas salivales mayores y del plasma.	20
2.5.4	Proteínas salivales.	20
2.5.4.1	Clasificación de las proteínas salivales.	21
2.5.4.2	Fig. 3: Tabla que muestra la clasificación de las proteínas salivales de acuerdo a la familia a que pertenecen, su función y composición química.	22
2.5.5	Funciones salivales.	23
2.5.5.1	Formación de películas adquiridas.	23
2.5.5.2	Actividad antimicrobiana.	23
2.5.5.3	Capacidad amortiguadora (Buffer).	24
2.5.5.4	Proceso de mineralización.	24
2.5.5.5	Defensa.	25
III.	Planteamiento y justificación del problema.	26
IV.	Objetivos.	27
4.1	Objetivo general.	27
4.2	Objetivos específicos.	27
V.	Hipótesis.	28
VI.	Materiales y Métodos.	29
6.1	Preparación de las losetas de esmalte.	29

6.2	Recolección de saliva y formación de película adquirida.	30
6.3	Preparación del buffer de fosfato salino a 0.1 M.	30
6.4	Procedimientos de laboratorio.	31
6.5	Grupos control.	32
6.6	Análisis cuantitativo.	32
6.7	Fotografías.	33
6.7.1	Fig. 4: Fotografía de los dientes extraídos donde se muestra la sujeción de las raíces con acrílico autopolimerizable dentro de un cubo de inclusión para hacer cortes al microtomo.	34
6.7.2	Fig. 5: Fotografía que muestra al aparato de corte diseñado con un microtomo y un motor eléctrico.	35
6.7.3	Fig. 6: Fotografía que muestra los contenedores de las tosetas y el agitador magnético para dar movimiento al refresco.	36
6.7.4	Fig. 7: Fotografía que muestra el aparato de Microdureza (Shimadzu, Kyoto).	37
VII.	Resultados.	38
7.1	Ensayos de grupos control.	38
7.2	Ensayos tanto CON como SIN película adquirida.	38
7.3	Ensayo SIN película adquirida.	39
7.4	Ensayo CON película adquirida.	40
7.5	Gráficas y tablas de resultados.	40
7.5.1	Fig. 8: Comparación de los grupos control a) grupos con y sin antibiótico y b) grupos almacenados en H <sub>2</sub> O DD y en saliva.	41

7.5.2 Fig. 9: Microdureza de las losetas de esmalte en el día cero de todos los grupos experimentales.	42
7.5.3 Fig. 10: Comparación de grupos con y sin flujo (análisis SIN película adquirida).	43
7.5.4 Fig. 11: Comparación de regímenes de ingesta bajo, medio y alto (análisis SIN película adquirida).	44
7.5.5 Fig. 12: Comparación de los grupos con y sin flujo (análisis CON película adquirida).	45
7.5.6 Fig. 13: Comparación de regímenes de ingesta bajo, medio y alto (análisis CON película adquirida).	46
VIII. Discusión.	47
IX. Conclusiones.	51
X. Bibliografía.	52

## I. RESUMEN

La erosión es la disolución química de los tejidos dentarios (principalmente esmalte) en ausencia de bacterias<sup>1,2</sup>. El potencial erosivo de los refrescos ha sido reportado antes, tanto *in vivo* como *in vitro*<sup>3,4,5</sup>. Sin embargo, muchos estudios han empleado intervalos de inmersión en refresco extremadamente largos, como p ej: 15-180 min; 120 min; 24 h o más, tales como 72 h., los cuales no reflejan en forma precisa el impacto real del consumo de refrescos sobre los tejidos dentales<sup>6,7</sup>. México es el segundo lugar después de los Estados Unidos de Norteamérica en consumo de refrescos con cifras de 627.4 refrescos individuales por persona al año<sup>8,9,10,11,12</sup>. Cerca del 5% de la población bebía entre 5 y 10 refrescos al día, encontrándose que los refrescos de lata o botella, calóricos o no-calóricos tenían un pH entre 2.4 y 3.3. Estos valores de pH son comunes en otras partes del mundo<sup>8,13,14</sup>. La presente investigación *in vitro* analizó cuantitativamente el efecto erosivo de los refrescos bajo un patrón realista de consumo en la población mexicana<sup>8</sup>. Se constituyeron doce diferentes grupos experimentales con tres losetas de esmalte dental cada uno; cada una fue sometida a baños y/o inmersiones en refresco (pH de 2.6) con duración de 5 minutos cada sesión. Estas inmersiones fueron (1) CON o SIN incubación previa en saliva (para formar una película adquirida de proteínas salivales); (2) con o sin agitación del refresco; y (3) bajo tres diferentes regímenes de ingesta (una; cinco y diez inmersiones al día). La evaluación cuantitativa de la superficie erosionada se realizó durante 8 días con pruebas de microdureza Vickers, analizándose los

datos mediante regresión lineal múltiple, ANOVA de una vía y prueba t de Student. Los resultados mostraron que la caída mayor de la microdureza ocurrió del día basal al primer día de inmersión en refresco. Después continuó hasta el 8° día, aunque en forma menos marcada. En el ensayo SIN película adquirida, la agitación provocó disminución en la microdureza solamente en los días 5, 6, 7 y 8, en donde las losetas del grupo de alta ingesta tuvieron menor microdureza que el grupo de baja ingesta. En el ensayo CON película adquirida la presencia de flujo no provocó diferencias en ningún día, pero el nivel de ingesta, desde el día 1 hasta el 8, causó diferencias significativas entre los tres grupos. Es interesante señalar que prácticamente no hubo diferencias entre las lecturas obtenidas de los ensayos de baja y mediana ingesta, sugiriendo así que una caída similar en la microdureza puede obtenerse de una inmersión al día en refresco o de cinco inmersiones.

## II. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

La erosión es la disolución química de los tejidos dentarios en ausencia de bacterias<sup>1,2</sup>. La erosión provocada al esmalte dental mediante bebidas ácidas ha sido estudiada desde 1945<sup>5</sup> a la fecha. El patrón epidemiológico de la erosión no es en sí causa de inquietud como un problema de salud pública<sup>15,16</sup>, pero es un hecho que la ingesta frecuente de bebidas ácidas puede causar erosión del esmalte<sup>17</sup>, constituyendo un verdadero problema clínico. Este peligro es real si se considera que en México, como en otros países subdesarrollados, con el paso del tiempo han sido modificados los hábitos alimenticios por el consumo generalizado de alimentos y bebidas industrializadas<sup>18</sup>. Estos cambios en los patrones de alimentación también conllevan otras implicaciones, como su potencial cariogénico para la salud bucodental<sup>19,20,21,22</sup>. En México se ha anunciado que el mercado mexicano de los refrescos es muy grande y sigue creciendo, con alrededor de 500 botellas o latas ingeridas por persona/año: México es el segundo lugar después de los Estados Unidos de Norteamérica en consumo de refrescos<sup>9,10</sup>.

## 2.1 ESMALTE

### 2.1.1 Propiedades Físicas.

El esmalte es el tejido más mineralizado que se conoce en el cuerpo humano, teniendo un 96% de minerales y sólo el 4% de materia orgánica, se encuentra recubriendo la corona de las piezas dentales, tiene relación directa con el medio bucal por su superficie externa y con la dentina subyacente por su superficie interna. En el cuello de la corona, tiene relación inmediata o mediata con el cemento que recubre la raíz, en este nivel es extremadamente delgado y va en aumento hacia las cúspides alcanzando un máximo espesor de 2 a 2.5 mm en las zonas de grandes impactos masticatorios de premolares, molares y caninos superiores. Es el único tejido dentario de origen ectodérmico, elaborado por células derivadas del epitelio que recubren los rebordes maxilares embrionarios.

Debido a su elevado contenido de sales minerales y a su organización cristalina, el esmalte es el tejido calcificado de mayor dureza en el cuerpo humano, similar a la dureza de la apatita natural, ubicada en el 5° lugar en la escala de Mohs; en esta escala, la dureza se compara con la de diez minerales diferentes en orden ascendente: 1) talco, 2) yeso, 3) calcita, 4) fluorita, 5) apatita, 6) ortoclase (feldespato), 7) cuarzo, 8) topacio, 9) zafiro (corundum) y 10) diamante.

La elasticidad del esmalte es muy escasa como resultado de su alto contenido en sales minerales y a su bajo contenido de sustancia orgánica, comportándose como un tejido frágil y quebradizo (fenómeno de friabilidad), fácilmente advertible sobre todo cuando el esmalte pierde su base firme de dentina; su tendencia a la

fractura sigue la orientación de los prismas y sustancia interprismática (plano de clivaje). La densidad del esmalte es de 2.8 y su peso específico 2.95.

Otra propiedad del esmalte es su permeabilidad; mediante marcadores radioactivos se ha descubierto que actúa como una membrana semipermeable, permitiendo el paso completo o parcial de ciertas moléculas:  $C^{14}$ -urea,  $I^{131}$ , etc. Éste mismo fenómeno se ha advertido por medio de colorantes tanto *in vivo* como *in vitro*.

Se ha sugerido que el color de la corona cubierta de esmalte está determinado por diferencias de transparencia del esmalte que varía entre un blanco amarillento y un blanco grisáceo, dicha transparencia o translucidez podría atribuirse a variaciones del grado de calcificación y homogeneidad del esmalte. Debido a su estructura cristalina, el esmalte es un tejido birrefringente con una ligera negatividad motivada por las distintas inclinaciones de los cristales de hidroxiapatita.

Otra propiedad importante es la alta radiopacidad debido a su elevada mineralización, oponiéndose al paso de los rayos X.

### 2.1.2 Propiedades Químicas.

El esmalte está formado principalmente por material inorgánico (en términos de peso de 94-97%), predominando el deca cálcico hidratado, que responde a la fórmula  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)$ , muy similar a las apatitas naturales, denominado por sus características químicas hidroxiapatita. Existe una pequeña cantidad de sustancia orgánica (1.5%), siendo la proteína del esmalte del tipo estructural y a la

cual se ha denominado amelina o enamulina; durante su desarrollo, la matriz del esmalte revela grupos sulfhidrilos y otras reacciones que sugieren queratina. Los hidrolizados de la matriz madura de esmalte demuestran aminoácidos tales como: histidina 1; lisina 3; arginina 10, los cuales luego disminuyen notablemente. Estas proteínas contienen un alto porcentaje de serina, ácido glutámico y glicina, revelándose por medio de estudios de difracción de rayos X que su estructura molecular es típica del grupo de proteínas  $\beta$ -cruzadas.

