

01461 / 2g.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

E

INSTITUTO DE FÍSICA

ESMALTE DENTAL EN NIÑO, ADOLESCENTE Y
ADULTO: CARACTERIZACIÓN POR TÉCNICAS DE
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

TESIS

QUE PRESENTA LA L. EN O.
AMÉRICA DE LOURDES AYUSO ARCE

PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRÍA EN ODONTOLOGÍA

DR. JOSÉ REYES GASGA
TUTOR

1999



Universidad Nacional
Autónoma de México



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).

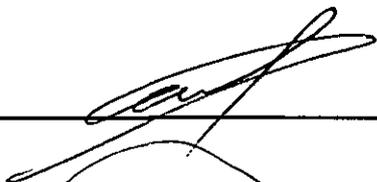
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

**ESMALTE DENTAL EN NIÑO, ADOLESCENTE Y ADULTO: CARACTERIZACIÓN
POR TÉCNICAS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA**

APROBADO POR:

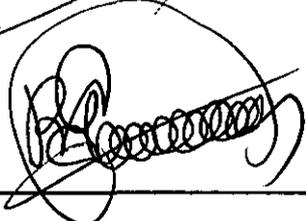
Dr. Manuel Saavedra García

Asesor



Dr. Ramiro García García

Asesor



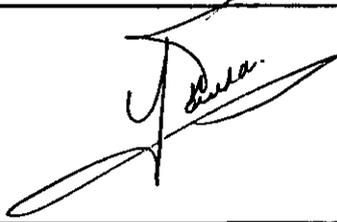
Dra. Margarita García Garduño

Asesor



M.O. Laura Vargas Ulloa

Asesor



Dr. José Reyes Gasga

Director



RECONOCIMIENTOS

Al Centro Interdisciplinario en Ciencias de la Salud, IPN, y a la Facultad de Odontología, centros de mi formación profesional. Mi gratitud y admiración para el tutor de esta tesis Dr. en Fis. José Reyes Gasga, por su labor ejemplar como científico de mente clara y sagaz, gracias José por tu amistad, apoyo y tolerancia.

Al laboratorio del IFUNAM de Materia Condensada al Físico Roberto Hernández Reyes por su eterna disposición para compartir su conocimiento, al Tec. Pedro Mexía Hernández por su mano firme en el camino de la precisión técnica, al Tec. Carlos Flores Morales por su paciencia y disciplina.

Gracias a todos aquellos que me apoyaron con su atención, conocimiento y compañerismo.

Lab. IFUNAM.

Roberto Hernández Reyes, Pedro Mexía Hernández, Carlos Flores Morales, Luis Rendón Vazquez, Edilberto Hernández, Alicia Arizmendi, Jacqueline Cañetas, Alfredo Sánchez, Samuel Tehuacanero Nuñez, Cristina Zorrilla Congas, Alfredo Madrigal Colín, Ana María González Trejo, Gilberto Mondragón Galicia, Dr. Dwigth Acosta Najarro. Proyecto DGAPAUNAM IN-106295

Lab. UMSNH – Inst. Inv. Mat.

M. en C. Ma Eugenia Contreras, M. en C. Sandra Bibriesca V., Ing. Francisco Solorio.

INDICE

Presentación	1
Capítulo I	
Introducción	3
I.I Composición química	8
Material Inorgánico	8
Material Orgánico.....	15
I.11 Estructura.....	16
I.III Propiedades.....	21
I.IV. Antecedentes del presente trabajo	25
I.V. Objetivos del presente trabajo	26
I.VI. Hipótesis de trabajo	28
I.VII. Variables de estudio	28
I.VIII. Justificación del presente trabajo.....	28
Capítulo II	
Microscopio electrónico	30
II. Interacción haz muestra	31
II.II. Microscopio electrónico de transmisión.....	33
II.III. Difracción de electrones.....	36

Indexación de patrones	41
II.IV. Microscopio electrónico de barrido	44
II.V. Rayos X característicos	46
Microanálisis	48

Capítulo III

Desarrollo experimental	50
III.I Obtención de las muestras a estudiar	50
III.II Muestras para microscopía electrónica de barrido	50
III.III. Muestra para microscopía electrónica de transmisión.....	51

Capítulo IV

Resultados	53
IV.I. Microscopía electrónica de barrido (MEB)	53
IV.II. Microscopía electrónica de transmisión (MET)	55
IV.III. Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución.....	57
IV.IV. Difracción electrónica	61
IV.V. Línea oscura	64
IV.IV. Microscopía electrónica en esmalte en sección longitudinal.....	67

Capítulo V

Discusión	86
V.I. El esmalte dental humano de niño, adulto y anciano	86
V.II. El contraste del esmalte dental humano en sección longitudinal.....	87
V.II. La línea oscura	88
V.IV. La aportación del presente trabajo	89
CONCLUSIONES Y PROPUESTAS DE INVESTIGACION	91
BIBLIOGRAFIA.....	93

RESUMEN

El estudio de los prismas del esmalte dental y los pequeños cristales que lo forman fue hecho por Microscopía de transmisión y de barrido. Se estudió la estructura del esmalte en tres grupos diferentes: niños, adultos y ancianos. Se observaron diferencias tales como: el arreglo cristalino en el esmalte de niños es más ordenado que el de los ancianos. Fue interesante observar la presencia de la línea oscura en los tres grupos de edad. Esta se observó en todas las muestras y se concluyó que es un plano más bien que una línea.

Palabras clave: Esmalte dental, hidroxiapatita, y línea oscura

ABSTRACT

The study of the enamel prisms and the small crystals which form them was done by transmission and scanning electron microscopy. The enamel structure from three stages of life was studied: childhood, adulthood, and oldage. Some differences were observed among them: the crystalline arrangement in child enamel is highly ordered but in the oldage enamel it is not. Special interest was given to the presence of the dark line in the enamel crystals of these stages. It was observed in all the samples and concluded that it is a plane instead that a line.

Key words: Tooth enamel, hidroxyapatite, dark line defect.

PRESENTACIÓN

Durante el desarrollo de un individuo, todos sus tejidos sufren cambios y el esmalte dental no es la excepción, presentando así diferentes características en la infancia, juventud y vejez. La experiencia clínica nos enseña cuales son estos cambios, pero en realidad no contamos con información científica precisa que pueda aclarar el porque y como suceden dichas modificaciones, por ejemplo: en las concentraciones de los elementos que conforman al esmalte, o a que se deben las variaciones en las propiedades físicas tales como su dureza, color y estructura cristalina. Cuando optamos por algún tipo de tratamiento, este se implanta de manera indiscriminada a cualquier órgano dentario, sea cual sea el grupo de edad al que pertenezca, sin considerar la dirección de las presiones resistidas en relación con la cristalografía de la hidroxiapatita. Si en realidad existen cambios en el esmalte, deberíamos de tenerlos presentes para realizar este tipo de acciones y, además, desarrollar medicamentos con mayores grados de biocompatibilidad y así nuestros tratamientos puedan tener un mayor éxito. En este trabajo de tesis presentamos el estudio estructural y químico del esmalte dental humano en las etapas de la vida antes mencionadas con el objetivo de mostrar sus diferencias. De esta manera presentamos la "evolución" de la estructura y composición química del esmalte con respecto a la edad de éste. Así podemos mencionar que tomaremos como variables dependientes a la composición y la estructura del esmalte y como variable independiente

al tiempo. La presentación de la tesis ha sido dividida en cinco capítulos en donde se muestran en forma secuencial las últimas investigaciones realizadas en el campo del esmalte (capítulo I); las técnicas que utilizamos en la parte experimental para la elaboración de este trabajo, como son: la microscopía electrónica de barrido, (MEB) la microscopía electrónica de transmisión (MET), el análisis químico por rayos X característicos y las técnicas de difracción electrónica y de rayos X (capítulo II); el desarrollo experimental seguido para la preparación y análisis de las muestras del esmalte que fueron estudiadas (capítulo III); la presentación de los resultados (capítulo IV); y su análisis y discusión (capítulo V). Al final se enumeran las conclusiones alcanzadas.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

En esta tesis se analiza el esmalte dental, desde el punto de vista “evolutivo”, ya que se estudió el esmalte presente en la dentadura de niños, adultos y ancianos. De esta manera, se identificarán los cambios estructurales que se presentan durante el desarrollo de la vida del ser humano. Para ésto, se utilizaron técnicas de microscopía electrónica en sus diferentes variaciones, tales como la microscopía electrónica de barrido, microscopía electrónica de transmisión, en su modalidad de alta resolución, y análisis químico de rayos X.

El esmalte es un tejido duro, altamente mineralizado, que cubre la corona anatómica del diente. Es un tejido acelular, lo que significa que una vez formado no presenta ninguna actividad biológica; esto quiere decir, que los ameloblastos (células precursoras del esmalte) desaparecen después de la formación del mismo; este tejido es incapaz de repararse. Al madurar, pierde tanto material orgánico como agua por lo que resulta un producto que esta compuesto en un 96% de su peso por material inorgánico, 3% de agua y un 1% de material orgánico. Por lo tanto el esmalte es extremadamente duro pero frágil. ¹ (figura. I.1)

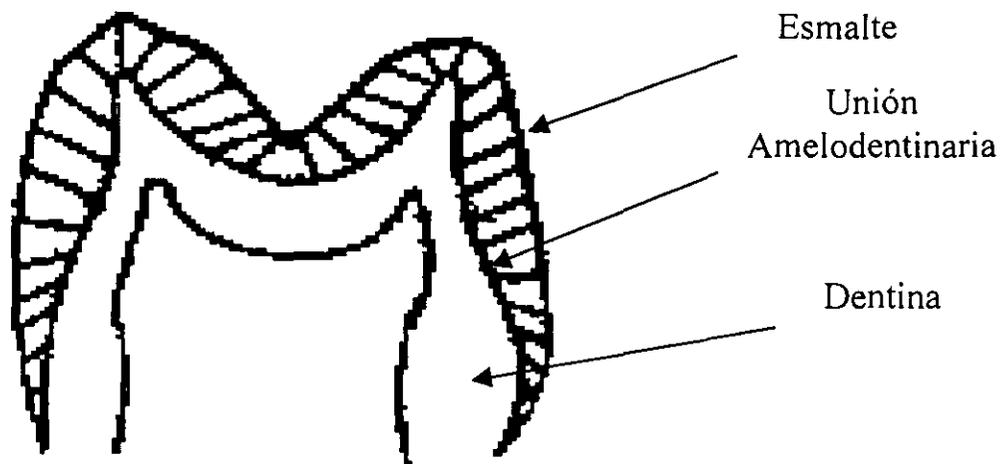


Fig.I.1 Orientación general de los prismas del esmalte.

Cristalográficamente está compuesto por cristales individuales de hidroxiapatita; éstos están más largos y más orientados que en otros tejidos mineralizados (dentina, hueso y cartilago). El esmalte dental esta formado de una matriz mediada por una biomineralización. Los cristales del esmalte se precipitan a partir de una solución supersaturada dentro de un compartimento biológico bien delimitado (ameloblasto) y están compuestos de hidroxiapatita cálcica carbonada (HAC) no estequiométrica. Los primeros cristales aparecen suavemente en la unión amelodentinaria (UAD) y crecen rápidamente en forma de cintas. La forma y el patrón de crecimiento de estos

cristales puede ser interpretada como la evidencia de una fase precursora de fosfato octacálcico (POC)². La celda unitaria del POC presenta en su plano (100) una superficie que puede actuar como una plantilla para la precipitación de la hidroxiapatita. Durante este proceso, una celda unitaria de fosfato octacálcico se convierte en dos celdas unitarias de hidroxiapatita.