Dentro de las sustancias orgánicas no proteicas del esmalte, se encuentran principalmente al ácido cítrico o citratos, carbohidratos como galactosa, lípidos, etc. (Fig. 1).

Fig. 1 (2.1.2.1): Tabla de porcentajes de los principales componentes del esmalte, dentina y cemento.

Tejido	Agua	Materia Orgánica	Materia Mineral	Calcio	Fosfatos	Carbonatos	otros
Esmalte	4.5%	1.5% (Amelina)	94%	35%	51%	3.75%	10.25%
Dentina	10%	25% (Colágena)	65%	24%	36%	3.15%	36.85%
Cemento	32%	22% (Colágena)	46%	13%	20%	4%	63%

## 2.2 ESTRUCTURA DEL ESMALTE

### 2.2.1 Prismas.

El esmalte se encuentra formado por varillas o prismas del esmalte, las vainas de los prismas, y sólo en algunas regiones por cemento interprismático. El número de prismas varía desde 5 millones para los incisivos laterales inferiores hasta 12 millones en los primeros molares superiores, a partir del límite amelodentinario los prismas siguen un curso relativamente sinuoso hacia la superficie del diente, siendo la longitud de la mayoría de ellos mayor que la del espesor del esmalte debido a su orientación oblicua y a su acodamiento. En el microscopio óptico se observó que el diámetro de los prismas es de 4  $\mu\text{m}$  en promedio, y que aumenta desde el límite amelodentinario hacia la superficie del esmalte en proporción de 1:2 aproximadamente.

Los prismas del esmalte fueron descritos por primera vez por Retzius en 1837; en condiciones normales son translúcidos, permitiendo el paso de la luz a través de ellos. En corte transversal y vistos con el microscopio óptico tienen aspecto hexagonal y algunas veces se ven redondos u ovalados.

## 2.3 ESTRUCTURA SUBMICROSCÓPICA

Únicamente la microscopía electrónica puede responder muchas interrogantes acerca de la morfología del esmalte. El modelo más común es el del prisma en ojo de cerradura o en forma de remo en donde los "cuerpos" de los prismas están

más cerca de las superficies oclusal e incisal, mientras que las "colas" se encuentran en dirección cervical.

Los estudios con el microscopio electrónico han hecho posible describir con más precisión la orientación de estos cristales, siendo aproximadamente paralelos al eje longitudinal de los prismas en sus "cuerpos" o "cabezas" y se desvían unos 65 grados de este eje al abrirse en abanico al llegar a las "colas" de los prismas; su longitud se calcula que varía entre 0.05 y 1  $\mu$ . En corte transversal, los cristales del esmalte humano tienen forma hexagonal irregular y un espesor promedio de 30 nanómetros (nm) (300 unidades Angstrom, (Å)) y un ancho promedio de 90 nm (900 Å).

Los cristales del esmalte son mucho más grandes que los de la dentina, cemento y hueso. La matriz orgánica probablemente forma una envoltura que rodea a cada cristal de hidroxiapatita.

### **2.3.1 Estrias transversales.**

Cada prisma de esmalte está compuesto por segmentos separados por líneas oscuras dándole un aspecto estriado y resultan más visibles por la acción de ácidos débiles, siendo más pronunciadas en el esmalte menos calcificado. Los prismas están segmentados debido a la formación rítmica del esmalte teniendo una longitud uniforme de 4  $\mu$ m aproximadamente.

### **2.3.2 Orientación de los prismas.**

En los dientes permanentes, los prismas generalmente se encuentran orientados en ángulo recto con la superficie de la dentina. Cerca del borde incisal o en la punta de las cúspides cambian gradualmente de dirección, siendo cada vez más oblicua hasta que en la región del borde o la punta de las cúspides son casi verticales; en la región cervical los prismas se desvían en dirección apical. Rara vez, o nunca, los prismas son rectos; siguen una trayectoria ondulada desde la dentina hasta la superficie del esmalte. La única diferencia importante en relación a dicha orientación de los prismas para los dientes deciduos es que se encuentran casi horizontales en las partes cervical y central de la corona.

### **2.3.3 Bandas de Hunter-Schreger.**

Se deben al cambio de orientación de los prismas y son bandas oscuras y claras alternadas de ancho variable que se observan mejor en un corte longitudinal por desgaste con luz oblicua reflejada. Tienen origen en el borde amelodentinario dirigiéndose hacia afuera para terminar a cierta distancia de la superficie externa del esmalte. La prolija descalcificación y coloración del esmalte ha proporcionado nuevas pruebas de que estas estructuras están compuestas por zonas alternadas que tienen una permeabilidad ligeramente diferente y disímil contenido de material orgánico.

### **2.3.4 Estrias de Retzius (líneas incrementales).**

En los cortes por desgaste del esmalte aparecen en forma de bandas parduscas, las cuales demuestran la forma como se desarrolla el esmalte, esto es, la aposición sucesiva de capas de tejido durante la formación de la corona. En cortes longitudinales se las observa concéntricas a la cúspide de dentina, presentando un recorrido oblicuo en las porciones cervicales de la corona. Desde el límite amelodentinario hacia la superficie se desvían en sentido oclusal, observándose en los cortes transversales como círculos concéntricos.

Las estrias de Retzius, cuando son de intensidad moderada, se consideran normales. Las alteraciones metabólicas provocan que los períodos de descanso se prolonguen causando el ensanchamiento de las mismas, tornándolas más evidentes.

## **2.4 ESTRUCTURAS SUPERFICIALES**

Se ha descrito una capa de esmalte relativamente aprismático de aproximadamente 30  $\mu\text{m}$  de espesor en el 70% de los dientes permanentes y en todos los dientes deciduos. Se encuentra con menor frecuencia sobre los extremos de las cúspides y más comúnmente hacia las áreas cervicales de la superficie del esmalte. Es algo menos mineralizada que el resto del esmalte que se encuentra por debajo de ella; se han observado otros detalles microscópicos en las superficies externas del esmalte de dientes recién erupcionados, tales como periquimatías, extremos de los prismas del esmalte y laminillas o fisuras.

*Las periquimatías* son rodetes transversales, ondulados, que se cree son la manifestación externa de las estrías de Retzius. Se continúan alrededor del diente y por lo general son paralelas entre sí y con respecto al límite cementoadamantino existen alrededor de 30 periquimatías por milímetro y su concentración disminuye poco a poco hasta unos 10 por milímetro cerca del borde oclusal o incisal; su curso es bastante regular, aunque en la región cervical puede ser muy irregular.

*Los extremos de los prismas del esmalte* son cóncavos, de profundidad y forma variables, son menos profundos en las regiones cervicales y más profundos cerca de los bordes incisal u oclusal.

*Las laminillas o fisuras* se extienden por espacio de una distancia variable a lo largo de la superficie en ángulo recto con el límite amelodentinario, en el cual tienen su origen. La mayoría de ellas tienen menos de un milímetro de longitud, están uniformemente espaciadas pero las laminillas largas son más gruesas que las cortas.

El desarrollo del esmalte de los dientes deciduos comienza antes del nacimiento y prosigue después del mismo. El límite entre estas dos porciones de esmalte en los dientes temporales se distingue en una estría de Retzius acentuada llamada línea neonatal o anillo neonatal, al parecer es el resultado de un brusco cambio de las condiciones ambientales y nutricionales del recién nacido, generalmente el esmalte prenatal se encuentra mejor desarrollado que el posnatal, lo cual explica el hecho de que el feto se desarrolla en un medio bien protegido con un suministro adecuado de todas las sustancias esenciales, a expensas de la madre.

### **2.4.1 Cutícula del esmalte.**

Denominada también *membrana de Nasmyth*, cubre toda la superficie de la corona del diente recién erupcionado pero probablemente se pierde pronto por la masticación. Los estudios con el microscopio electrónico indican que esta membrana es una lámina basal típica que se encuentra por debajo de la mayoría de los epitelios, y es secretada por los ameloblastos cuando se completa la formación del esmalte. Aparentemente, esta cutícula es secretada después de que el órgano del esmalte se retrae de la región cervical durante el desarrollo del diente.

El esmalte erupcionado está cubierto normalmente por una película, que parece ser un precipitado de proteínas salivales que se forma a pocas horas de haber limpiado mecánicamente la superficie del esmalte. Uno o dos días después de haberse formado la película, se coloniza con microorganismos para formar la placa bacteriana.

### **2.4.2 Laminillas o fisuras del esmalte.**

Son estructuras finas, foliadas, que se extienden de la superficie del esmalte hacia el límite amelodentinario y en ocasiones hasta la dentina penetrando en ella. Están compuestas por material orgánico con poco contenido mineral. Para diferenciarlas de las resquebrajaduras, es necesario llevar a cabo una cuidadosa descalcificación de los cortes por desgaste del esmalte; dichas resquebrajaduras desaparecen mientras que las laminillas del esmalte no. Las fisuras del esmalte

pueden desarrollarse en los planos de tensión, de tal modo que es posible diferenciar tres tipos de fisuras o laminillas del tipo A, laminillas formadas por segmentos de prismas poco calcificados, del tipo B, laminillas formadas por células degeneradas (circundantes); y tipo C, laminillas originadas en dientes erupcionados donde las resquebrajaduras han sido ocupadas por material orgánico, presuntamente proveniente de la saliva. Las laminillas del tipo A están exclusivamente circunscritas al esmalte, pero los tipos B y C pueden llegar hasta la dentina. Si las células del órgano del esmalte llenan una resquebrajadura del esmalte, las que se alojan en su profundidad degeneran en tanto que las que se encuentran próximas a la superficie pueden conservar su vitalidad durante un tiempo y producir una cutícula cornificada en la hendidura. Si el tejido conectivo invade una resquebrajadura del esmalte, puede formarse cemento.

Las laminillas se extienden en dirección longitudinal y radial del diente, desde la cúspide de la corona hasta la región cervical. Se ha sugerido que las laminillas del esmalte podrían ser el sitio menos resistente de un diente y constituir la vía de entrada de las bacterias que ocasionan la caries.

### **2.4.3 Penachos del esmalte o penachos de Linderer.**

Tienen su origen en el límite amelodentinario y recorren al esmalte desde un quinto a una tercera parte de su espesor. No nacen en un área única pequeña, sino que es una estructura angosta y acintada, cuyo extremo interno tiene origen en la dentina. La impresión de penacho se crea con el examen de dichas estructuras en cortes gruesos con poco aumento.

Los penachos están constituidos por prismas del esmalte hipocalcificados y sustancia interprismática; se extienden en el sentido del eje longitudinal de la corona, por tanto se observan abundantemente en cortes horizontales, y raras veces en los longitudinales. Su presencia y su desarrollo son consecuencia de condiciones especiales en el esmalte, o una adaptación a ellas.

### **2.4.4 Límite amelodentinario.**

Aquí la superficie de la dentina está constituida por concavidades o fositas, las que son rellenadas por esmalte. Esta relación asegura la firme retención del esmalte sobre la dentina, en cortes aparece como una línea festoneada, la cual está formada aún antes del desarrollo de los tejidos duros y es evidente en la organización de los ameloblastos y la membrana basal de la papila dentaria.

En micro-radiografías de cortes por desgaste puede demostrarse a veces una zona hipermineralizada de 30  $\mu\text{m}$  de espesor. Ésta es más evidente antes de completarse la mineralización.

#### **2.4.5 Fibrillas de Tomes y husos adamantinos.**

Parecen originarse en prolongaciones de los odontoblastos que se han extendido atravesando el límite amelodentinario hasta el epitelio del esmalte antes de la aparición de sustancias minerales. Dado que muchas de ellas están engrosadas en sus extremos se las denomina husos adamantinos. La dirección de las prolongaciones odontoblásticas y de los husos en el esmalte corresponde a la dirección original de los ameloblastos, siendo en ángulo recto con respecto a la superficie de la dentina y en forma divergente. En cortes por desgaste de dientes secos, el contenido orgánico de los husos se desintegra y es reemplazado por aire, de modo que los espacios aparecen oscuros con luz transmitida<sup>23,24,25</sup>.

### **2.5 ORIGEN, COMPOSICIÓN Y FUNCIONES DE LA SALIVA**

#### **2.5.1 Generalidades de glándulas salivales.**

Las glándulas salivales son de secreción externa, con arquitectura tubuloalveolar, es decir, compuestas en general por un sistema acinar y un sistema ductal pero con grandes variaciones en la estructura microscópica. La estructura funcional de las glándulas salivales está dada por las unidades secretoras. Estas unidades a su vez están conformadas por los acinos, formados por capas de células glandulares secretoras encargadas de la formación de saliva primaria o isotónica, para ser posteriormente vaciada en una serie de conductos en donde se encuentran diferentes tipos de células que modifican la composición

de la saliva primaria a saliva hipotónica, así como de células mioepiteliales y en algunas ocasiones oncocitos<sup>26</sup>.

El estroma se encuentra formado por tejido conjuntivo fibroso laxo, el cual es el formador de los tabiques interlobililares, interlobulares, la cápsula, vasos sanguíneos, linfáticos, nervios (simpáticos y parasimpáticos) y por células plasmáticas que intervienen en la síntesis de IgA secretora. Este es de vital importancia para asegurar la arquitectura de la glándula salival durante la masticación, además de encargarse del transporte de metabolitos a través del sistema vascular aferente, sistema vascular eferente y de la transmisión del estímulo mediante fibras nerviosas autónomas<sup>26,27</sup>.

## **2.5.2 Clasificación de las glándulas salivales.**

Éstas se clasifican en dos grandes grupos; de acuerdo a su tamaño en glándulas salivales mayores y en glándulas salivales menores y por el tipo de secreción en glándulas mucosas, serosas y de secreción mixta<sup>26,27</sup>, como se detallan a continuación :

### **2.5.2.1 Por su Tamaño en:**

**A) Glándulas salivares mayores.** Las cuales se encuentran inervadas por el Sistema Nervioso Autónomo y son:

**Parótida:** Se encuentra formada principalmente por células serosas que producen amilasa y sustancias antibacterianas como lisozimas y lactoferrinas<sup>26</sup>.

Esta glándula presenta un lóbulo superficial y uno profundo con forma de triángulo tridimensional invertido y se localiza en el borde posterior de la mandíbula siendo su conducto principal el de Stensen, desembocando a la altura de los segundos molares superiores.

Submandibular: Es una glándula mixta, presenta un diámetro aproximado de 2-3 cm y se localiza por debajo y dentro del ángulo inferior de la mandíbula, siendo su conducto principal el de Wharton, que entra a través de los orificios debajo del frenillo lingual.

Sublingual: Es una glándula mixta, la cual se localiza por debajo de la línea mucosa del piso de la boca. Presenta un lóbulo mayor, el cual desemboca por debajo de la lengua en el conducto de Bartholin y lóbulos menores los cuales tienen conductos individuales en el pliegue lingual cerca de la base de la lengua.

**B) Glándulas salivales menores.**

Mucosa cavidad bucal	
Labiales	
Piso de la boca	
Tercio posterior del paladar duro	
Paladar blando	
Linguales	Glándulas de Blandin-Nuhn Glándulas de Von Ebner Glosopalatinas

2.5.2.2 Por su Secreción:

a) Mucosas:	Lengua (base y borde lateral) Paladar	
b) Serosas:	Parótida Von Ebner	
c) Mixtas:	Glándula submandibular Sublingual Salivales menores:	Labios Mucosa bucal Apicales de la lengua

2.5.3 Composición química de la saliva.

Está demostrado que la producción aproximada diaria de flujo salival es de 1-1.5 litros <sup>26,28,29</sup>, lo cual está sujeto a una serie considerable de cambios fisiológicos entre los cuales se encuentran comer, el ritmo cardiaco, el clima, tipo de alimentación, el efecto de la luz, la edad, el sexo, el sueño y la actividad física <sup>26</sup>.

La saliva total está conformada por sustancias de diferentes pesos moleculares, como electrolitos, proteínas, enzimas, sustancias no electrolíticas, el fluido gingival crevicular, bacterias y células descamadas. Además posee elementos inmunológicos y no inmunológicos para proteger las superficies de los tejidos bucales; también contiene péptidos y proteínas únicas que ayudan a mantener la

integridad de los dientes contra el constante traumatismo químico, físico y microbiano <sup>26,30</sup>.

En el caso de los electrolitos, como ya se ha mencionado, varían de acuerdo a ciertos factores como el ritmo circadiano, el pH de la saliva y el flujo salival. Por ejemplo, el contenido de fosfato inorgánico disminuye muy temprano en la mañana (6:00 AM) y alcanza su máximo en la tarde (6:00 PM). Iones como el sodio, yodo y cloro muestran una relación totalmente inversa a la mencionada. Finalmente la concentración del ión potasio es independiente por completo y no muestra este tipo de variación cada 12 horas <sup>26,28,29</sup>.

Fig. 2 (2.5.3.1): Tabla de componentes electrolíticos en mEq/litro y orgánicos en mg/100 mL de las glándulas salivales mayores y del plasma.

<u>Electrolitos</u> (mEq/litro)	<u>Componentes</u>	<u>Parótida</u>	<u>Submandibular</u>	<u>Sublingual</u>	<u>Plasma</u>
	Potasio	21.0/24.0	17.0/14.4	13.2	4.0
	Sodio	36.0/1.3	45.0/3.3	32.7	140.0
	Cloro	28.0/22.0	25.0/12.0	26.2	105.0
	Bicarbonato	30.0/1.1	18.0/4.0	10.9	27.0
	Calcio	1.6/1.1	2.4/1.56	2.1	5.0
	Magnesio	0.12/0.16	0.04/0.07	?	2.0
	Fosfato	3.7/9.0	5.5/5.6	4.1	2.0
<u>Orgánicos</u> (mg/100 mL)	<u>Componentes</u>	<u>Parótida</u>	<u>Submandibular/ Sublingual</u>	<u>Plasma</u>	
	Proteína	221.0	132.0	7.000	
	Lípidos	8.0	8.0	600	
	Carbohidratos	31.0	15.0	100-140	

#### 2.5.4 Proteínas salivales.

Las proteínas salivales son sintetizadas mediante mecanismos biosintéticos convencionales denominados mecanismos de "translación", en donde un mensaje en forma de ARNm es transcrito por los genes presentes en el núcleo de las células acinares. Durante estos mecanismos, las proteínas pueden sufrir modificaciones postranslacionales por la adición de carbohidratos (glucosilación), sulfatos (sulfación), fosfatos (fosforilación) y/o lípidos (acilación)<sup>30</sup>.

La concentración total de proteínas, así como de aminoácidos que se encuentran en la saliva depende no sólo del tipo de sujeto evaluado sino de los métodos utilizados para recolectar saliva y de la clase de saliva que se trate <sup>26,27,30,31</sup>.

Estas proteínas incluyen a las enzimas digestivas como la alfa-amilasa y a muchas glucoproteínas, las cuales determinan la viscosidad de la saliva. Otros constituyentes, como son la albúmina y algunas inmunoglobulinas, se difunden pasando del suero a la saliva primaria, mediante gradientes de concentración.

Se ha observado que la secreción de las glándulas salivales contiene al menos 40 proteínas diferentes y glucoproteínas, las cuales desempeñan un papel protector importante dentro de la cavidad bucal, ya sea de manera independiente o formando complejos moleculares.

#### 2.5.4.1 Clasificación de las proteínas salivales.

De acuerdo a su función biológica y composición química, las proteínas salivales se clasifican en varias moléculas salivales, cuyas funciones biológicas se expresan, ya sea cuando se encuentran libres en solución (saliva) o bien cuando se absorben a la superficie de los dientes y tejidos blandos o mucosas. Cabe señalar que las características funcionales de cada uno de estos componentes salivales dependen de sus caracteres estructurales. Por lo tanto, una alteración en su estructura molecular ya sea por el huésped o por enzimas microbianas, pueden cambiar por completo su función <sup>27,30,31</sup>.

Fig. 3 (2.5.4.2): tabla que muestra la clasificación de las proteínas salivales de acuerdo a la familia a que pertenecen, su función y composición química.