Amizuka y col. estudiaron los penachos del esmalte después de descalcificar la matriz de éste, examinando sus características histoquímicas y estructurales finas. Encontraron que bajo el microscopio de barrido los penachos del esmalte aparecían como estructuras corrugadas en forma de cinta ubicadas en la dentina paralelas al eje transversal del diente. La observación en el microscopio electrónico de transmisión (MET), mostró los penachos del esmalte como paquetes de estructuras tubulares bien extendidas con estriaciones transversales atribuibles a las bandas del esmalte hipocalcificado. Se observaron estructuras en forma de lámina ubicadas en el centro de los penachos, de donde corrían paralelos al mismo. Las láminas de los penachos revelaron su origen en la capa superficial de la dentina, penetrando en la zona hipercalcificada adyacente a la UAD, para alcanzar la región del penacho.³

Arends y col., realizaron un estudio para analizar el diámetro promedio de los cristales de esmalte maduro, en esmalte de dientes deciduos, y en esmalte fluorado, así como en esmalte bovino. Esta investigación se llevó a cabo sobre superficies fracturadas, analizándolas con un

microscopio electrónico de barrido (MEB). Encontraron así que el diámetro promedio para los cristales del esmalte de dientes sanos, deciduos y fluorados era 36nm, 46nm, 81nm, respectivamente. Los valores del esmalte sano y remineralizado in vitro y esmalte bovino remineralizado in vivo fue de 57nm, 97nm; y 63nm respectivamente. Los resultados obtenidos por medio de MET y MEB, dan resultados muy semejantes. La diferencia entre el esmalte bovino remineralizado in vivo e in vitro pueden deberse a las diferencias en la velocidad de remineralización y/o a la presencia de saliva. ⁴

Durante la amelogénesis, el análisis de difracción de rayos X sólo revela la presencia de HAC, a su vez la MET convencional muestra que los cristales de esmalte en desarrollo presentan una forma de cinta. Los cambios descritos en su composición pueden ser un indicador de la presencia de minerales diferentes de la HAC. Cuisinier y col., demostraron la existencia de dos familias involucradas en las etapas tempranas de la biomineralización: a) la fase precursora en donde aparecen partículas nanométricas; y b) cristales en forma de cinta, con una estructura muy relacionada con la HAC, la cual por un proceso de engrosamiento progresivo tiende a proporcionar la forma cristalina madura del esmalte. ⁵

Nishikawa y col., analizaron la arquitectura de los prismas del esmalte así como el arreglo de los ameloblastos en dientes de cerdo y mono, utilizando microscopía óptica (MO), MET y MEB. Ellos encontraron que los prismas del esmalte en los dientes de cerdo estaban

ordenados en hileras longitudinales rectas en la capa inicial, en hileras onduladas en la capa interna, y con un patrón en forma de eses en las capas externas. El entrecruzamiento de los prismas sólo se encontró en las capas internas. Los cortes transversales de los prismas del esmalte de cerdo presentaban una forma de arcada en las capas inicial e interna, y casi una forma redondeada con fronteras circulares en la capa externa. El arreglo de los ameloblastos secretores a nivel de la red terminal distal y los procesos de Tomes, y la forma de dichos procesos correspondía a aquellos de los prismas del esmalte en las capas internas. Las redes terminales distales estaban bien desarrolladas entre hileras rectas de los ameloblastos, formando la capa inicial y entre hileras onduladas de ameloblastos formando la capa interna. Sin embargo, en los ameloblastos que formaban la capa externa, mismos que perdieron su patrón de hilera, los filamentos de la red terminal distal estaban distribuidos uniformemente en la periferia de las células. En los monos también se observó un arreglo similar en forma de hileras onduladas de ameloblastos a nivel de la red terminal distal y el proceso de Tomes.⁶

I.1 COMPOSICIÓN QUÍMICA

Material inorgánico

El esmalte dental humano está compuesto de 96% de material inorgánico y 4% de material orgánico y agua. La hidroxiapatita es el principal componente inorgánico del esmalte, las figuras 1.2 y 1.3 muestran un espectro de rayos X característicos y un difractograma de rayos X del esmalte dental respectivamente donde se demuestra la presencia de hidroxiapatita. La hidroxiapatita también se encuentra en huesos, cartílago calcificado, dentina y cemento. Es una de las apatitas biológicas más conocida: se sabe que no es completamente pura, porta varios elementos de impureza que en ocasiones son benéficos como el flúor, pero en general rompen su estequiometría y alguna veces su estructura.⁷ Es baja en iones hidroxilo y calcio. En el cuerpo humano se encuentra un promedio de 780g de fósforo (P) de los cuales casi el 85% está presente en los huesos como hidroxiapatita. La composición aproximada de los huesos de adulto después de eliminar agua es: hidroxiapatita 60%, colágeno 30%, lípidos, proteínas, polisacáridos, etc., 10%.

El esmalte maduro está expuesto a un ambiente de saliva sobresaturada con calcio y fosfato, y contiene otros iones con concentración diferente a un esmalte recién erupcionado. No es raro encontrar diferente composición en la superficie y en el interior del esmalte. Bress y col.,⁸ reportaron que el fluoruro y el zinc (Zn) tienen un gradiente de concentración decreciente de la superficie del

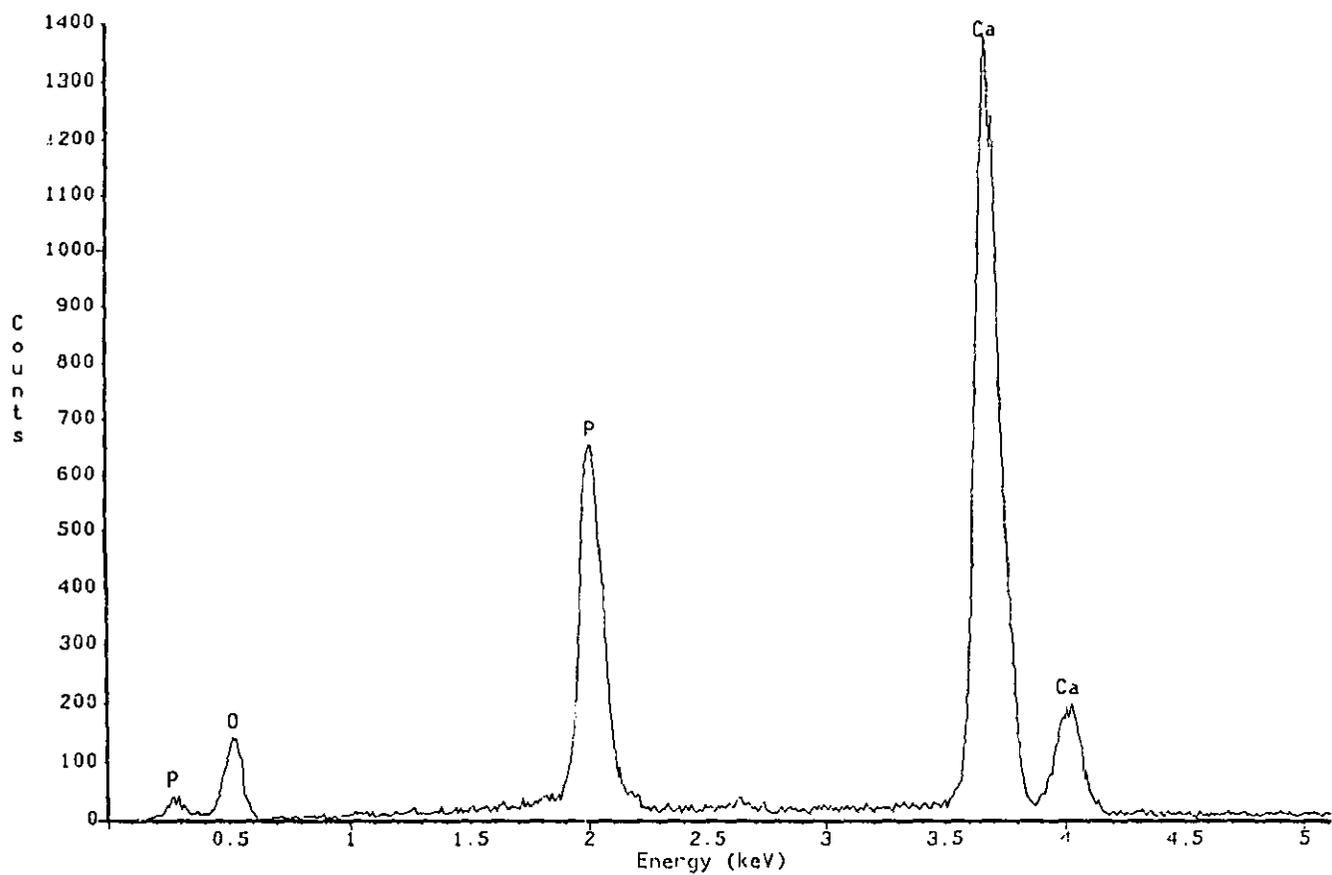


Fig 1.2 Espectro de EDS de rayos-x característicos del esmalte dental humano mostrando los elementos principales de la hidroxiapatita: Ca, P y O.

esmalte a la unión amelodentinaria, mientras el carbonato y el magnesio tienen un gradiente en dirección opuesta. El esmalte de la superficie está más mineralizado que el esmalte interno y tiene menor contenido de agua. Elementos como el estroncio y cobre están distribuidos uniformemente por todo el esmalte, lo que nos sugiere que se depositaron en el momento de la formación del esmalte y no estuvieron sometidos a cambios.¹ En la figura 1.2 se muestra el espectro químico del esmalte dental tomado por espectroscopía de dispersión de rayos X en el cual se muestran los elementos principales.

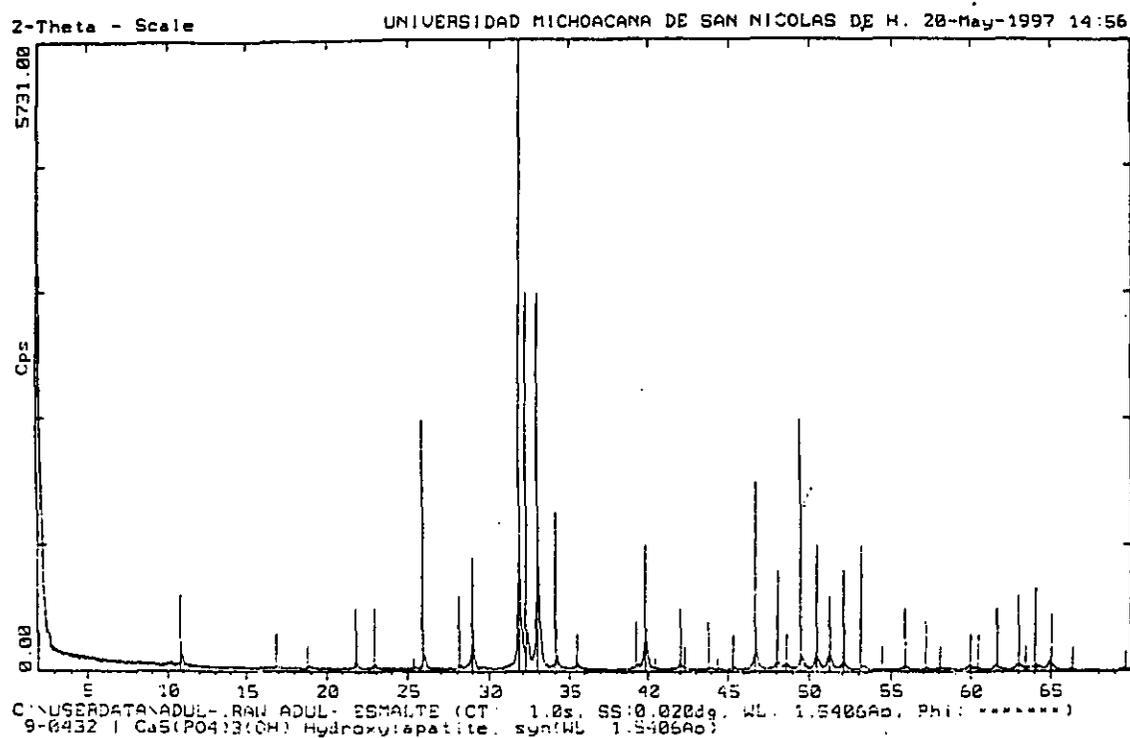


Fig 1.3 Difractograma del esmalte dental humano. Los picos obtenidos son identificados con los observados en la hidroxiapatita. Aquí las líneas representan las señales provenientes de la hidroxiapatita.

En la tabla 1 se muestran los principales elementos que conforman al esmalte dental y sus rangos de concentración relativos (promedios).