<b>FAMILIA</b>	<b>FUNCIÓN</b>	<b>COMP. QUÍMICA</b>
1. Mucinas: Alto peso molecular MG1 Bajo peso molecular MG2	1. Complejos heterotípicos. 2. Limpieza y adherencia microbiana 3. Nutriente microbiano. 4. Lubricación 5. Digestión y gusto 6. Formación de películas intrabucales	Glucoproteína
2. Proteínas ricas en prolina y glucoproteína	1. Limpieza y adherencia microbiana 2. Modula el equilibrio de calcio y fosfato 3. Lubricación 4. Nutriente microbiano 5. Formación de películas intrabucales	Fosfoproteínas y glucoproteínas
3. Histatina y estaterina	1. Modula el equilibrio de Ca <sup>2+</sup> y PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> 2. Modula crecimiento de flora bucal 3. Antimicótico 4. Amortiguador de pH salival	Proteínas y fosfoproteínas
4. Cistatinas	1. Modula equilibrio Ca <sup>2+</sup> y PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> 2. Modula crecimiento flora bucal 3. Complejos heterotípicos 4. Formación de películas intrabucales	Proteínas y fosfoproteínas
5. α Amilasa	1. Digestión de carbohidratos complejos 2. Complejos heterotípicos 3. Formación de películas intrabucales 4. Actividad antimicrobiana 5. Digestión y gusto 6. Modula el crecimiento de flora bucal	Proteínas y glucoproteínas
6. Lisozima	1. Actividad antimicrobiana 2. Interacción con otras moléculas 3. Formación de películas intrabucales	Proteína
7. Lactoferrina	1. Actividad antimicrobiana 2. Interacción con otras moléculas 3. Formación de películas intrabucales	Glucoproteína
8. Calicreína	1. Procesamiento postranslacional de las PRPs y cistatinas	Glucoproteína
9. Peroxidasa salival	1. Catalizador en la formación de productos tóxicos para algunas bacterias	Glucoproteína
10. IgA secretora	1. Interacción con otras moléculas 2. Formación de películas intrabucales 3. Limpieza y adherencia microbiana 4. Actividad antimicrobiana	Glucoproteína

## **2.5.5 Funciones salivales.**

### **2.5.5.1 Formación de películas adquiridas.**

Algunos componentes salivales tienen la propiedad de adsorberse de acuerdo a sus propiedades físicoquímicas de manera muy selectiva al esmalte de los dientes, superficies microbianas y a las células epiteliales. A su vez, cada una de estas moléculas forma complejos moleculares las cuales interactúan colectivamente para formar películas protectoras que ayudan a la lubricación, a la formación de barreras permeables contra ácidos, y a la modulación de la adherencia microbiana. Las mucinas forman complejos con factores antimicrobianos tales como la IgAs, lisozima y cistatina, incrementando así su actividad antimicrobiana <sup>27,30</sup>.

### **2.5.5.2 Actividad antimicrobiana.**

La peroxidasa, mediante los iones de tiocianato provenientes de la dieta más el peróxido de hidrógeno de origen bacteriano, forman el hipotiocianato, el cual es inhibidor del crecimiento y metabolismo bacteriano.

Las lisozimas rompen las uniones de carbohidratos de la pared celular de las bacterias gram positivas, provocando así un cambio osmótico capaz de producir el estallamiento celular.

La lactoferrina ejerce una actividad bacteriostática mediante la captación de iones de hierro, el cual es un nutriente esencial para las bacterias.

Las histatinas inhiben la viabilidad de *Candida albicans* y también pueden inhibir el crecimiento del *Streptococo mutans*.

La IgAs es el componente primario del sistema inmune de la mucosa oral cuya función reside en la actividad antimicrobiana mediante la unión específica hacia los microorganismos orales, previniendo de esta manera la adherencia y colonización de las superficies orales<sup>27,30,31</sup>.

#### 2.5.5.3 Capacidad amortiguadora (Buffer).

Mecanismo que contrarresta la acidez producida por los restos alimenticios al ser descompuestos por las bacterias que se depositan sobre la superficie de los dientes, lo que conduce a la desmineralización de las mismas llevando a la caries dental. El bicarbonato salival es producido en las células ductales y forma complejos con las mucinas salivales para producir una barrera que evita la penetración de las sustancias ácidas a las mucosas bucales y al esmalte de los dientes, en menor grado las histatinas pueden neutralizar los ácidos producidos durante el metabolismo bacteriano.

#### 2.5.5.4 Proceso de mineralización.

Se ha observado que el esmalte descalcificado tiene las mismas características que una lesión cariosa temprana, la cual puede ser remineralizada si la superficie del diente se limpia con regularidad y se encuentra en contacto con la saliva.

#### 2.5.5.5 Defensa:

Los anticuerpos salivales son principalmente del tipo de la IgA, cuya función principal es la de adherencia específica a las bacterias para así modular su adhesión tanto con los tejidos blandos como los duros<sup>29,30</sup>.

La función de la lisozima salival es hidrolizar la unión beta 1.4 entre el ácido N-acetilmuramínico y los remanentes 2-acetil-aminodesoxi-D-glucosa de los mucopolisacáridos y mucopolipéptidos de las paredes celulares de las bacterias gram positivas.

La alfa-amilasa ataca a los polisacáridos presentes en la pared celular de los gonococos, por lo que se consideraba como un agente inhibitorio activo de los mismos.

### III. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

Debido a la escasez de investigaciones sobre la interrelación refresco/erosión/caries y que los estudios reportados en la literatura han empleado usualmente tiempos de inmersión en refresco poco realistas <sup>2,13,32</sup>, el presente tema de investigación constituye una idea desafiante para hipotetizar qué efectos clínicos puede tener el alto consumo de refrescos en lugares donde el estándar de tratamiento dental no es accesible para la población en general <sup>33,34</sup>. Esta investigación continuará estudios previos en México, mediante los cuales se estableció que el patrón de consumo de refrescos puede ser identificado y replicado experimentalmente, con el fin de establecer intervalos de inmersión en refresco que se asemejen a la exposición real de la población, estableciendo así en forma más precisa su impacto sobre los tejidos dentales <sup>8</sup>.

## **IV. OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GENERAL.**

Cuantificar el efecto erosivo de los refrescos al esmalte humano bajo condiciones realistas de consumo para la población mexicana, asumiendo que los cambios en la microdureza de la superficie del esmalte reflejan cercanamente el grado de erosión del mismo.

### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

1. Determinar si la presencia de flujo o agitación altera de forma significativa el efecto erosivo de los refrescos.

2. Determinar si ciertos elementos protectores que se encuentran naturalmente en la cavidad bucal, tales como el pH de la saliva, es capaz de contrarrestar en alguna medida el efecto erosivo de los refrescos.

## V. HIPÓTESIS

1.- "No hay diferencia en el grado de erosión detectado en el esmalte almacenado en saliva humana clarificada y el esmalte almacenado en agua deionizada".

2.- "No hay diferencia en el grado de erosión detectada en el esmalte bajo diferentes regímenes de exposición al refresco".

3.- "No hay diferencia en el grado de erosión detectado en el esmalte cuando las inmersiones en refresco ocurren bajo presencia de flujo o en un medio estático".

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. PREPARACIÓN DE LAS LOSETAS DE ESMALTE.

Las losetas de esmalte fueron obtenidas de dientes libres de caries extraídos por razones ortodónticas (esto es, los dientes no tenían caries incipiente o avanzada). Después de la extracción, los dientes fueron limpiados de los restos y almacenados en un desinfectante de bajo nivel durante una semana.

Posteriormente, la raíz de cada diente fue incluida en acrílico autopolimizado dentro de un cubo de inclusión para hacer cortes en microtomo (Fig. 4). El espécimen fue montado en un microtomo sin la navaja, habiéndose colocado en sustitución de la misma un disco de diamante de 100  $\mu\text{m}$  de grosor (X-929-7 TP Abrasive Technology, Inc., EEUU) y un motor eléctrico. Usando agua como refrigerante, se hicieron los cortes por las superficies bucal y palatina de cada diente, obteniendo así una loseta cuadrangular de 3 por 4 por 1 mm de espesor <sup>35</sup> (Fig. 5). Cada loseta fue pulida y almacenada a temperatura ambiente en un medio de baja humedad. Para el preparado de la superficie en donde se hicieron las mediciones de microdureza (SMD), se desgastó y pulió cada loseta minuciosamente, primero con papel de carburo de silicio del N° 600 (3M EEUU) y posteriormente con partículas de hidróxido de aluminio de las medidas 0.3 a 0.05  $\mu$  <sup>36</sup>, logrando una superficie plana y sin ralladuras que interfirieran en las mediciones. Ya que el esmalte empleado en los ensayos no fue el esmalte superficial sino una capa interna del tejido, es posible descartar con seguridad el

efecto de erosión previo que pudiera haber ocurrido cuando el diente se encontraba en la boca de la persona que lo donó.

## 6.2. RECOLECCIÓN DE SALIVA Y FORMACIÓN DE PELÍCULA ADQUIRIDA.

La saliva fue obtenida de un solo donador sano y joven mediante estimulación por parafina todos los días entre las 8:00 y 9:00 AM. Posteriormente fue clarificada por centrifugación a 2000 G durante 15 minutos a temperatura ambiente (15-25°C) y se suplementó con 40 µg de gentamicina (Garamicina, Schering-Ploug, México) y 50 µg de ampicilina (Pentrexil, Bristol, México) por mililitro de saliva. Las losetas de esmalte correspondientes al grupo experimental donde se creó la película salival fueron colocadas en incubación en celdas múltiples para cultivo (Costar Corp.48 Well Cell Culture Cluster, EEUU) en saliva clarificada a 37°C durante 7 días, misma que fue cambiada diariamente por saliva fresca. Después del período de formación, los especímenes fueron lavados generosamente en buffer salino de fosfato a concentración de 0.1 M. pH 7.2 (PBS)

32,37

## 6.3. PREPARACIÓN DEL BUFFER DE FOSFATO SALINO (PBS) A 0.1M.pH 7.2

Ocho gramos de NaCl (Carlo Erba, Italia, F.W. 58.45), 0.2 g KCl (Carlo Erba, Italia, F.W. 74.55), 1.44 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O (Baker, Phillipsburg N.J. F.W. 136.091) se mezclaron con 800 mL de agua doblemente deionizada usando un

agitador magnético. El pH se ajustó a 7.2 con HCl y se añadió agua doblemente deionizada hasta aforar a 1000 mL.

#### 6.4. PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO.

Las losetas de esmalte fueron sumergidas en refresco de acuerdo a 12 diferentes grupos experimentales. Los grupos difirieron en lo siguiente; (1) las losetas fueron o no incubadas en saliva clarificada, (2) las losetas fueron sumergidas en refresco con o sin flujo proveniente de un agitador magnético; y (3) las losetas fueron sumergidas en refresco bajo uno de tres diferentes regímenes de ingesta (ingesta baja, una inmersión al día; ingesta media, cinco inmersiones al día; e ingesta alta, 10 inmersiones al día).

Las losetas se protegieron del daño que pudieran causarles los magnetos del agitador mediante unos contenedores fabricados con malla para mosquitero de nylon, empleándose las mallas tanto en los ensayos con agitación como en los ensayos sin ella (Fig. 6).

Se colocaron tres losetas para cada uno de los 12 diferentes grupos experimentales y cada uno de estos especímenes fue tratado individualmente con inmersiones de 5 minutos cada una en refresco de cola recién destapado de pH 2.6. Antes y después de las inmersiones en refresco, las losetas se lavaron en PBS. Cuando las losetas no estaban expuestas a baños de refresco, se almacenaron en agua doblemente deionizada o en saliva clarificada, según el régimen aplicable en el esquema experimental descrito con anterioridad.

## 6.5. GRUPOS CONTROL.

Con el fin de determinar si la presencia de antibióticos y/o el almacenamiento en agua doblemente deionizada o en saliva alteraban independientemente el patrón de erosión observado experimentalmente, se realizaron ensayos testigo en ocho grupos control. Los grupos difirieron en que (1) las losetas fueron almacenadas en agua doblemente deionizada con y sin antibiótico, y (2) fueron sumergidas en refresco bajo uno de tres diferentes regímenes de ingesta (una; tres; y seis inmersiones al día). Otras losetas fueron únicamente almacenadas durante ocho días en (3) agua doblemente deionizada o en saliva clarificada. Estos líquidos fueron cambiados diariamente.

## 6.6. ANÁLISIS CUANTITATIVO.

Cada loseta de esmalte se colocó en la platina de un aparato de microdureza (Shimadzu, Kyoto), y se hicieron dos indentaciones para cada espécimen espaciadas por 100  $\mu\text{m}$  con un diamante del tipo Vickers bajo 100 g de carga durante 15 segundos (Fig. 7). Posteriormente se procedió a medir la longitud de la huella en sus dos ejes (vertical y horizontal), para así sacar un promedio y posteriormente aplicar la fórmula para obtener el número de microdureza de Vickers (Vickers Microhardness Number) (DV):

$$DV = 18.544 \frac{P}{d^2}$$

en donde:

**DV** = Número de Microdureza de Vickers.

**P** = peso

**d** = longitud de la diagonal de la indentación ( $\mu\text{m}$ )

Los datos cuantitativos de la dureza de la superficie erosionada se analizaron mediante regresión lineal múltiple, ANOVA de una vía y prueba t de Student.

#### **6.7. FOTOGRAFÍAS.**

Fig. 4. (6.7.1) Fotografía de los dientes extraídos donde se muestra la inclusión de las raíces en acrílico autopolidizable dentro de un cubo de inclusión para hacer cortes al microtomo.

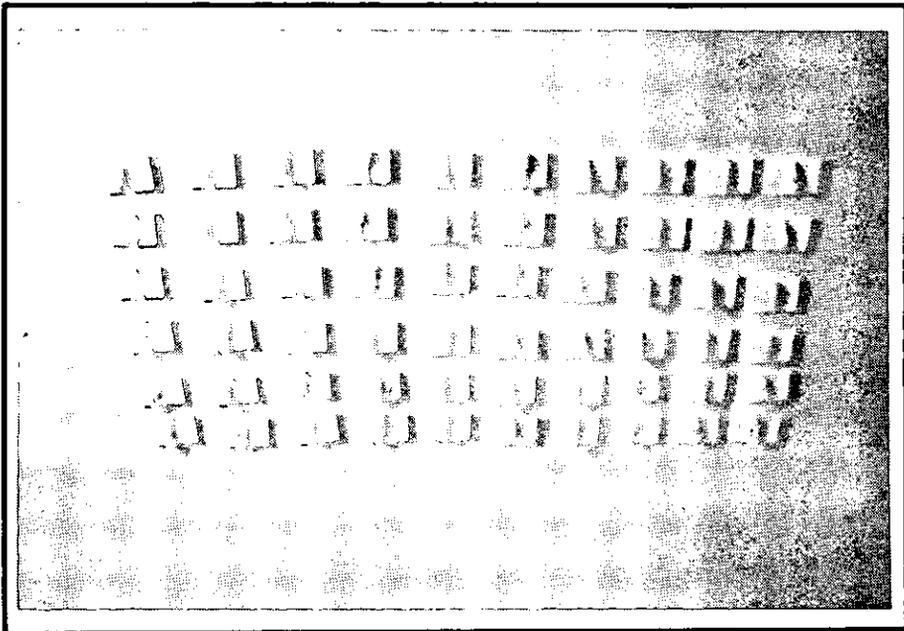


Fig.5. (6.7.2) Fotografía que muestra al aparato de corte diseñado con un microtomo y un motor eléctrico.

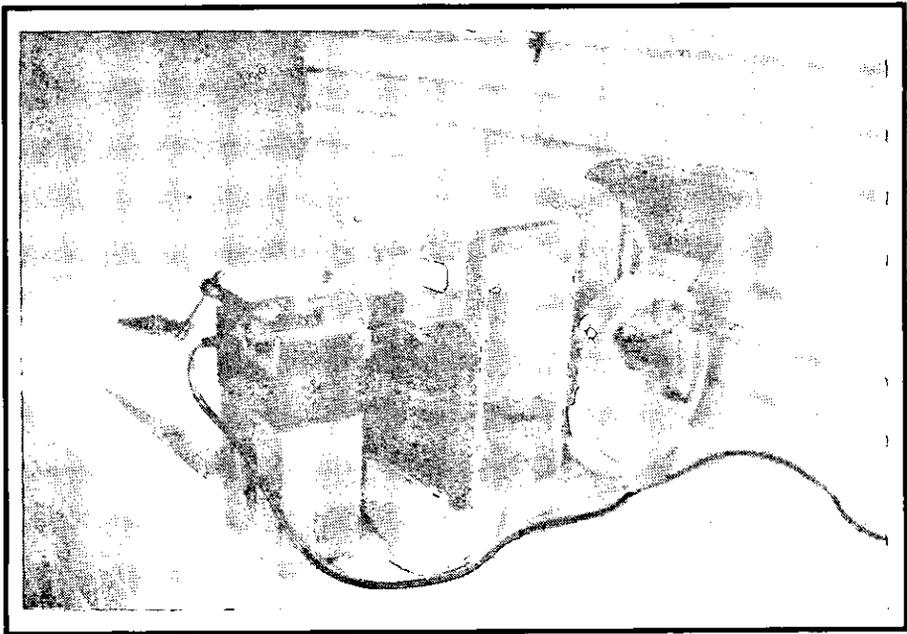
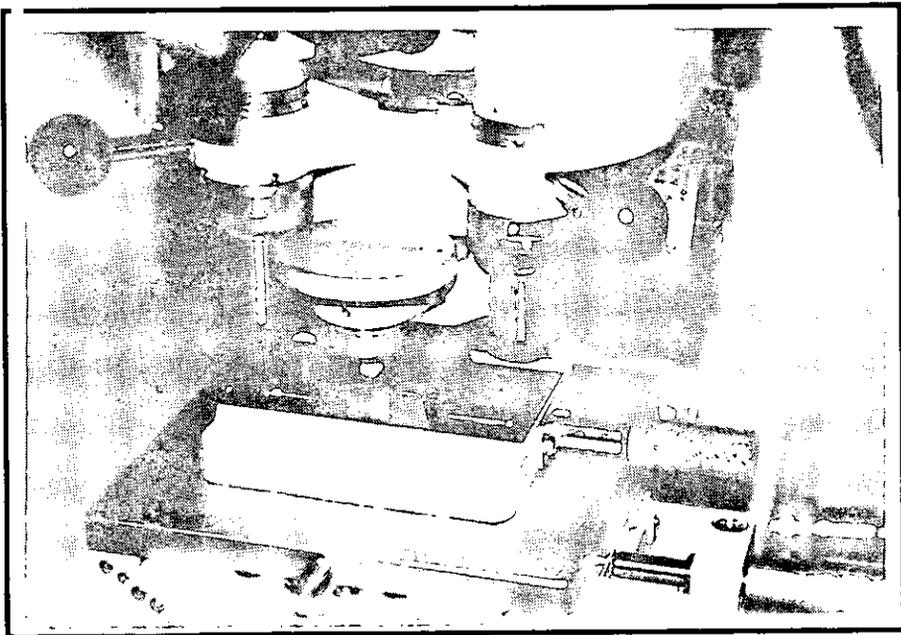


Fig. 6. (6.7.3) Fotografía que muestra los contenedores de las losetas y el agitador magnético para dar movimiento al refresco.



Fig. 7. (6.7.4) Fotografía que muestra al aparato de microdureza (Shimadzu, Kyoto).



## VII. RESULTADOS.

### 7.1. ENSAYOS DE GRUPOS CONTROL.

1.1 Grupo con y sin antibiótico: No hubo diferencias estadísticamente significativas en la microdureza del esmalte en ninguno de los tres días en los ensayos con y sin antibióticos  $p>0.50$ . Esto significa que una caída similar de la microdureza fue detectada en las losetas bajo la presencia de antibiótico tanto como sin ella (Fig.8).

1.2 Grupo con almacenamiento en agua doblemente deionizada y en saliva clarificada. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la microdureza desde el día inicial cero hasta el octavo día en ninguna de las dos losetas  $p>0.50$  (Fig. 8).

### 7.2. ENSAYOS TANTO CON COMO SIN PELÍCULA ADQUIRIDA.

Se detectó una disminución en la microdureza del esmalte bajo las condiciones experimentales realizadas, conforme iban siendo expuestas las losetas a los baños en refresco. Esta disminución es mucho más marcada en la primera inmersión en refresco que en las inmersiones subsecuentes  $p<0.001$  (Fig. 10, 11, 12 y 13). Conforme el número de baños aumentó, la microdureza descendió. Después del día 1, siempre hubo diferencias estadísticamente

significativas entre las lecturas de la microdureza de cada día y la inmediata subsecuente  $p < 0.01$  (esto es, entre los días 2 y 3; el 3 y 4; etc.).

Después del octavo día, la sensibilidad de la técnica no permitió seguir realizando lecturas de los cambios en la superficie de las losetas de esmalte, ya que las superficies estaban tan erosionadas que no era posible hacer una indentación claramente definida y que pudiera ser medida confiablemente.