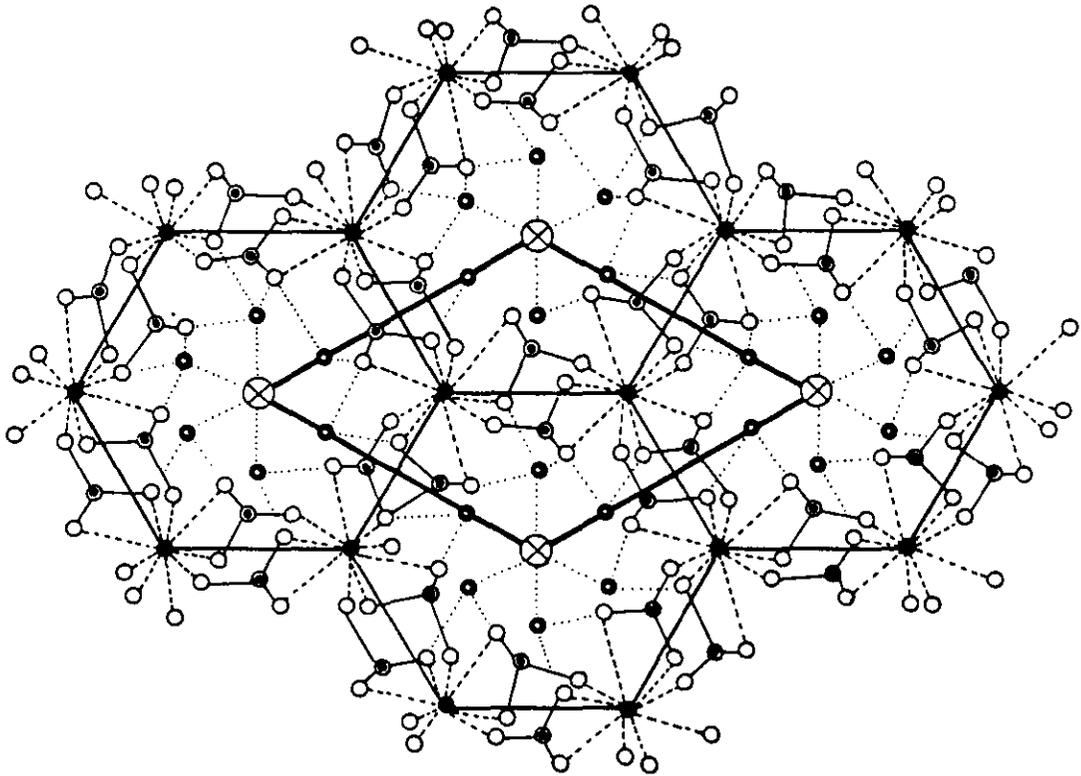
Constituyentes	Análisis
	Porcentaje en peso Molecular
Ca	33.6 -39.4
P	16.1 -18.0
CO ₂	1.95 - 3.66
Na	0.25 -0.90
Mg	0.25 - 0.56
Cl	0.19 - 0.30
K	0.05 -0.30
	Partes por millón 5000 en la superficie
F	
Fe	8 - 218
Zn	152 - 227
Sr	50 - 400
Cu	10 - 100
Mn	0 - 18
Ag	0 - 100
Relación en peso Ca/P	1.92-2.17
Relación molar	1.5-1.68

Tabla I. Análisis químico del esmalte dental humano. Nótese que el cociente CA/P es alrededor de 2, mientras que para la hidroxiapatita sintética es de 1.67.

De acuerdo a lo reportado por Gross y col.,⁹ las muestras de hueso tienen una relación Ca/P de 1.50, mientras que la estequiometría de la hidroxiapatita pura es de 1.67. Esta diferencia se atribuye principalmente a que el fósforo se encuentra unido a otros cationes. El crecimiento del hueso involucra la formación inicial de un material amorfo que mediante un proceso sumamente complejo y a temperatura corporal cristaliza en forma de agujas dentro de las fibras de colágeno.¹⁰

Apatita del esmalte

La química cristalina de la apatita del esmalte es probablemente la más conocida y entendida de las apatitas biológicas. Esta es una apatita imperfecta, baja en calcio, y en iones de hidroxilo, pero rica en impurezas sustitucionales. Pocas impurezas como lo es el flúor, son benéficas para el esmalte, la mayoría de las impurezas parecen romper su estructura. La parte de la estructura de la hidroxiapatita que tiene gran interés para el esmalte desde el punto de vista de las posiciones que pueden ocupar los elementos de impureza es la región alrededor de los sitios del radical OH⁻, esencialmente la que forma los iones Ca²⁺ y PO₄⁻³¹⁰ (figura 1.4)



- Fosfóro
- ⊗ Hidroxilo
- Calcio (I)
- Calcio (II)
- Oxígeno

Fig 1.4 Estructura de la hidroxiapatita sintética cuando se observa a lo largo de la dirección [0001]. En esta presentación los hidroxilos ocupan los centros de los hexágonos formados por los átomos de calcio.

Material Orgánico

El material orgánico consiste principalmente de proteínas. Durante el desarrollo del esmalte este controla la nucleación y orientación de los cristales de apatita. En el esmalte maduro el material orgánico forma la matriz que embebe a estos cristales de hidroxiapatita, dándole resistencia a la fractura. Las proteínas del esmalte son conocidas con el nombre de amelogeninas y enamelinas. Estas son muy similares a la familia de proteínas de las queratinas, pero no ajustan completamente la composición de los aminoácidos. Un tipo de amelogenina es soluble en ácido fosfórico con un pH neutro y puede ser morfológicamente relacionada a una red fina del material orgánico que rodea los cristales de hidroxiapatita. El segundo tipo, la enamulina, es extremadamente insoluble aún después de largos tiempos de ataque químico. Histológicamente puede ser asociada a partes estructurales específicas del esmalte como son los penachos y las laminillas (Fig. 1.5).

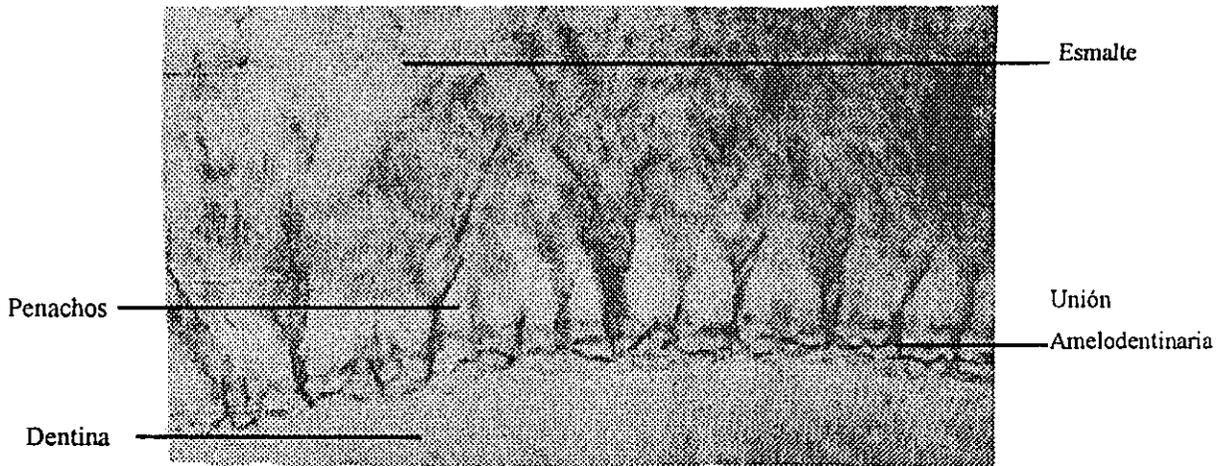


Fig.1.5. Corte transversal por desgaste a través del diente. Se pueden observar los numerosos penachos que se extienden desde la unión amelodentinaria hasta el esmalte (de Orban-Bahskar, Histología y Embriología bucal, pp 71, 1991).

I.II ESTRUCTURA

La unidad estructural del esmalte esta conformada por prismas, que a su vez están formados por cristales de hidroxiapatita; ésta es un cristal que corresponde al sistema hexagonal (grupo espacial $P6_3/m$) con un parámetro de red de $a=0.942\text{nm}$, $c=0.688\text{nm}$ y su composición química es $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{10}$.¹¹

En la figura 1.6 se muestra el sistema hexagonal de la estructura de la hidroxiapatita. La zona remarcada con una línea oscura muestra una celda unitaria. La celda unitaria de la hidroxiapatita constituye la unidad estructural más pequeña de su forma paralelepipedica, en la que se incluyen 10 átomos de calcio, seis grupos fosfato (PO_4) y 2 grupos oxhidrilos (OH). La celda unitaria puede generar un cristal largo por medio de una repetición indefinida de esta celda en la dirección

de los tres ejes del cristal. Los grupos oxhidrilos están ubicados en las esquinas de la celda unitaria. Los diez átomos de calcio están definidos como calcios columnares (Ca I) o calcios en eje de tornillo (Ca II) dependiendo de su medio ambiente. Cuatro de los átomos de calcio ocupan la posición de calcio columnar (Ca I) en la celda unitaria. Los otros seis calcios ocupan la posición de eje de tornillo (Ca II) formando los triángulos de calcio alrededor del grupo OH central, ubicado a lo largo del eje c. Los 6 grupos PO_4 están ordenados alrededor de los grupos OH ubicados en las esquinas de la celda unitaria¹².

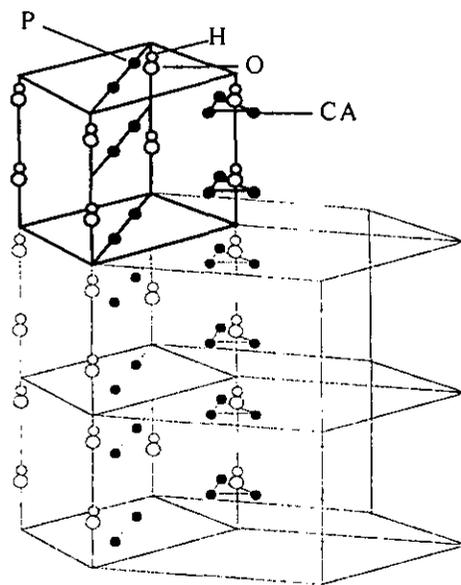


Figura I.6. Estructura hexagonal de la celda unitaria de la hidroxiapatita del esmalte dental humano.

Los cristales de hidroxiapatita del esmalte de los mamíferos presentan una forma hexagonal cuando se examinan en cortes transversales con el microscopio electrónico de transmisión. Se han propuesto dos

modelos para explicar el perfil cristalográfico hexagonal. El modelo de "La cinta hexagonal" propone que los perfiles hexagonales son verdaderos cortes transversales de cintas hexagonales elongadas. El modelo de "La cinta rectangular" propone que los perfiles cristalinos son segmentos rectangulares tridimensionales (paralelepípedos), que se proyectan como hexágonos opacos en las micrografías rutinarias del microscopio de transmisión. Warshawsky y col. indican que los cristales del esmalte de las ratas, tienen una forma de cinta aplanada, con perfiles rectangulares, en cortes transversales. Las imágenes hexagonales, observadas en las micrografías electrónicas de cortes delgados de esmalte, resultan del avistamiento de segmentos con una forma de paralelepípedo de estos cristales, como sombras bidimensionales.¹⁰

En una serie de estudios para investigar los rasgos y características estructurales básicas de los cristales de apatita biológica, utilizando microscopía electrónica de transmisión, Ichijo y col. examinaron la ultraestructura de los cristales de esmalte, dentina y hueso humanos en una resolución cercana a la atómica, y mostraron la configuración de la estructura de la hidroxapatita, a través de cortes transversales y longitudinales de los cristales. Subsecuentemente, basados en los resultados de otros autores acerca de la ultraestructura del hueso y diente, fueron capaces de examinar directamente las imágenes de las imperfecciones de la red, en los cristales del esmalte y hueso humano, tales como los defectos puntuales de la estructura, los defectos lineales y los defectos de las caras en los cristales. Su estudio fue

realizado en esmalte sano de primeros molares inferiores erupcionados de humano recientemente extraídos. Obtuvieron pequeños cubos de esmalte, los cuales fijaron en glutaraldehído y tetroxido de osmio, para después fijarlos con una resina epoxica utilizando los métodos rutinarios. Los cortes ultradelgados fueron obtenidos con un disco de diamante; la muestra se trabajó sin descalcificar. Los cortes fueron examinados con un microscopio electrónico de transmisión Hitachi H-800 y H 9000 operados a 200kv y 300kv. Cada cristal fue observado a una amplificación inicial de 300 000 aumentos y a una magnificación final de 10 000 000 aumentos. Ellos confirman que existe una fusión entre los cristales adyacentes, la cual se puede presentar en algún momento del desarrollo del esmalte.

8

Bres y col., estudiaron la estructura de los cristales del esmalte obtenido de 4 premolares humanos, por medio de microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (METAR) en las direcciones cristalográficas [0001],[2110], [1540],[0110] y [1213]. En todos los casos, fue posible compaginar las imágenes experimentales con las imágenes calculadas utilizando las posiciones atómicas del mineral de la hidroxiapatita. Sin embargo, se observó una desviación de la simetría hexagonal, caracterizada por los planos (1010) de intensidad diferente a los del plano (3030) y {1010}. En su trabajo, presentaron una mejoría de la resolución Scherzer de 0.25-0.20nm sobre su trabajo previo en cristales de esmalte biológico. Esta mejora en la resolución les permitió la incorporación de reflexiones

cristalográficas de una frecuencia espacial mayor dentro del proceso de imágenes del microscopio y los llevó a una determinación más precisa de la estructura de los cristales .¹⁰

Bres y col. reportaron una desviación de la simetría hexagonal de la hidroxiapatita. Esta simetría estaba caracterizada por: 1) planos preferenciales que podían ser indexados como (100) con una intensidad que difiere de la (300) y los otros planos equivalentes {100}; y 2) un rayado con reflexiones mayores en el difractograma óptico de la imagen del cristal. Las simulaciones por computadora, mostraron que también se podían observar planos preferenciales, en ciertos ángulos de inclinación específicos de los cristales, y/o inclinaciones del haz, y/o desalineación de la apertura objetiva. El rayado con reflexiones de mayor grado, esta relacionado con la deformación misma del cristal, y de hecho, muestra una desviación de los cristales observados.¹³

I.III PROPIEDADES

El tejido del esmalte es de gran dureza y recubre la corona anatómica de los dientes. La relación en su superficie exterior es con el medio bucal y en la superficie interna con la dentina. La dureza del esmalte en la escala Koop Hardness Number (KHN) es de 200-500 kg./m². Su elasticidad es casi nula como resultado de su alto contenido en sales minerales y escasa sustancia orgánica, comportandose por lo tanto como un tejido frágil.

Se cree que el esmalte tiene características de alta dureza anisotrópica, debido a su estructura prismática. Es probable que el esmalte sea más duro en la dirección de los prismas que en dirección perpendicular a ellos. Se cree que los prismas corren aproximadamente perpendiculares a la unión amelodentinaria. La anisotropía curvilínea que algunas veces resulta puede ser fácilmente modelada por el TOMECH, un programa de elementos finitos desarrollado en la Universidad de Sheffield, ya que la curvilinealidad de las propiedades mecánicas esta disponible como una característica automatizada de este programa. Spears y col. estudiaron los patrones de tensión debidos a una carga externa, esto se llevó a cabo en modelos abstractos bidimensionales, y en un modelo de un segundo premolar mandibular, tanto para el esmalte anisotrópico como para el isotrópico. Sus resultados fueron comparados con las claves comerciales ANSYS y se obtuvo una gran congruencia. Se encontró que el esmalte con propiedades anisotrópicas tenía una distribución

isotrópico el trayecto de la carga es dirigida a través del esmalte mismo, mientras que para el esmalte anisotrópico el trayecto de la carga se dirige dentro de la dentina, el camino de la carga sigue la dirección de dureza de los prismas del esmalte. Por lo tanto, si el esmalte es, de hecho anisotrópico, sus funciones difieren enormemente de las sugeridas en hipótesis previas. El esmalte con características de material anisotrópico, proporciona una superficie protectora, susceptible a presentar poco desgaste, mientras que en forma simultánea, dispersa la carga fuera de su fase quebradiza, reduciendo así el potencial para una fractura dental.¹⁴

Van Duk y col. estudiaron las características electroquímicas del esmalte dental humano, ellos calcularon la carga fija del esmalte y la relación de los coeficientes de difusión de los cationes con respecto a los aniones de los electrolitos más comunes dentro del esmalte, esto fue calculado a partir de fuerzas electromotoras desarrolladas en concentraciones celulares a lo largo de cortes de esmalte humano, o membranas sintéticas de hidroxiapatita. Los electrolitos utilizados en su estudio fueron KCl, KF, NaCl, CaCl₂, KH₂PO₄ y K₂HPO₄. Sus resultados indicaron que el esmalte se comporta como una membrana de intercambio iónico, en la cual la carga fija, depende del medio ambiente electrolítico y la secuencia de exposición a los diferentes electrolitos.¹⁵

La desmineralización de la subsuperficie del esmalte dental durante la disolución ácida, es un hecho que ha sido reportado en innumerables

ocasiones, sin embargo sus causas siguen siendo inciertas. Al principio se pensó que el fenómeno era el resultado de la estructura física del esmalte. Estudios más recientes han demostrado que la desmineralización de la subsuperficie es un fenómeno que se presenta en otros sólidos permeables, lo que indica que deben de estar involucrados algunos factores más fundamentales en este efecto tan curioso. Para poder investigar este fenómeno Anderson y col., llevaron acabo experimentos de disolución por medio de un barrido microradiografico en varios sistemas, incluyendo: esmalte dental, agregados de hidroxiapatita, o hidroxidos (calcio y magnesio). Ellos eligieron estos elementos para eliminar los efectos de la estructura y composición. Encontraron que no era posible atribuir la desmineralización de estos sistemas a características comunes. A partir de esto, concluyeron que la desmineralización de la subsuperficie del esmalte así como la de otros tejidos mineralizados deben ser atribuidos a una causa no común.¹⁶

Algunos jugos de frutas con pH relativamente bajos han demostrado tener efectos corrosivos en los dientes humanos, en un tiempo relativamente corto, Grobler y col. estudiaron los efectos de la miel, la cual también presenta un pH relativamente bajo, pensando que pudiera producir los mismos efectos, pero al observar sus muestras en el microscopio electrónico, estas no mostraron ninguna erosión del esmalte, siendo que dichas muestras habían sido embebidas en miel por un período de 30 minutos. También realizaron pruebas de microdureza en el esmalte, provocando 7 indentaciones de 25 μ m para

cada segmento de esmalte, las pruebas de dureza (KHN) fueron realizadas con un microdurometro Leitz Weztlar con una fuerza de 200g aplicada durante 15 segundos. A partir de la profundidad de cada indentación de diamante, se calcularon los valores Knoop de dureza. Estas pruebas de microdureza tampoco mostraron ningún deterioro de la estructura del esmalte. La ausencia de cualquier efecto sólo pudo ser atribuida parcialmente a los niveles de calcio, fósforo, y fluoruro que se encuentran presentes en la miel.¹⁷

I.IV ANTECEDENTES DEL PRESENTE TRABAJO

En el Instituto de Física de la UNAM desde 1992 se han realizado múltiples investigaciones para el estudio del esmalte. Así tenemos la tesis titulada "Caracterización de esmalte dental humano por microscopía electrónica de transmisión",¹⁸ la cual marcó el inicio de un proyecto de investigación sobre el esmalte, realizado en forma conjunta por la Facultad de Odontología y el Instituto de Física de la UNAM. En ella se demostró que el esmalte está formado por pequeños cristales hexagonales de hidroxiapatita, así como también se estudió el contraste y posibles estructuras de la línea obscura. Posteriormente en la tesis titulada "Análisis Estructural y Químico del Esmalte Dental Humano por Técnicas de Microscopía Electrónica",⁷ se demostró que el esmalte consiste de prismas compuestos por cristales ubicados en forma paralela a su eje longitudinal, y que el tamaño de estos cristales varía con la edad. También se determinó, que los cristales del esmalte presentan una forma alargada en las imágenes de campo claro, pero que están compuestos por un conjunto de cristales orientados al azar a lo largo de su eje c, y que los prismas del esmalte de niños, adultos y ancianos presentan la línea obscura. Así mismo, en la tesis "Análisis Estructural y Químico de la Línea Obscura de los Granos del Esmalte Dental Humano por medio de Microscopía Electrónica",¹ se estudió más a fondo la línea obscura demostrando que la

concentración de calcio que muestra el grano del esmalte dental en la zona de la línea oscura es mayor. De igual forma, se corroboró lo hallado en las tesis anteriores, es decir, la línea oscura representa un contraste de fase: se observa bajo foco y desaparece cuando se encuentra en foco.

I.V OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO

Uno de los objetivos del presente trabajo de Tesis es aumentar nuestro conocimiento sobre la estructura del esmalte dental humano, poniendo atención sobre los temas que más nos pueden aportar. De este modo analizamos al esmalte dental proveniente de muestras de niño, adulto y anciano, comparando las diferencias que se registren. Esta comparación nos permitirá analizar la "evolución" que presenta el esmalte a medida que envejece.

La diferencia que esperamos encontrar en el esmalte de los tres grupos se basa en principalmente en la edad del esmalte. Esta diferencia está directamente relacionada con la composición química, y el ordenamiento cristalográfico, apoyando o no, la evidencia clínica de variaciones de las propiedades tanto físicas como químicas del esmalte.

Además de ésto, aprovecharemos estas observaciones para adentrarnos aún más en los parámetros estructurales del esmalte que

actualmente se encuentran en proceso de discusión a nivel mundial como son: el arreglo cristalino , el contraste que presentan los cristales del esmalte, sus defectos cristalinos, y la línea oscura. Esto representa otro de los objetivos del presente trabajo de tesis.

La línea oscura es, por sí sola, un tema amplio de investigación. El descubrir el papel que juega en la estructura del esmalte es uno de los objetivos primordiales en los trabajos que se realizan a nivel mundial. Esperamos aumentar nuestro conocimiento sobre ella con el desarrollo del presente trabajo.

I.VI HIPÓTESIS DE TRABAJO

La composición química y la estructura a nivel micro y nanométrico del esmalte debe de variar conforme avanza la edad. De igual manera, los patrones de difracción que se obtengan de cada grupo de edad, tienen que ser diferentes. Esta diferencia también debe verse reflejada en el contraste mostrado por estos tipos de muestras.

I.VII VARIABLES DE ESTUDIO

Variable dependiente:

Composición y estructura cristalina del esmalte.

Variable independiente:

Edad del individuo.

I.VII JUSTIFICACIÓN DEL PRESENTE TRABAJO

El estudio del esmalte dental desde el punto de vista estructural es de primordial interés en la ciencia odontológica y en la ciencia de los materiales. El esmalte es el material más mineralizado del cuerpo humano y presenta características muy singulares que, al momento de comprender su funcionamiento, bien pueden ser utilizadas para el diseño y fabricación de nuevos materiales de uso tanto odontológico como industrial. Hay que tomar en cuenta que la

humanidad siempre se ha visto favorecida por el estudio de estructuras tanto en el reino vegetal como en el animal y humano, y este trabajo no es la excepción.

El conocimiento de la evolución de los diferentes tejidos y órganos a través del tiempo es necesario en el acervo de las ciencias básicas. La edad en la que los pacientes son sometidos a tratamiento dental es de interés por las diferentes características que presentan a nivel macro y microestructural. A nivel de la ciencia odontológica, el conocer las diferencias estructurales que presenta el esmalte dentro del desarrollo de la vida es de importancia crucial y se justifica por sí misma.

CAPÍTULO II

MICROSCOPIO ELECTRÓNICO.

El microscopio electrónico (figura II.1) es un instrumento que explota la pequeñísimas longitudes de onda de los haces electrónicos acelerados con la finalidad de formar imágenes. Actualmente la microscopía electrónica es ampliamente usada en estudios biológicos de las estructuras celulares y ha contribuido enormemente en la comprensión de ellas. En las ciencias físicas, sus aplicaciones incluyen el estudio de la ultraestructura de los metales y los materiales cristalinos.

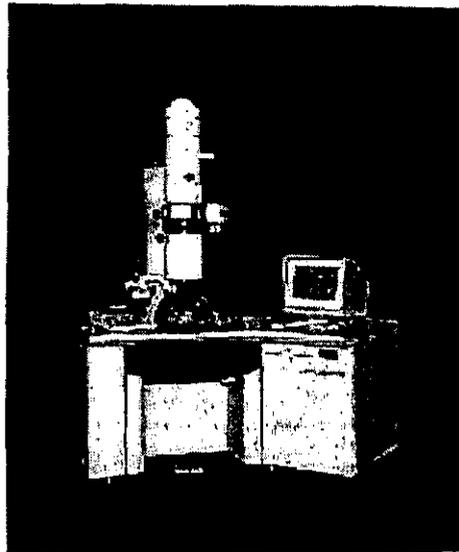
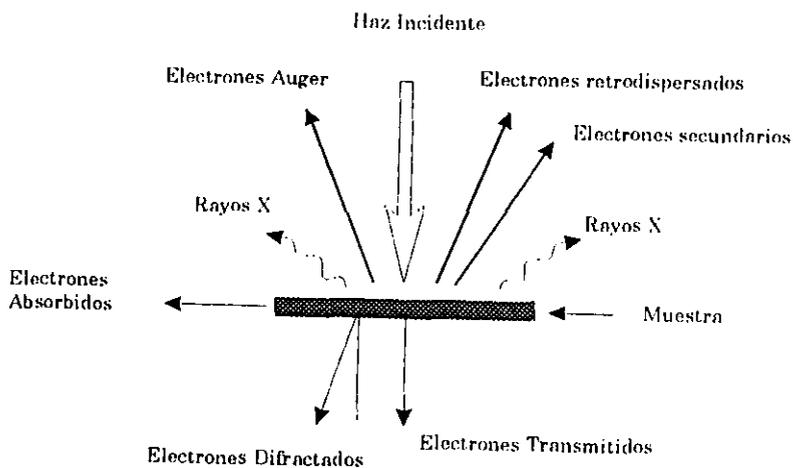


Fig. II.1 Microscopio electrónico de transmisión.