No hubo ninguna diferencia estadísticamente significativa en la microdureza de las losetas de esmalte en el día cero a través de ningún grupo experimental  $p > 0.50$ . Esto indica que la dureza de todas las losetas al inicio de los ensayos era igual, para efectos del propósito experimental.

No hubo diferencias estadísticamente significativas en la microdureza del esmalte en los días 1 a 8 en los ensayos CON y SIN película adquirida  $p > 0.50$ . Esto significa que una caída similar de la microdureza fue detectada en las losetas CON formación de película adquirida y en las losetas SIN ella. Esto sugiere que la película adquirida que se formó bajo las condiciones descritas no protege particularmente al esmalte de la erosión.

### **7.3. ENSAYO SIN PELÍCULA ADQUIRIDA.**

No hubo diferencias estadísticamente significativas en la microdureza del esmalte en los días 1, 2, 3 y 4 entre el grupo con flujo (agitación) y el grupo sin flujo  $p < 0.50$ . Las diferencias estadísticamente significativas fueron encontradas del 5° al 8° día,  $p > 0.001$  en donde se encontró una microdureza menor en el grupo de losetas con flujo y el grupo sin flujo (Fig. 10).

El nivel de ingesta (bajo, medio y alto) jugó un papel de importancia secundaria en la disminución de la microdureza en este ensayo. Del día 1° al 5° no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la microdureza del esmalte entre los tres diferentes niveles de ingesta  $p > 0.50$ . Solamente del día 6° al 8° día, en el grupo de alta ingesta, se detectó una microdureza significativamente menor a la de los grupos de baja y media ingesta  $p > 0.001$ . Esta situación ocurrió tanto en el grupo con flujo como en el grupo sin él (Fig. 11).

#### 7.4. ENSAYO CON PELÍCULA ADQUIRIDA.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la microdureza entre el grupo con flujo y el grupo sin flujo en ningún día del 1° al 5°  $p > 0.50$ , solamente en el 8° día si se encontraron diferencias  $p < 0.05$  (Fig. 12)

El nivel de ingesta (bajo, medio y alto), desde el día 1° al 8°, afectó a la microdureza en forma estadísticamente significativa. El grupo de baja ingesta tuvo un valor mayor en la microdureza que los grupos de medio y alto consumo  $p > 0.05$  (Fig. 13).

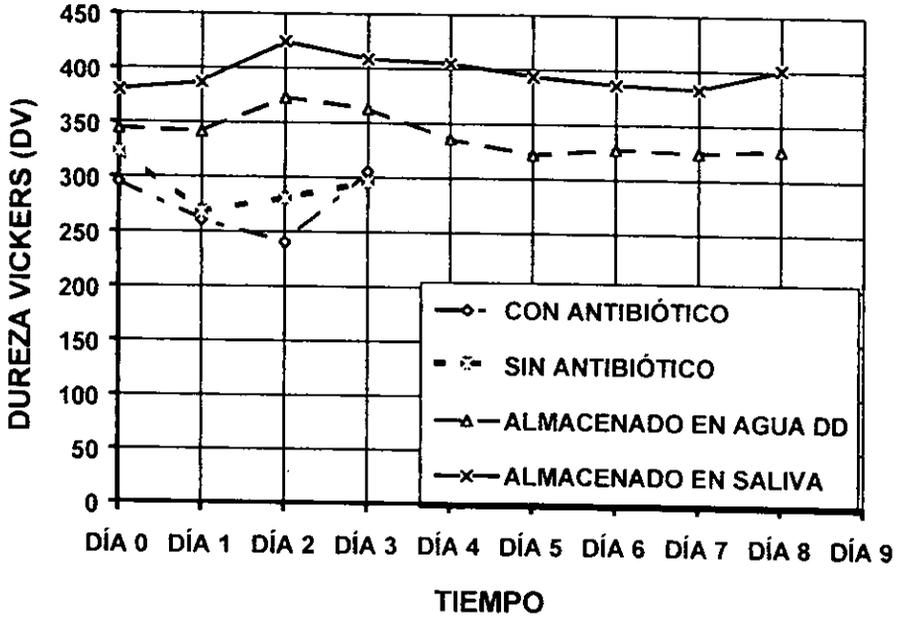
Del día 2° al 8°, las losetas en el grupo de ingesta media y alta presentaron una microdureza significativamente menor comparada con el grupo de ingesta baja  $p > 0.01$ . Esta situación ocurrió tanto en el grupo con flujo como en el grupo sin él.

#### 7.5. GRÁFICAS Y TABLAS DE RESULTADOS.

Fig. 8 (7.5.1):

Comparación de grupos control:

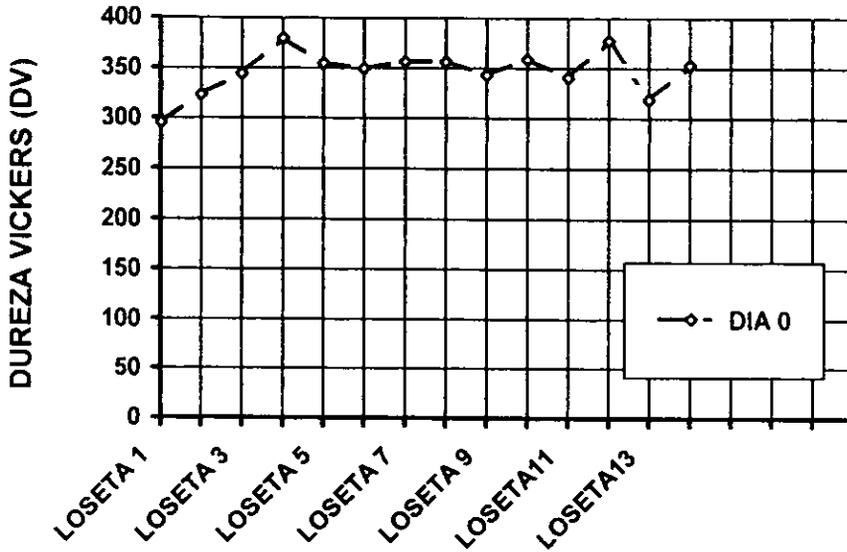
- a) Grupos con y sin antibiótico.
- b) Grupos almacenados en H<sub>2</sub>O DD y en saliva.



	CON ANTIBIÓTICO	SIN ANTIBIÓTICO	ALMACENADO EN DD H <sub>2</sub> O	ALMACENADO EN SALIVA
DÍA 0	295.6	323.4	344.5	379.7
DÍA 1	260.7	268.4	341.6	386.6
DÍA 2	240.3	280.9	372.9	424.5
DÍA 3	305.3	295.9	363.1	408.7
DÍA 4			335.8	404.9
DÍA 5			321.9	393.8
DÍA 6			327.4	386.6
DÍA 7			324.6	383.1
DÍA 8			327.4	401.2

**Fig. 9 (7.5.2):**

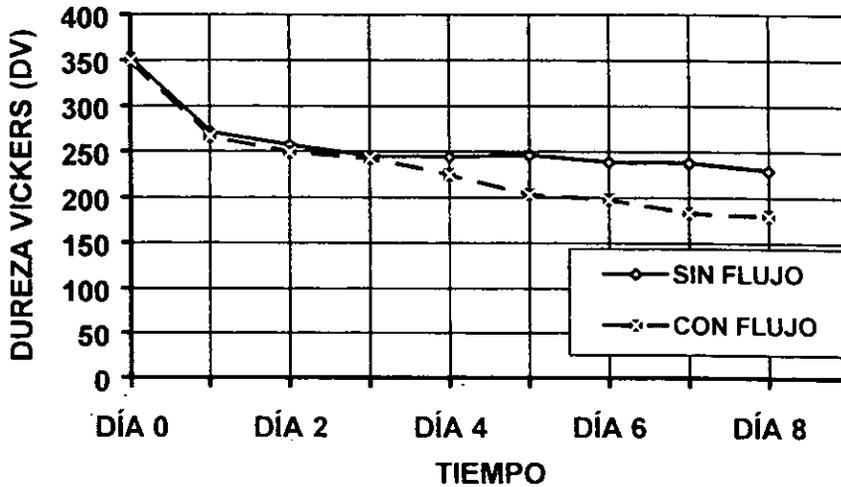
**Microdureza de las losetas de esmalte en el día cero de todos los grupos experimentales.**



LOSETA	MICRODUREZA DIA 0
LOSETA 1	295.6
LOSETA 2	323.4
LOSETA 3	344.5
LOSETA 4	379.7
LOSETA 5	354.8
LOSETA 6	349.5
LOSETA 7	356.7
LOSETA 8	356.6
LOSETA 9	343.1
LOSETA 10	359.2
LOSETA 11	341.0
LOSETA 12	377.7
LOSETA 13	319.2
LOSETA 14	353.3

Fig. 10 (7.5.3):

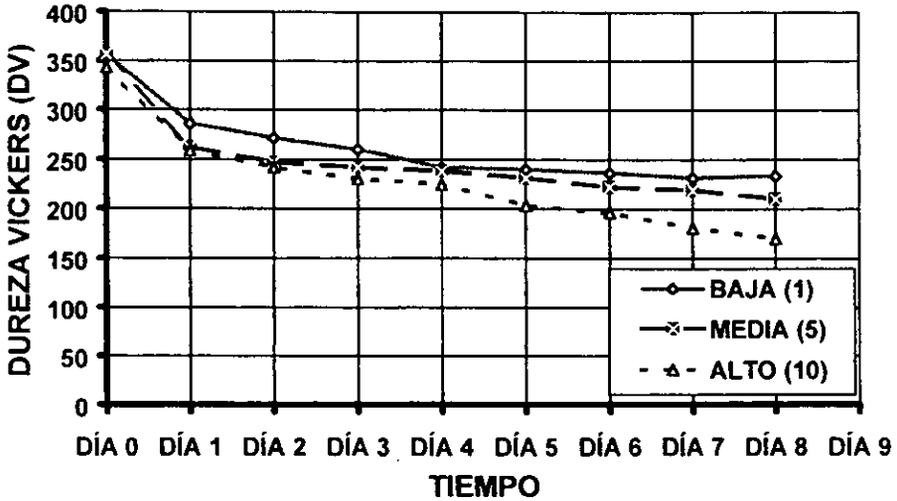
Comparación de grupos con y sin flujo  
(Análisis SIN película adquirida).