II.1 Interacción haz muestra

Cuando el haz de electrones interacciona con la muestra se producen varios tipos de señales, las cuales nos permiten hacer la caracterización estructural y química de esta. Estas señales son: electrones retrodispersados, secundarios, absorbidos, Auger, transmitidos y Rayos X característicos. La figura II.2 muestra esquemáticamente la interacción haz electrónico-muestra y las imágenes que se originan. Los electrones retrodispersados y secundarios nos dan información sobre la superficie de la muestra, permitiéndonos de este modo obtener una imagen topográfica de ella. Estos electrones son la fuente de información para la microscopía electrónica de barrido. Los electrones absorbidos, con el detector adecuado, nos dan información sobre la resistividad de la muestra. Los electrones Auger y los rayos X característicos dependen de la composición química de la muestra, permitiéndonos hacer, por lo tanto, un análisis químico de ella. Los electrones que atraviesan la muestra los podemos clasificar en dos tipos: transmitidos, es decir aquellos que pasan la muestra sin ser desviados de su dirección incidente; y difractados, que son aquellos que si son desviados de su dirección de incidencia. Los haces transmitidos y difractados son los que usa la lente objetiva para formar la imagen de la muestra en un MET. ²⁰



Microscopía electrónica de barrido (MEB) y analítica (EDS).

Microscopía electrónica de transmisión (MET) y pérdida de energía (EELS).

Fig. II.2. Procesos generales por la interacción del haz-electron con la materia (izquierda) y algunas técnicas para su detección (derecha).

II.II MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE TRANSMISIÓN

El MET y el MO funcionan con principios similares; sin embargo en vez de un haz de luz el microscopio electrónico utiliza un haz de electrones que se hace incidir sobre una muestra muy delgada. La fuente de emisión de electrones es un cañón que los acelera con un potencial que oscila entre los 40 y 200 kilovoltios. El haz de electrones presenta una longitud de onda uniforme y el potencial de aceleración también debe ser uniforme. Como los electrones pueden ser frenados por el aire, la columna del microscopio electrónico debe de mantenerse en un vacío del orden de 10^{-4} Torr o mayor. Sus lentes (condensadora, objetiva, intermedia y proyectora) están conformadas por campos magnéticos o electrostáticos. La lente condensadora enfoca a los electrones sobre la muestra; las lentes objetiva, intermedia y proyectora producen la imagen que se observa en la pantalla fluorescente (figura II.3).

1. Filamento
2. Condensadora
3. Objetiva
4. Ocular
5. Ojo

6. Apertura Objetiva
7. Intermedia
8. Proyectora
9. Pantalla
10. Muestra

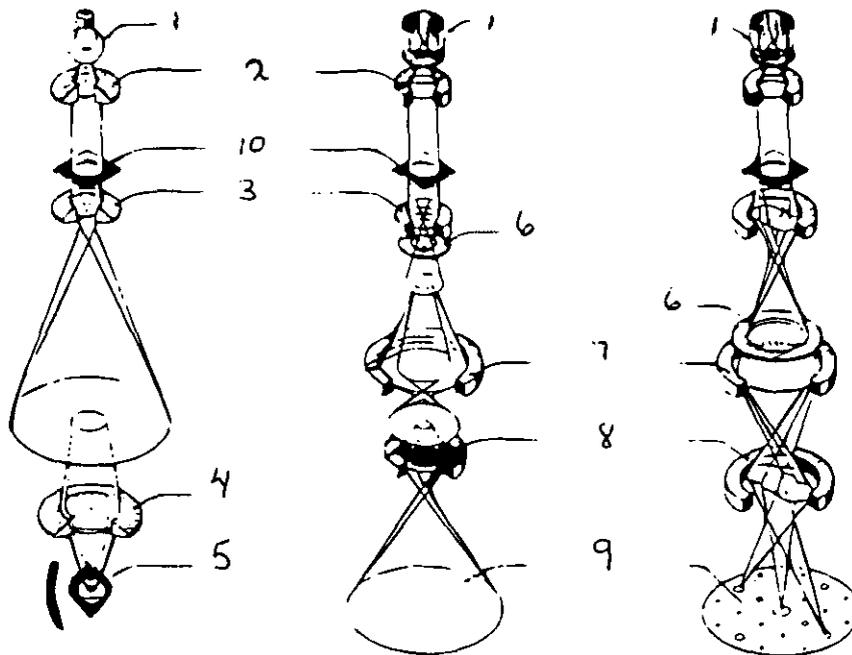


Imagen de un microscopio óptico

Imagen de un microscopio electrónico

Patrón de difracción de electrones

Fig. II.3 Comparación de los componentes de los microscopios óptico, y electrónico de transmisión. En el caso del microscopio electrónico se muestra la formación de la imagen y el patrón de difracción.

El desarrollo del MET se basó en el trabajo de Louis De Broglie, quien demostró que los electrones acelerados se encontraban asociados con longitudes de onda inversamente proporcionales a sus momentos. En 1926 se demostró que los campos magnéticos pueden funcionar como las lentes haciendo que los haces electrónicos converjan en un punto.

Así pues, tenemos que la fuente generadora de electrones se encuentra en el llamado cañón electrónico, que consiste de un filamento de tungsteno o LaB_6 , el cual emite una nube de electrones debido al efecto termoiónico. Estos electrones son atraídos por una placa que presenta un orificio en el centro y con un potencial positivo. Los electrones son atraídos hacia esta placa, pasan por el orificio central y son enviados a los diversos lentes que componen al microscopio, es decir, la lente condensadora enfoca el haz e ilumina la muestra, la lente objetiva forma la primera imagen de la muestra y la enfoca, y por último la lente intermedia y proyectora amplifican y proyectan la imagen en la pantalla. La figura 11.3 muestra una comparación de los componentes de los microscopios ópticos y de transmisión.

El MET se puede operar para formar imágenes de campo claro y campo oscuro (figura 11.4). Para formar patrones de difracción se usan aperturas de área selecta y se enfocan las lentes intermedias sobre el patrón de difracción formado detrás del plano focal de las lentes objetivas.

II.III Difracción de electrones.

Supongamos que un haz de electrones incide perpendicularmente sobre la superficie de la muestra y que ésta es un sólido perfectamente cristalino. Podemos visualizar el haz como ondas planas, cuyo frente de ondas es paralelo a la superficie de la muestra que se mueve con velocidad de fase constante: el haz se difractará en el cristal, de la misma forma que lo hace la luz monocromática cuando pasa por una rejilla. (figura II.5)

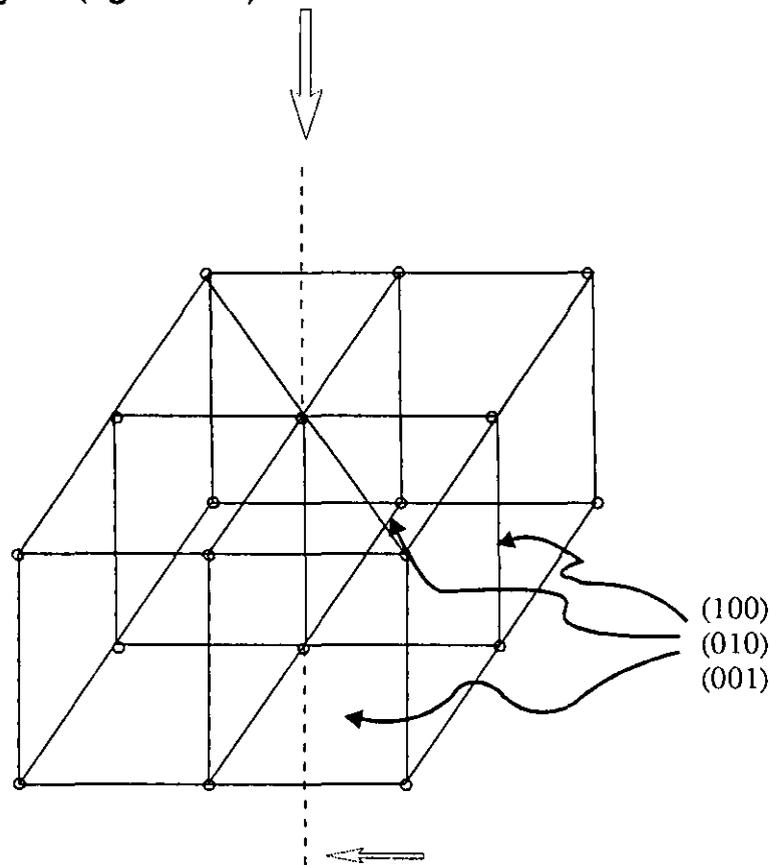


Fig. II.5. Interacción del haz electrónico con la muestra en observación. Solo aquellos planos cuyo eje de zona es prácticamente colineal con el haz incidente, satisfacen la condición de Bragg.

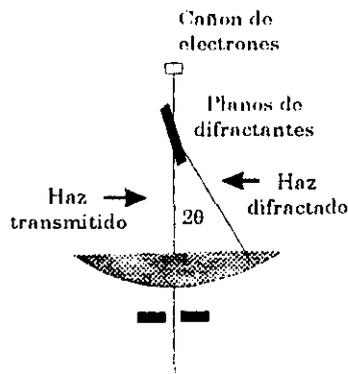
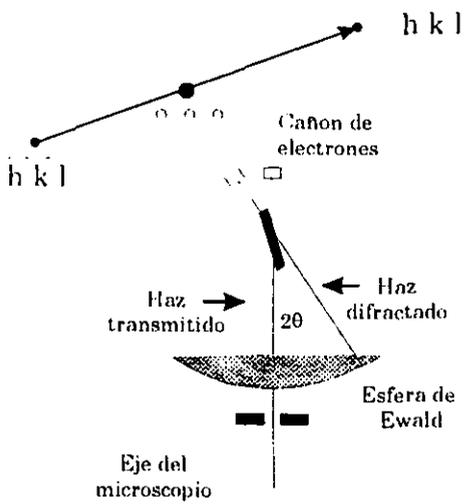
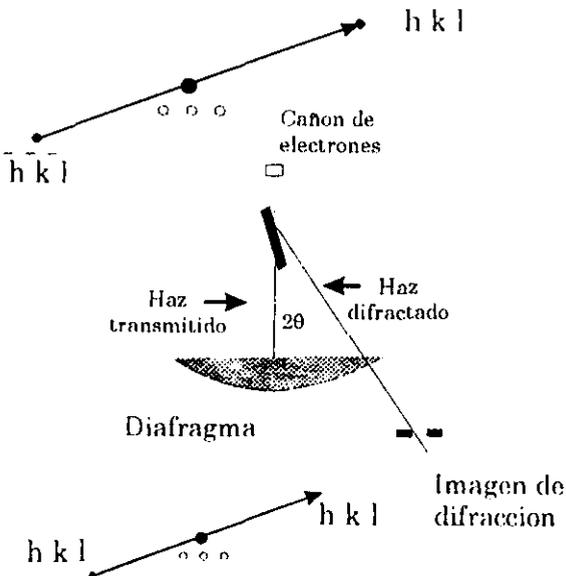


Figura 11.4 Campo oscuro

a) Los haces difractados se discriminan para formar la imagen de campo claro.



b) Desviando el haz (cañon) un ángulo de 2θ en el sentido indicado, el punto de difracción (hkl) queda en el eje óptico para formar una imagen de campo oscuro de alta resolución.



c) Es la misma situación que en a solo que ahora se desplaza el diafragma fuera del eje óptico seleccionando solo el haz difractado (hkl). Con el se forma también una imagen de campo oscuro.

Los patrones de difracción, que constan de un arreglo de puntos luminosos son típicos de monocristales (figura II.6). Esto significa que sólo un cristal difracta el haz. Si el haz electrónico es bastante ancho o la muestra esta formada por varios cristales pequeños orientados aleatoriamente estamos hablando de una muestra policristalina, en este caso el patrón estará formado por anillos concéntricos, cuyos diámetros corresponden al espaciado existente entre los planos atómicos del cristal.

Un patrón de difracción contiene básicamente dos tipos de información:

1. El arreglo espacial, definido en función de la simetría que presenta el patrón, de los valores de las distancias que existan entre los puntos de difracción y el punto central, y los ángulos que se forman entre las líneas que van del centro a cada uno de los puntos.

2. La cristalografía a partir de un conjunto de patrones de difracción, obtenidos en diferentes orientaciones de la muestra, y las intensidades de los puntos en dichos patrones. Así, al hacer una comparación entre las intensidades de los diferentes puntos difractados, y los diferentes patrones de difracción, es posible obtener el tipo de la celda unitaria que presenta el cristal en estudio.