	SIN FLUJO	DE	CON FLUJO	DE	TOTAL	DE
DÍA 0	354.8	18.8	349.5	43.0	352.1	30.9
DÍA 1	271.9	33.1	266.7	49.0	269.3	41.0
DÍA 2	257.4	31.1	249.3	39.3	253.3	35.2
DÍA 3	245.2	38.2	242.8	35.8	244.0	37.0
DÍA 4	244.5	34.6	224.9	33.9	234.7	34.2
DÍA 5	246.4	20.1	203.1	42.8	224.7	31.4
DÍA 6	238.9	19.2	197.3	42.2	218.1	30.7
DÍA 7	237.8	19.1	182.8	49.2	210.3	34.1
DÍA 8	229.7	22.4	179.3	49.5	204.5	35.9

Fig. 11 (7.5.4):

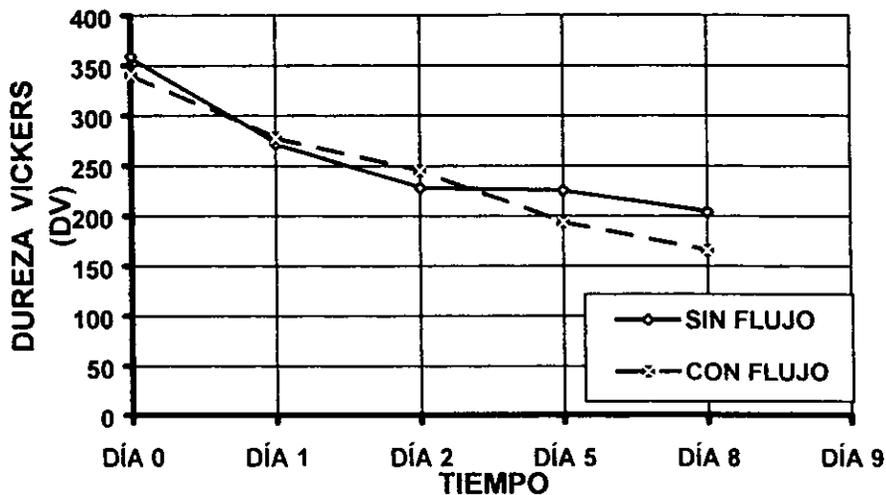
Comparación de regímenes de ingesta bajo,  
medio y alto  
(Análisis SIN película adquirida)



	BAJA	DE	MEDIA	DE	ALTA	DE	TOTAL	DE
DÍA 0	356.7	32.1	356.6	24.3	343.1	41.4	352.1	32.5
DÍA 1	286.3	22.9	262.3	38.1	259.2	55.2	269.3	41.0
DÍA 2	271.7	31.2	246.8	29.6	241.5	39.5	253.3	34.9
DÍA 3	260.2	17.2	241.8	41.1	230.2	42.4	244.0	36.2
DÍA 4	241.8	25.9	237.8	44.4	224.5	34.5	234.7	35.0
DÍA 5	239.7	22.7	231.0	42.0	203.5	46.1	224.8	39.3
DÍA 6	236.3	20.6	221.9	39.2	196.3	45.2	218.1	38.3
DÍA 7	231.3	22.8	219.2	35.9	180.5	60.6	210.3	45.9
DÍA 8	233.2	25.0	210.3	38.2	169.8	49.5	204.5	45.4

Fig. 12 (7.5.5):

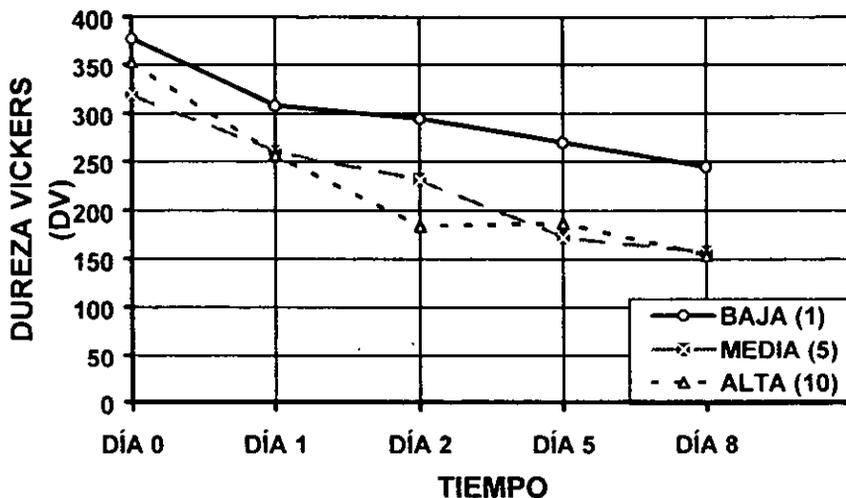
Comparación de los grupos con y sin flujo  
(Análisis CON película adquirida).



	SIN FLUJO	DE	CON FLUJO	DE	TOTAL	DE
DÍA 0	359.2	81.6	341.0	67.1	350.1	74.3
DÍA 1	272.4	42.4	277.9	33.4	275.2	37.9
DÍA 2	227.9	32.1	245.2	70.2	236.5	51.2
DÍA 5	225.3	32.4	193.9	84.6	209.6	58.5
DÍA 8	204.3	22.4	165.6	88.6	371.9	55.5

**Fig. 13 (7.5.6):**

**Comparación de regímenes de ingesta bajo,  
medio y alto  
(Análisis CON película adquirida).**



	BAJA	DE	MEDIA	DE	ALTA	DE	TOTAL	DE
DÍA 0	377.7	112.0	319.2	52.8	353.3	26.9	350.1	73.0
DÍA 1	308.1	33.3	260.4	24.4	257.0	32.0	275.2	37.1
DÍA 2	294.5	43.0	231.4	15.1	183.6	17.2	236.5	53.7
DÍA 5	269.8	39.5	172.1	33.0	186.9	68.7	209.6	64.2
DÍA 8	244.4	48.6	156.8	47.3	153.6	61.0	184.9	65.7

## VIII. DISCUSIÓN.

Los cambios ocurridos en la dureza se pueden atribuir a varios factores. Primero, los cambios sobre todo en la porosidad de las superficies de las losetas pudieron haber ocurrido principalmente por una concentración local de elementos que podrían resultar en la caída de la microdureza observada. Por otro lado, una disminución preferencial y/o una degradación en la muestra podría haber tenido el mismo efecto. Debido a que los estudios cuantitativos sobre erosión del esmalte son escasos<sup>38</sup>, es difícil discutir los resultados bajo condiciones experimentales similares a las nuestras. Sin embargo, en otros diseños experimentales<sup>39</sup>, se ha encontrado que el tiempo de inmersión en bebidas ácidas provoca una disminución en la microdureza proporcional al tiempo de exposición. No es de sorprender que la exposición de bebidas ácidas deteriore la integridad del esmalte. Es, sin embargo, sorprendente la rapidez con que esto empieza a ser evidente. El mayor cambio erosivo en los ensayos ocurrió después de la primera inmersión tanto CON como SIN película adquirida. Desafortunadamente, en los ensayos SIN película adquirida el efecto del nivel de ingesta sobre la dureza del esmalte sólo pudo ser detectada antes de que la sensibilidad de la técnica ya no pudiera identificar diferencias (esto es, hasta el día 8). Sin embargo, a partir de los datos disponibles, es difícil tratar de explicar porqué no hubo diferencias en microdureza en los ensayos CON película adquirida y los ensayos SIN ella. Esta parte de la investigación debe ser estudiada en el futuro.

A través de realizar análisis de regresión lineal múltiple con los datos que se obtuvieron de las pruebas de microdureza, se identificó un patrón de conducta (dureza en relación a tiempo) que puede ser explicado por la siguiente fórmula:

$$\sigma = \text{Dureza} = a + (b) (\ln(\text{tiempo}))$$

En términos de tiempo:

$$\text{Tiempo} = e^{(\sigma - a)/b}$$

Este intervalo de tiempo representa físicamente un tiempo de activación o tiempo crítico en un fenómeno tipo Arrhenius (esto es, aquel proceso que solamente puede presentarse cuando se alcanza un umbral físico).

Valores diferentes para *a* y *b* tienen buena correlación al emplearse en la fórmula antes mencionada, permitiendo ajustes bajo varias condiciones experimentales para establecer un patrón de conducta. En una dimensión más general, estos comportamientos permiten realizar predicciones acerca de qué valores de microdureza podrán ser obtenidos (bajo las condiciones experimentales descritas) después de ciertos tiempos de inmersión. Esto, por supuesto, es sólo una manera tentativa de aventurar predicciones acerca de cuál será la dureza después de intervalos mayores de inmersión que los que el diseño experimental permitió para esta investigación. En particular, es interesante señalar que prácticamente no hubo diferencias entre las lecturas obtenidas de los ensayos de baja y de mediana ingestas, sugiriendo así que una caída similar en la microdureza puede obtenerse de una inmersión al día en refresco o de cinco inmersiones.

La saliva provee de cierta protección al diente contra la caries<sup>40</sup>. Reportes previos de estudios *in vitro* indicaron que parte de este mecanismo protector es

mediado por la formación de una película adquirida en la superficie dental <sup>32,37,38</sup> y que estas películas adquiridas difieren en su composición proteica debido al tiempo de incubación y el origen de la saliva empleada para desarrollar la película adquirida <sup>28,30,41,42</sup>. Estudios tanto *in vivo* como *in vitro* demostraron que la película se forma mediante una adsorción selectiva de muchas proteínas salivales y glicoproteínas al diente durante un proceso complejo que incorpora lípidos y carbohidratos en la maduración de la película <sup>28,30,43,44</sup>.

Aún no está bien establecido qué componente específico, o combinación de componentes, participa en modificar las capacidades protectoras para la superficie del diente. La protección otorgada por la película puede ser resultado de muchos factores, incluyendo una adsorción de proteínas secundarias, un reacomodo de las regiones lipofílicas de las moléculas proteicas, desarrollo de algunas estructuras secundarias o terciarias específicas, adsorción de otras moléculas, o el efecto directo del calcio y fosfato de la saliva sobre el esmalte <sup>28,30,38,45</sup>.