IMAGENES DE DIFRACCIÓN

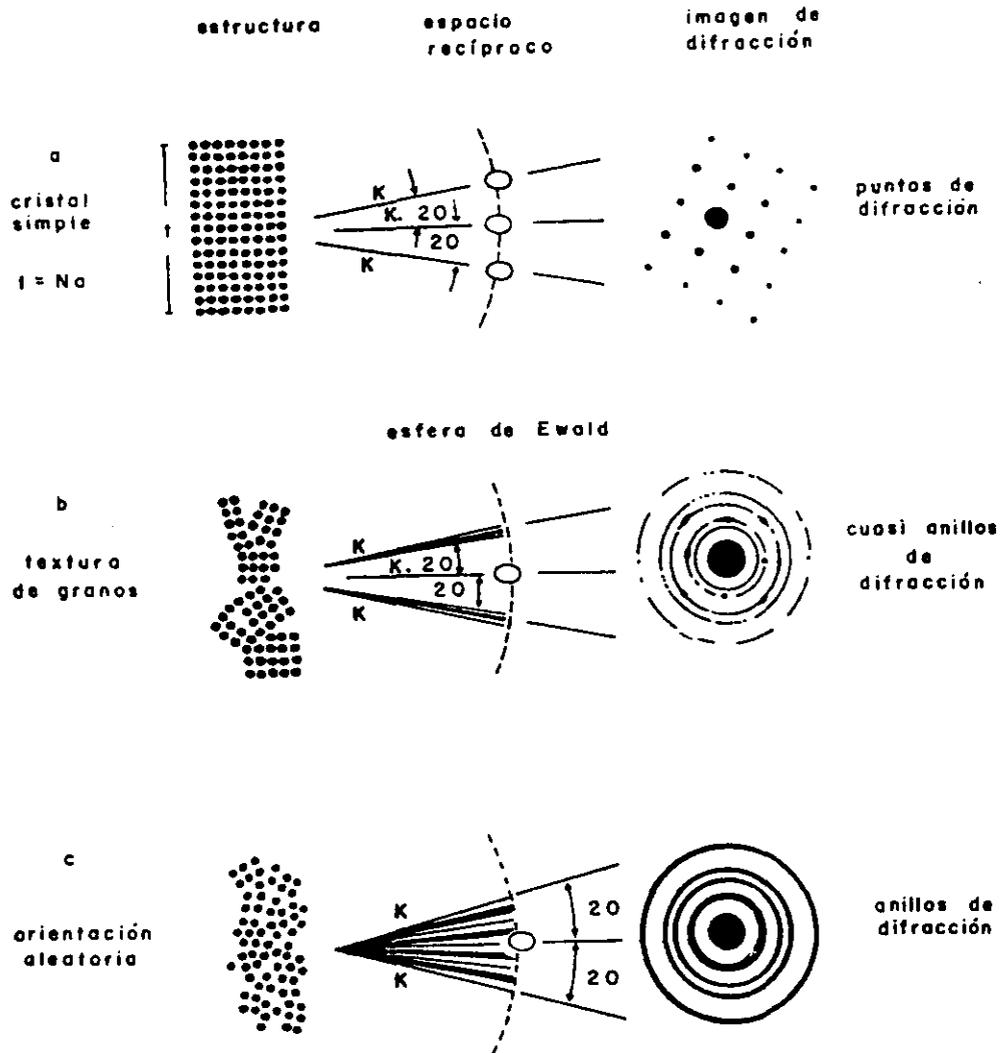


Fig. 11.6. Influencia de la estructura y dimensión de la muestra en la forma de la imagen de difracción. El patrón de difracción es la huella digital del arreglo cristalino que presenta la muestra en observación.

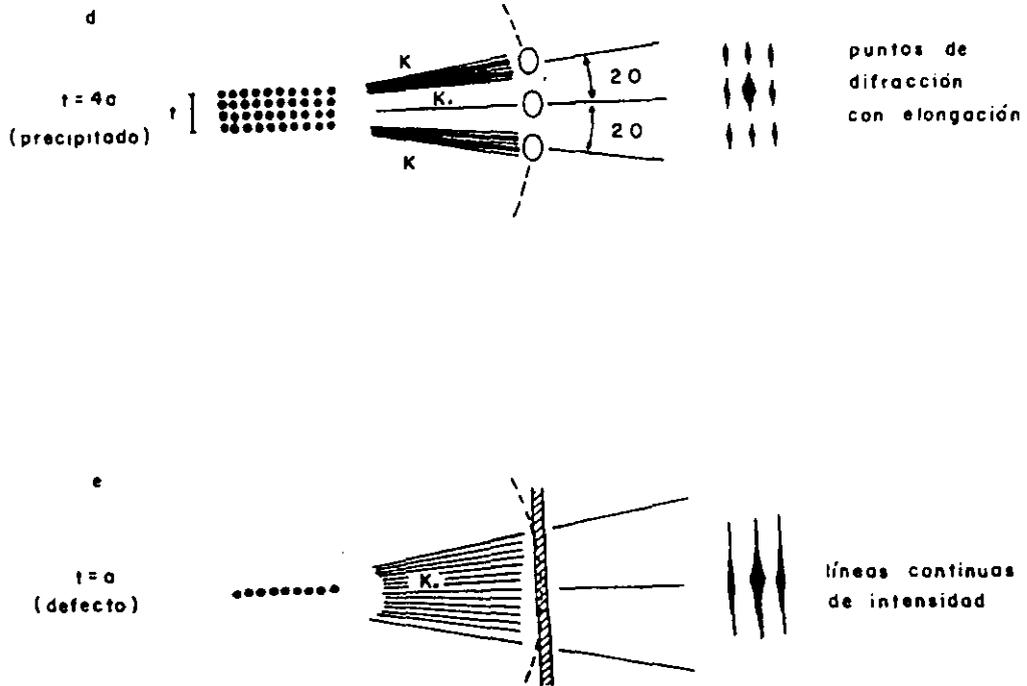


Fig. II.6. Influencia de la estructura y dimensión de la muestra en la forma de la imagen de difracción. El patrón de difracción es la huella digital del arreglo cristalino que presenta la muestra en observación.

Una ecuación muy importante en difracción es conocida como la ley de Bragg. Ésta nos da la condición para que exista interferencia constructiva de la radiación incidente, después que ha interactuado con la muestra (figura II.7), esta ley dice:

$$2d \text{ Sen}\theta = n\lambda$$

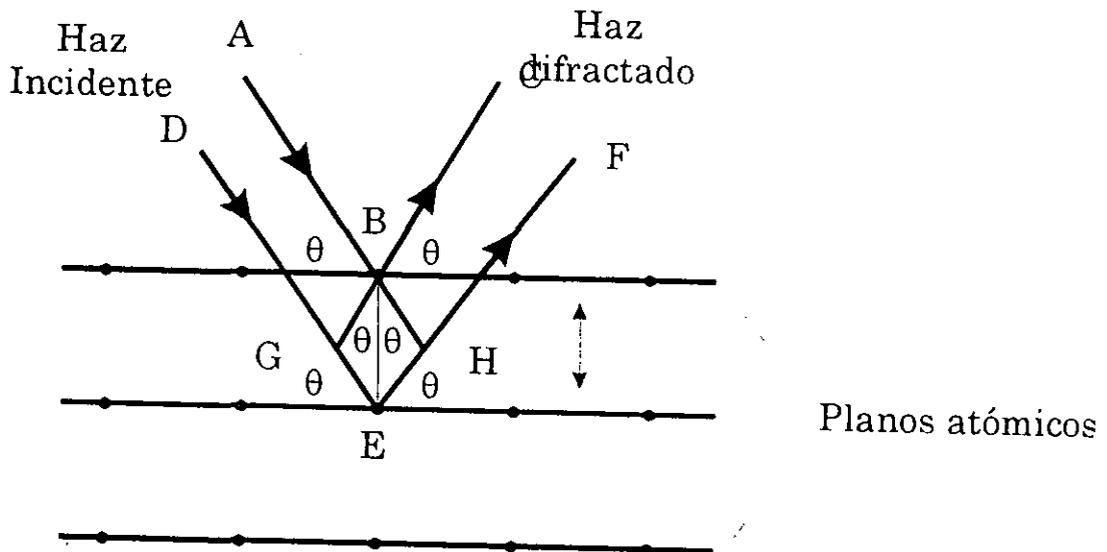


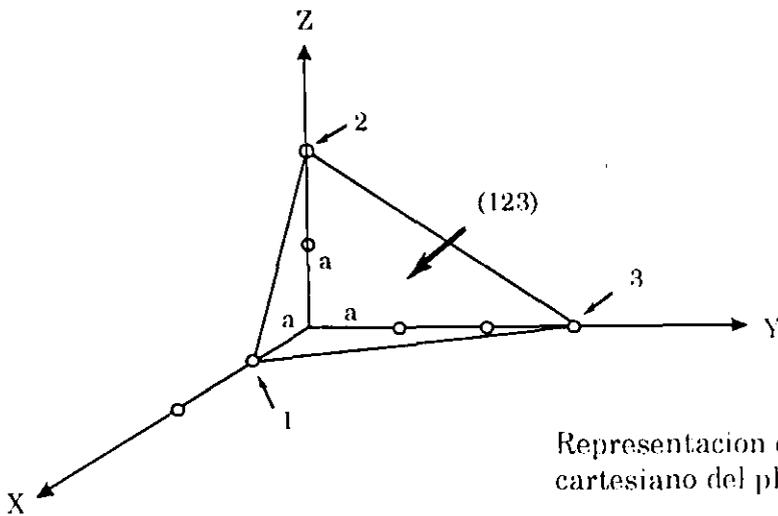
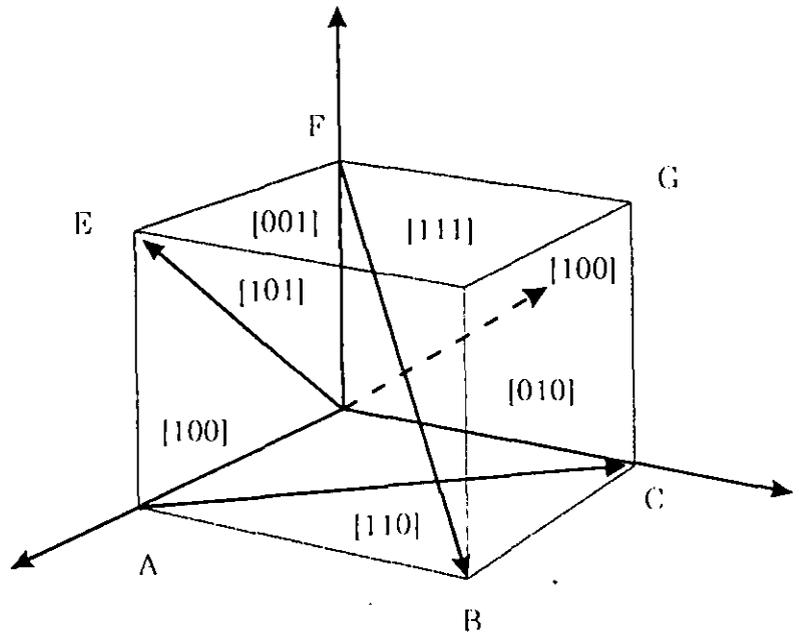
Fig. II.7 Arreglo geométrico para demostrar la ley de Bragg.

donde d es la distancia entre los planos de la red en la dirección de incidencia y θ es el ángulo entre el haz incidente y la superficie del cristal. Esta ecuación nos indica que la interferencia constructiva entre los rayos AC y DF, se da cuando la diferencia de caminos ópticos de la radiación dispersada por planos sucesivos, es múltiplo entero n de la longitud de onda, esto es, el rayo DF recorre una distancia mayor por $GE + EH$ que el rayo AC, y por lo tanto la diferencia de distancias recorridas es $2d \sin\theta$. La reflexión de Bragg sólo ocurre para longitudes de onda tales que $\lambda < d$. Puesto que en los sólidos cristalinos d es del orden de amstrongs, esto indica la razón del porque la luz visible no presenta difracción en estos.

Indexación de Patrones

La indexación consiste en asignar los índices de Miller (H,K,L) a los puntos o a los anillos de un patrón de difracción.

Indices de Miller de las direcciones mas importantes de un cubo



Representación en el sistema cartesiano del plano (123)

Fig. II.8 Indices de Miller y representación en el sistema cartesiano del plano en un cubo.

En la figura II.9, se muestra la obtención de un patrón de difracción en un microscopio electrónico en primera aproximación. En donde R es la distancia entre el haz más intenso del patrón, es decir, el haz transmitido, y un punto de difracción.

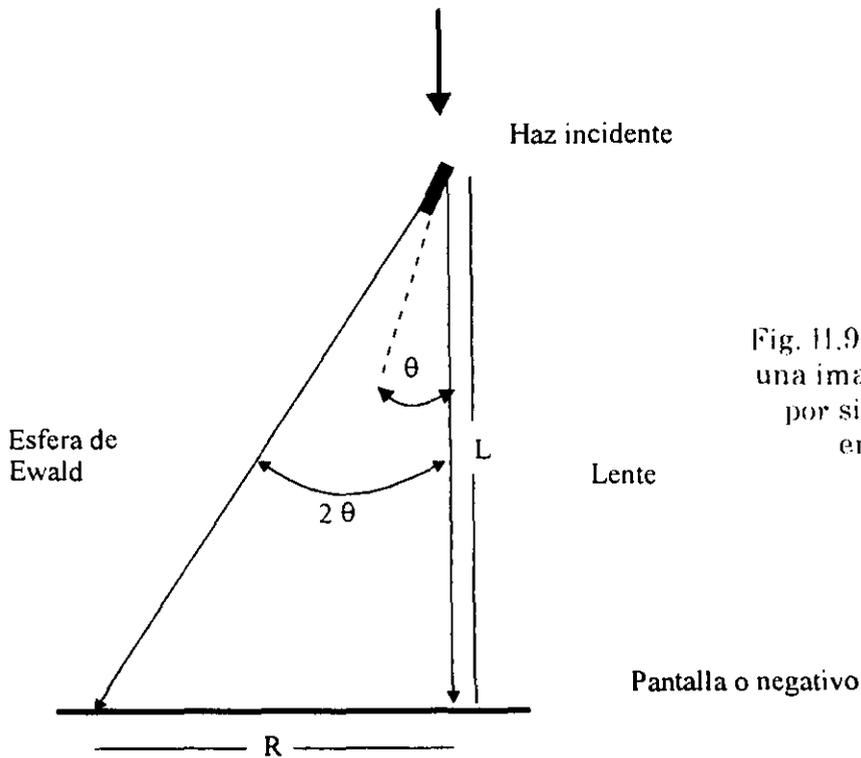


Fig. II.9 Esquema de la formación de una imagen de difracción en el MET por simplicidad se ha omitido el enfoque hacia los haces.

La ecuación $Rd = \lambda L$ relaciona las distancias interplanares d en el cristal con distancia R en el patrón de difracción. λL es llamada constante de cámara la cual es fácil de calcular puesto que L es generalmente dada por el instrumento, al conocer el voltaje de aceleración λ queda fija. Por lo tanto, podemos obtener una lista de distancias interplanares del cristal y comparar sus valores con tablas de distancias para diferentes cristales (aquellas obtenidas a partir de análisis de rayos X e identificar los cristales que se analizan.(figura II.10)

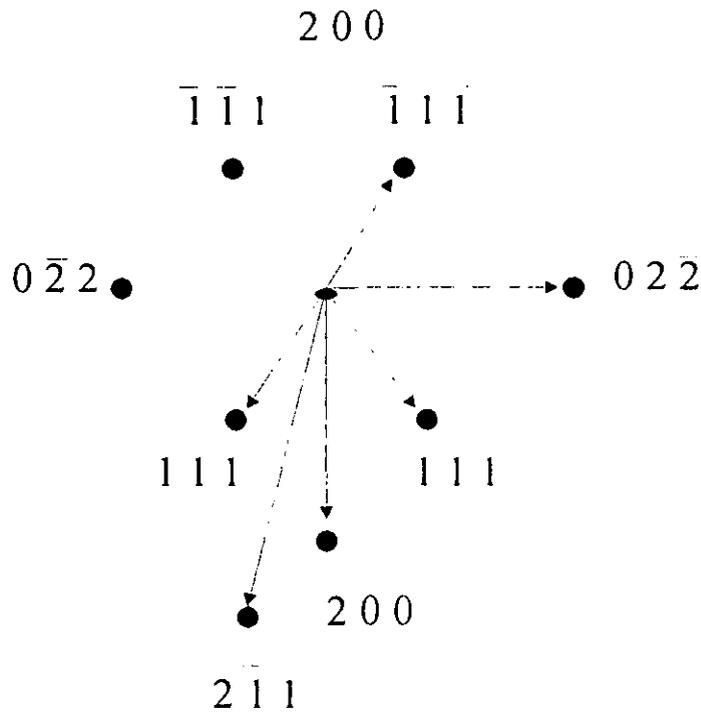


Fig II. 10 Indexación de patrones

II. IV Microscopio electrónico de barrido

El MEB se enfoca sobre un área pequeña de la muestra y barre la superficie de la misma moviendo el haz y detectando en cada zona una intensidad promedio de los electrones secundarios, dando información topográfica de la muestra. (figura II.11)

En este tipo de microscopios, el haz de electrones es producido y enfocado sobre un punto de la muestra por dos lentes condensadoras. La sección transversal del haz barre la muestra por una serie de bobinas. Detectando los electrones secundarios y amplificando las señales por medio de un tubo de rayos catódicos.

El MEB es capaz de utilizar gran parte de las señales provenientes de la interacción de los electrones con los sólidos, y esto nos permite tener mayor información acerca de la orientación cristalina, la composición química, la estructura magnética o el potencial eléctrico del material en observación, si se adaptan los detectores adecuados, de igual forma pueden adaptarse otras técnicas analíticas tales como la detección de rayos X característicos.

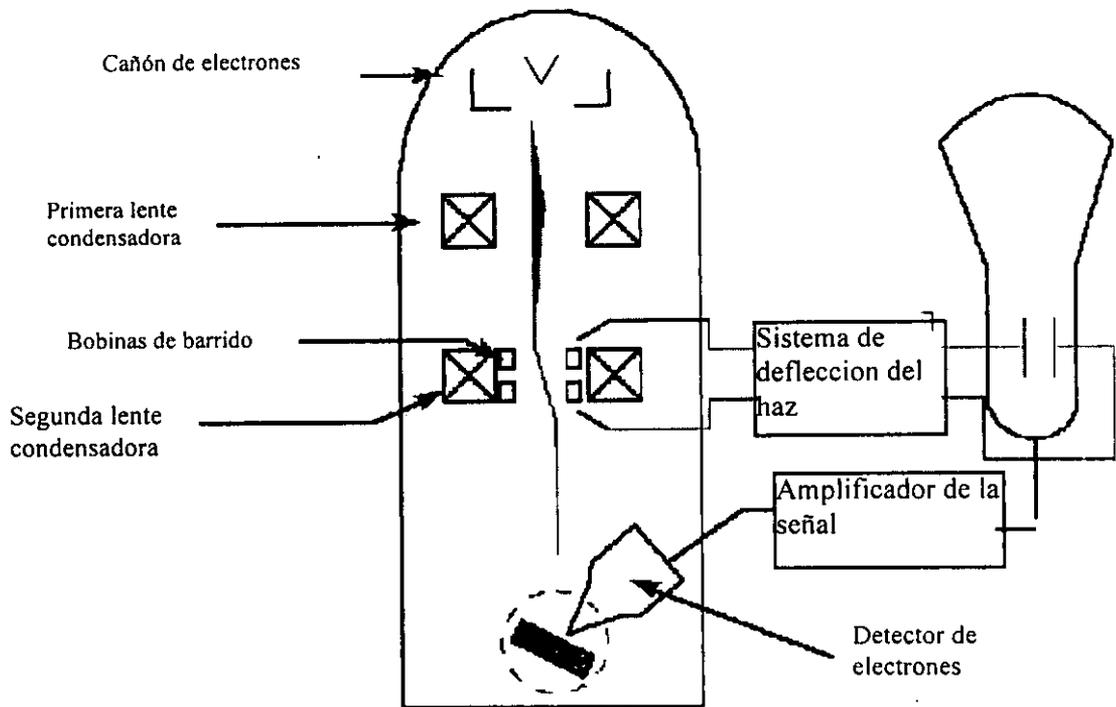


Fig. II.11 Modo de formación de imagen en un microscopio electrónico de barrido.

II. V RAYOS X CARACTERÍSTICOS.

Los rayos X, son una radiación electromagnética cuyo espectro electromagnético está entre 0.05 y 125 KeV y se producen por el bombardeo de electrones a la muestra. El átomo esta formado por electrones que se mueven en diferentes niveles energéticos a los cuales se les asignan las letra K, L, M, N, O. La energía de los niveles energéticos decrece conforme aumenta la distancia entre el nivel y el núcleo.

Como vimos anteriormente al hacer incidir el haz de electrones con la muestra se generan una serie de señales entre las que se cuentan los rayos X. Estos se generan debido a que los electrones del haz incidente chocan contra los electrones ubicados en los orbitales de los átomos de la muestra y los expulsan de su órbita creando un espacio vacío. Los rayos X resultan de la transición de electrones de otros niveles a un nivel más interno. Estos rayos X son únicos de cada elemento, por lo que nos da una información de la composición química de la muestra.

Asimismo, sabemos que existen subniveles de energía dentro de los niveles K, L, M, etc., debido a ligeras diferencias de energía entre sus electrones: el nivel L tiene 3 subniveles, el nivel M tiene cinco y el nivel N tiene siete. Ya que cada subnivel tiene diferente energía, los rayos X relacionados con electrones de estos subniveles varían ligeramente. Estas variaciones son tomadas en cuenta y por ejemplo, los rayos X K son subclasificados en $K\alpha$, $K\beta$ y $K\gamma$.; los rayos X "L" son subdivididos en $L\alpha$, $L\beta$, $L\gamma$ y $L\lambda$.(figura II.12)

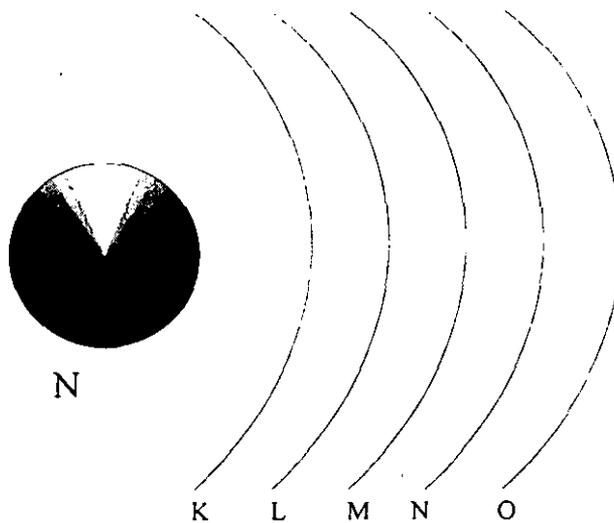


Fig. II.12 Niveles de energía

Microanálisis

Hasta el momento existen cuatro técnicas para realizar el análisis químico en el rango de micras de la muestra en estudio, tanto cuantitativo como cualitativo, de un rango grande de elementos:

La microsonda electrónica.

Espectrometría de electrones Auger.

Espectroscopia de emisión iónica.

Microsonda láser.

La microsonda electrónica mide la intensidad y la longitud de onda de la radiación característica de un elemento, al ser excitado por un haz de electrones. La espectroscopia de electrones Auger recoge y cuenta electrones Auger emitidos dentro de cierta banda de energía características de los átomos del sólido. La espectroscopia de emisión

ionica mide por medio de un espectrometro de masa la razón carga-masa de los iones secundarios emitidos por el sólido al ser exitados por un haz de iones; usualmente son iones de O^+ y O_2^+ . La microsonda láser analiza la emisión en la banda visible de átomos volatizados de la muestra por un rayo láser.

CAPÍTULO III

DESARROLLO EXPERIMENTAL

El proceso experimental utilizado para la preparación de muestras del esmalte es el mismo que se utiliza para la preparación de muestras cerámicas que han de ser observadas en el MET.⁷ En esta sección describiremos los pasos a seguir para su obtención.

III. I Obtención de las muestras a estudiar.

Todos los órganos dentarios fueron obtenidos en la clínica de Exodoncia de la Facultad de Odontología. Estos dientes fueron guardados en recipientes con agua destilada para evitar que se deshidrataran.

Para este estudio se utilizaron dientes de niño, adulto y anciano, en niños se utilizaron los molares temporales, en adultos se utilizaron premolares y en ancianos se utilizaron molares. Se procuró que estos dientes estuvieran libres de caries.

III.II Muestras para Microscopía Electrónica de Barrido

Se cortaron los dientes en forma sagital con una cortadora de diamante (Jean Wirtz), para poder llevar a efecto este paso el diente debe de ser adherido al porta muestras por medio de un material

termoplástico. Una vez que el diente está adherido este será cortado por un disco de diamante, a fin de obtener un segmento de diente con un grosor aproximado de 4 mm.. Una vez obtenido el corte este se lija en una pulidora para obtener una superficie lisa que posteriormente será grabada con ácido fosfórico y finalmente recubierta con carbón en la evaporadora. Se utilizaron los microscopios electrónicos de barrido JEOL-6400 y JEOL-5400 para su observación. El microscopio JEOL-6400 tiene adaptado un detector EDS de la marca NORAN que permite detectar todos los elementos por arriba del carbón.

III.III Muestras para Microscopía Electrónica de Transmisión

Para la preparación de estas muestras se realizaron cortes con el disco de diamante hasta obtener bloques de 0.3 x 0.3 x 0.1 cm, ya con este bloque se inicia el proceso de adelgazamiento (con el fin de reducir el espesor de la muestra), para el cual se utiliza una pulidora cuya función es lijar la muestra y así desgastarla hasta reducirla a un grosor de 60 micras. Una vez obtenida la muestra de 3x 3 x 60 micras de grosor está deberá desgastarse aún más pero únicamente en su centro, creando una concavidad en forma esférica en cuyo centro tendremos un grosor de aproximadamente 6 micras (Dimpler 200, E.A. Fishione). Ya con la muestra en estas condiciones se procede a introducirla en el Ion mill (Dual Ion Mill. Mod. 600. Gatan) para crear por medio de un ataque iónico una pequeña perforación en el centro de la muestra que permita el paso de electrones.