En esta investigación, se encontró que el tipo particular de película adquirida usado resaltó algunas de las diferencias esperadas entre los tres niveles de ingesta (baja, media y alta), pero, al mismo tiempo, no se pudieron encontrar diferencias entre ellas cuando no se empleó película adquirida. Lassi *et al.* (1993) <sup>39</sup> encontró un ablandamiento diferente de la superficie después de emplear dos bebidas ácidas aparentemente similares (pH 3.9 y 3.8), mostrando que el efecto de los tipos de ácido, de las diferentes cantidades de ácidos libres y asociados, y de las diferentes condiciones ambientales pueden jugar un papel importante en la constante de disolución mineral. Featherstone *et al.* (1993) <sup>38</sup> estudió los componentes de la saliva por separado, intentando establecer con

mayor precisión el papel de cada combinación de componentes, encontrando que no hay una proteína específica o un grupo de proteínas que por sí mismas puedan explicar los resultados observados en ensayos con saliva total y con saliva dializada. De acuerdo a estos reportes científicos y a nuestros resultados, tal parece que el próximo paso para superar algunos de los problemas de interpretación derivados de esta investigación podría ser aumentar la variedad de ambientes salivales en los ensayos, y comparar sus efectos en las pruebas de microdureza del esmalte.

## IX. CONCLUSIONES.

- 1.- El tiempo de inmersión en bebidas ácidas provoca una disminución en la microdureza proporcional al tiempo de exposición.
- 2.- La exposición a bebidas ácidas deteriora la integridad del esmalte desde el primer día de exposición, siendo más marcada al inicio de la exposición.
- 3.- Se identificó un patrón de erosión sobre tiempo, en donde el intervalo de tiempo representa un tiempo de activación o tiempo crítico en un fenómeno tipo Arrhenius.
- 4.- Prácticamente no hubo diferencias entre las lecturas obtenidas de los ensayos de baja y mediana ingesta, sugiriendo así que una caída similar en la microdureza puede obtenerse de una inmersión al día en refresco o de cinco inmersiones.
- 5.- El tipo particular de película adquirida usado resaltó algunas de las diferencias esperadas entre los tres niveles de ingesta (bajo, medio y alto), pero, al mismo tiempo, no se pudieron encontrar diferencias entre los niveles cuando no se empleó película adquirida.

**X. BIBLIOGRAFÍA**

- 1.- ECCLES JO. Tooth surface loss from abrasion, attrition and erosion. *Dent Update* 1982;7:373-81.
- 2.- PINDBORG JJ. Pathology of the Dental Hard Tissues. *Munksgaard, Copenhagen*, 1970.
- 3.- MEURMAN JH, HARKONEN M, NAVERI H, KOSKINEN J, TORKKO H, RYTOMAA Y, JARVINEN V & TURUNEN R. Experimental sports drinks with minimal dental erosion effect. *Scand J. Dent Res* 1990;98:120-8.
- 4.- SORVARI R & KIVIRANTA Y. A semiquantitative method of recording experimental tooth erosion and estimating occlusal wear in the rat. *Arch Oral Biol* 1988;33:17-20.
- 5.- RESTARSKI JS, GORTNER JR & Mc CAY CM. A method for measuring the effects of acid beverages on the teeth of small laboratory animals. *Science* 1945;102:404-5.
- 6.- GAO XJ, ELLIOTT JC & ANDERSON P. Scanning and contact microradiographic study of the effect of degree of saturation on the rate of enamel demineralization. *J Dent Res* 1991;70(10):1332-37.
- 7.- MEURMAN JH & FRANK RM. Progression and surface ultrastructure of *in vitro* caused erosive lesions in human and bovine enamel. *Caries Res* 1991;25:81-7.
- 8.- MAUPOMÉ-CARVANTES G, SÁNCHEZ -REYES V, LAGUNA-ORTEGA S, ANDRADE-DELGADO LC & DIEZ DE BONILLA-CALDERIÓN J. Patrón de

consumo de refrescos en una población mexicana. *Salud Pública de México* 1995;37:323-328.

9.- **JUAN VEGA LOMELI.** Los grandes de la industria refresquera. *Escala, Impresiones aereas, S.A. De C.V.* Diciembre 1994;65:138-148.

10.- **SIN AUTOR.** En manos de la pepsi más del 20% de la producción. "*La jornada*".1991;agosto 31:sección B,28.

11.- **SIN AUTOR.** Siglas y Guarismos. "*El Heraldó de México*" .1995; marzo 7: sección 3F Economía y Finanzas.

12.- **BARÓN FL.** La dinámica industria refresquera mexicana. *Caminos del Aire/Aeroméxico, México, D.F.* Edit. Internacional de revistas, S.A. de C.V.,1993:46-53.

13.- **MISTRY M & GREBY TH.** Erosion by soft drinks of rat molar teeth assessed by digital image analysis. *Caries Res.* 1991;25:81-7.

14.- **GEDALIA Y, IONAT-BENDAT D, BEN-MOSHEN S & SHAPIRA L.** Tooth enamel softening with a cola type drink and rehardening with hard cheese or stimulated saliva *in situ*. *J Oral Rehabil* 1991;18:501-6.

15.- **XHONGA FA & VALDMANIS S.** Geografic comparison of the incidence of dental erosion: a two-centre study. *J Oral Rehabil* 1983;10:269-7.

16.- **XHONGA-OJA FA & VALDMANIS S.** Factor analysis of dental erosion occurrence. *J Oral Rehabil* 1986;13:27-56.

17.-**MEURMAN JH.** *Tanderosion. Naringsforskning* 1987;31:146-9.

18.- **BURT BA.** The future of the caries decline. *J Publ Health dentistry* 1985;45:261-9.

- 19.-GRENBY TH. Dental and nutrition properties of snack foods and soft drinks. *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift* 1987;42:S104-6.
- 20.-GRENBY TH. The nutritive properties and dental decay potencial of snack foods. *Frontiers Gastrointestinal Res* 1988;14:71-8.
- 21.- MAUPOMÉ-CARVANTES G. El consumo de azúcares cariogénicos y la caries dental. *Pract. Odontol.* 1991;12(12):43-52.
- 22.- CALDERÓN JS. El azúcar refinada causa muchos y graves daños a la salud. "Excelsior" 1986, octubre 20; sec A :7.
- 23.- ORBAN, BHASKAR S.N. Histología y embriología bucal: Esmalte 9 ed. El ateneo:1986:49-77.
- 24.- TEN CATE AR. Histología Oral, desarrollo, estructura y función: Estructura del esmalte. 2 ed. Panamericana: 1986:252-273.
- 25.- IVAR A MJÖR & OLE FEJERSKOV. Embriología e Histología Oral Humana: Esmalte dentario: Salvat Editores: 1989:43-82.
- 26.- GONZÁLEZ M, LEDESMA C & BANDERAS JA. Saliva y cavidad bucal: parte Y Glándulas salivares: mecanismos fisiológicos de la secreción salival. *Práctica odontológica*, Junio 1994;15(6):7-15.
- 27.- STEVEN D, BRADWAY, MICHAEL J. LEVINE. Encyclopedia of Human Biology: Salivary Glands and Saliva, 1991;6:689-700.
- 28.- EDGAR-W.M. Saliva and Dental Health. *Br. Dent J*, August 1990; 169(3/4):96-98.
- 29.- EDGAR-W.M. Saliva: its secretion, composition and fuctions *Br. Dent J*, April 1992; 172(8):305-312.

- 30.- BANDERAS JA & GONZÁLEZ M. Saliva y cavidad bucal: parte II Proteínas salivales: funciones biológicas en el mantenimiento de la homeostasis bucal. *Práctica odontológica*, Julio 1994;15(7):13-20.
- 31.- ROBERT J, BOACKLE RICHARD P, SUDDICK. The host. *Salivary Proteins and Oral Health*, 1993:113-131.
- 32.- MEURMAN JH & FRANK RM. Scanning electron microscopic study of the effect of salivary pellicle on enamel erosion. *Caries Res* 1991;25:1-6.
- 33.- GRENBY TH, PHILLIPS A, DESAI T & MISTRY M. Laboratory studies of the dental properties of soft drinks. *Br j Nutrition* 1989;62:451-64.
- 34.- MAUPOME-CARVANTES G. Estrategias para reformar los sistemas de atención para la salud oral. *Práctica Odontológica* 1990;11(5):17-26.
- 35.- XIMÉMEZ-FYVIE LA, CARTER-BARTLETT PM, XIMÉMEZ-GARCÍA CT & COLLADO-WEBBER JF. Evaluation of an experimental method for measuring root canal microleakage. *J Dent Res* 1994;73:371 (Abstract 2157).
- 36.- ZERO DT, FU J, ANNE KM, CASSATA S, McCORMACK SM. & GWINNER LM. An improved Intra-oral enamel demineralization test model for the study of dental caries. *J Dent Res* 1992;71:871-78.
- 37.- ZAHRADNIK RT, PROPAS D & MORENO EC. *In vitro* enamel demineralization by the *Streptococcus mutans* in presence of salivary pellicles. *J Dent Res* 1977;56:1107-1110.
- 38.- FEATHERSTONE JDB, BEHRMAN JN & BELL JE. Effect of whole saliva components on enamel demineralization *in vitro*. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993;4(3/4):357-62.

- 39.- LASSI A, JÄGGI & SCHÄRER S. The influence of different factors on *in vitro* enamel erosion. *Caries Res* 1993;27:387-93.
- 40.- MANDEIL ID. Dental caries. *Am Sci* 1979;67:680-88.
- 41.- FISHER SJ, PRAKOPHOL A, KAJISA L & MURRAY PA. External radiolabelling of components of pellicle on human enamel and cementum. *Arch Oral Biol* 1987;32:509-519.
- 42.- SLOMIAMY BL, MURTY VLM, ZDEBSKA E, SLOMIAMY A, GWOZDZINSKI K & MANDEL IE. Tooth surface pellicle lipids and their role in the protection of dental enamel against lactic acid diffusion in man. *Arch Oral Biol* 1986;31:187-191.
- 43.- HAY DI & MORENO EC. Differential adsorption and chemical affinities of proteins for apatitic surfaces. *J Dent Res* 1979;58:930-40.
- 44.- JENSEN JL, LAMKIN MS & OPPENHEIM FG. Adsorption of human salivary proteins to hydroxyapatite: A comparison between whole saliva and glandular salivary secretions. *J Dent Res* 1992;71:1569-76.
- 45.- KAUTSKY MB & FEATHERSTONE JDB. Effect of salivary components on dissolution rates of carbonated apatites. *Caries Res* 1993;27:373-77.