Para el análisis de estas muestras por MET, microscopio JEOL-100CX, completamente analítico que cuenta con un detector EDS, de la marca KEVEX que permite detectar elementos por arriba del Na (nos permite analizar carbón). La microscopía electrónica de alta resolución fue hecha con un microscopio JEOL-4000 ex.

La microscopía óptica de todas las muestras durante su preparación, fue realizada en un microscopio de la marca Zeiss, que cuenta con los aditamentos para realizar observaciones por contraste de campo claro, campo oscuro y contraste diferencial, y nos permite obtener un exacto seguimiento del adelgazamiento de la muestra con mediciones de ± 2 micras de resolución.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

Este capítulo presenta los resultados obtenidos en el estudio del esmalte dental, de acuerdo con el procedimiento experimental descrito en el capítulo III.

IV. I MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB)

Es bien sabido que la MEB nos permite analizar la superficie del esmalte, la cual ésta conformada por prismas, que a su vez están formados por pequeños cristales de tamaño nanométrico, de los cuales su principal constituyente es la hidroxiapatita (capítulo I). Si analizamos estos cristales con una resolución aún mayor, veremos el arreglo atómico de este material. Por lo tanto la MEB nos permite ver que el esmalte esta conformado por prismas que corren desde la unión amelodentinaria hasta la superficie. En la figura IV.1 observamos como estos prismas, además de ir desde la unión amelodentinaria hacia la superficie, siguen un arreglo ondulado. En la figura IV.1A, se aprecia una vista general del esmalte dental. Así mismo, se han colocado dos pequeños recuadros señalados por las letras *b* y *c* mismos que corresponden a los incisos *B* y *C* de la figura. En el inciso *B* se muestran los prismas en forma longitudinal, mientras que en el inciso *C* se muestran los prismas desde una vista transversal. En esta figura también observamos que los prismas

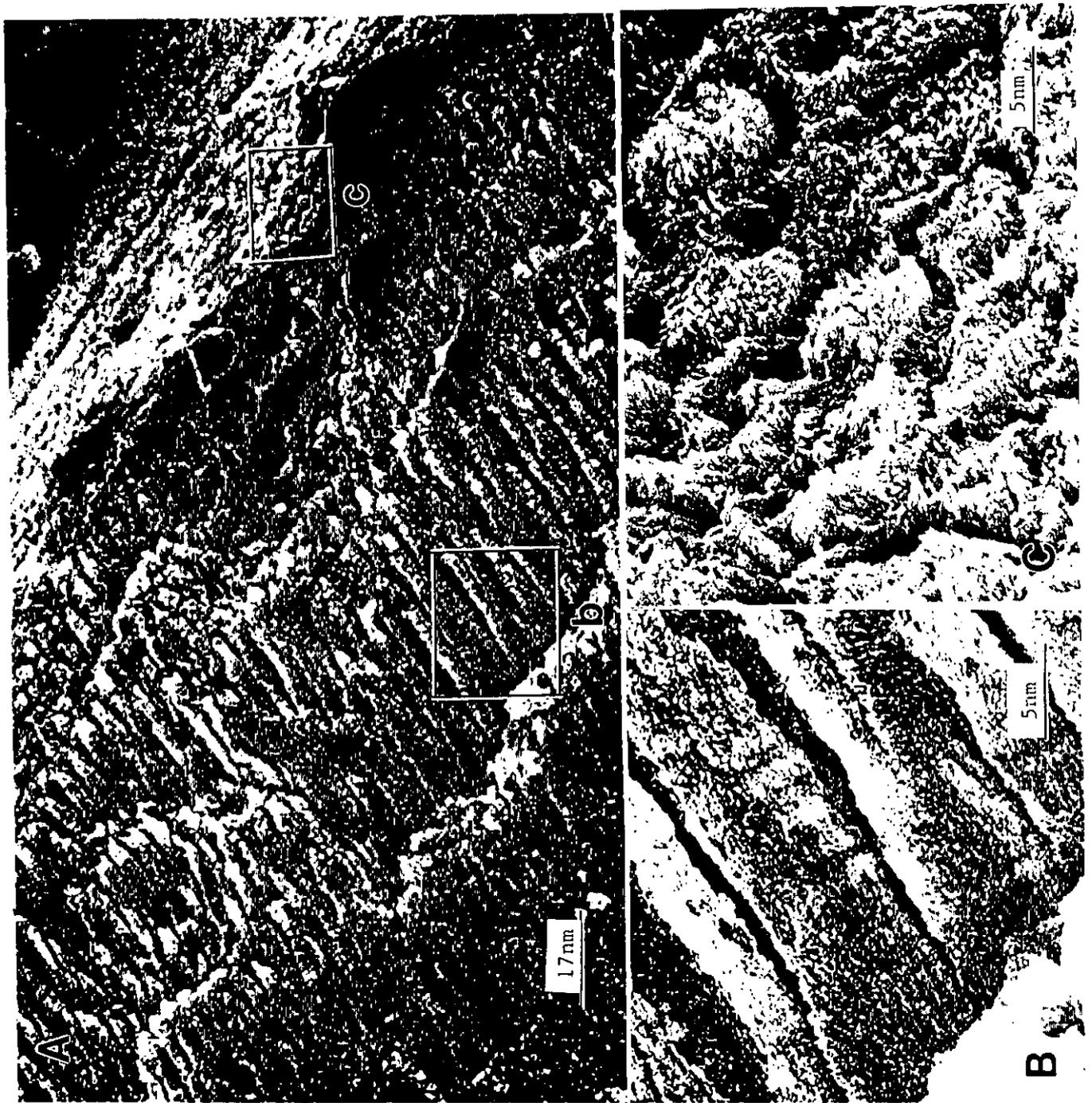


Fig. IV.1. Esmalte dental humano tal y como se observa con el MEB. A) Vista general donde se observan los prismas que conforman el esmalte. B) Amplificación del recuadro "b" mostrado en (A). C) Amplificación del recuadro "c" mostrado en (A).

tienen una sección transversal aproximada de 3 o 4 micras. Si amplificamos aún más obtenemos el recuadro *C*, donde observamos que estos pequeños prismas están conformados de cristales aún más pequeños, los cuales, en sección longitudinal, están alargados y siguen la dirección de los prismas. En el inciso *D* se muestra que los cristales tienen una sección transversal de aproximadamente 90 nanómetros.

IV. II MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (MET)

En la figura IV.2 los incisos *A* y *B* corresponden a imágenes obtenidas con el MEB, mientras que los incisos *C* y *D* corresponden al MET. Esto nos permite hablar del tipo de contraste que observamos en ambos tipos de microscopios electrónicos. En el inciso *A* y *B* observamos la topología del esmalte dental; las imágenes *A* y *D* fueron tomadas con electrones secundarios. En el inciso *C* observamos los cristales que conforman los prismas, en una muestra que permite que el haz electrónico la atraviese. Aquí estamos observando el llamado contraste por amplitud; éste se forma utilizando uno de los haces del patrón de difracción. Si utilizamos únicamente el haz transmitido, eliminando los demás haces, a esto se le denomina campo claro; en caso que utilicemos uno de los haces difractados y despreciemos los demás, obtendremos la imagen de campo oscuro. Las imágenes mostradas en los incisos *C* y *D* son imágenes de campo claro. En el inciso *D* tenemos lo que se conoce como contraste por amplitud: Los cristales que están difractando se muestran en oscuro, mientras que

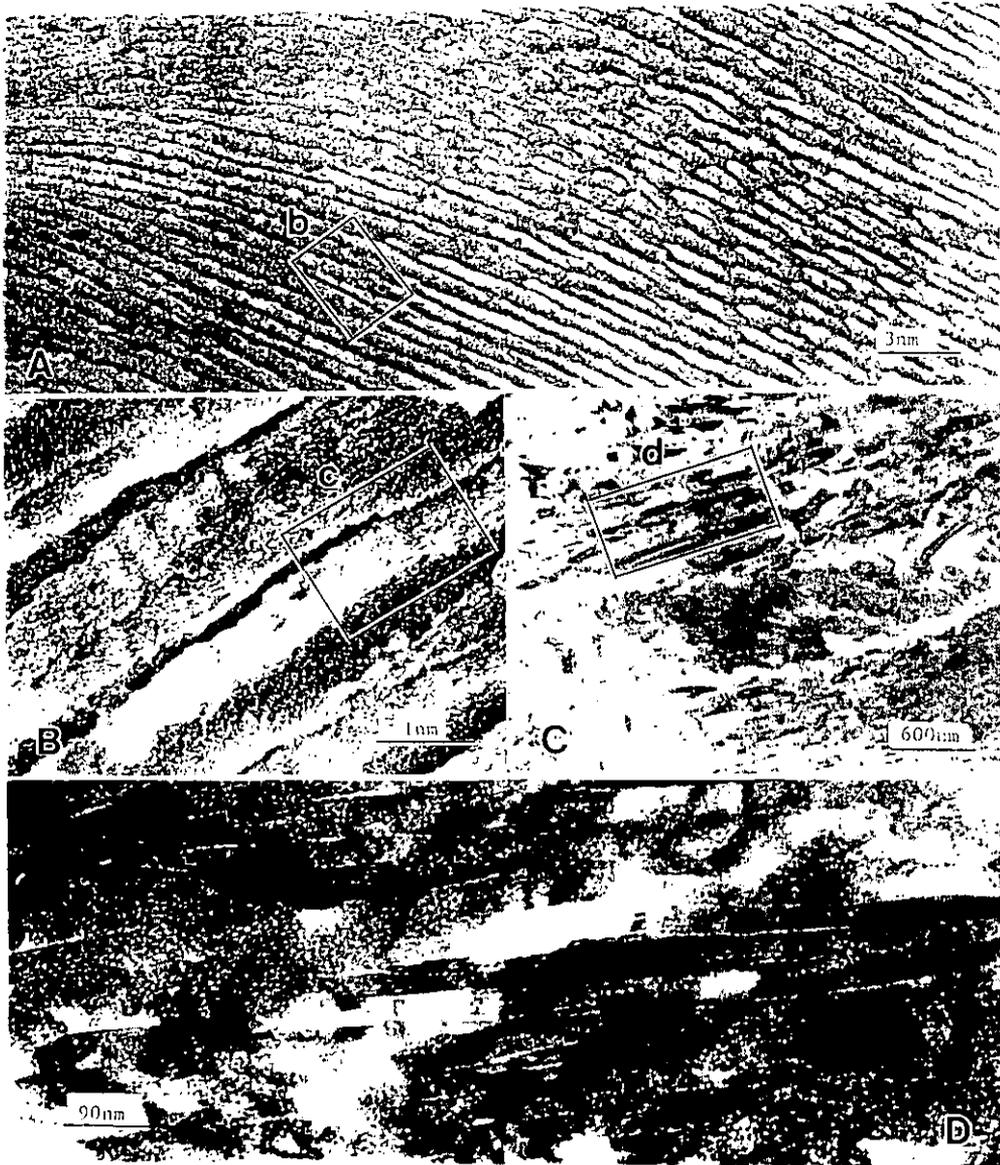


Fig. IV. 2. Imágenes de MEB (incisos A y B) y de MET (incisos C y D) del esmalte dental humano. En (B) se muestra una amplificación del recuadro "b" mostrado en (A), en (C) se muestra una amplificación del recuadro "c" mostrado en (B), en (D) se muestra la amplificación del recuadro mostrado en (C). Estas imágenes corresponden a la observación del esmalte en sección longitudinal.

el contraste de los cristales que difractan débilmente se muestran en claro. Lo contrario es lo que observaríamos en una fotografía de campo oscuro. Obsérvese que si analizamos el contraste mostrado por un cristal en el inciso *D* de la figura 2, es decir, un cristal elongado, este cambia: en unas zonas se muestra claro y en otras oscuro; es decir este cristal presenta regiones que difractan fuertemente y regiones que difractan débilmente, ésta diferencia será analizada posteriormente con mayor profundidad.

IV. III MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN DE ALTA RESOLUCIÓN

La figura IV.3 nos permite ver a mayor amplificación los cristales del esmalte dental en sección longitudinal. En el inciso *A* vemos una imagen de MEB en la que nuevamente observamos los prismas en sección longitudinal; pero además de esto vemos en esta figura que los prismas están formados por pequeños filamentos, que asemejan una madeja de hilos. En el inciso *B* vemos que estos pequeños hilos, no son más que los cristales que nos interesa analizar. Esta imagen corresponde al campo oscuro en MET.

De igual manera que en anteriores figuras, en la figura IV.3A y *B* hemos marcado los recuadros *b* y *c* que corresponden a los incisos *B* y *C*. En la imagen IV.3B vemos los cristales alargados;

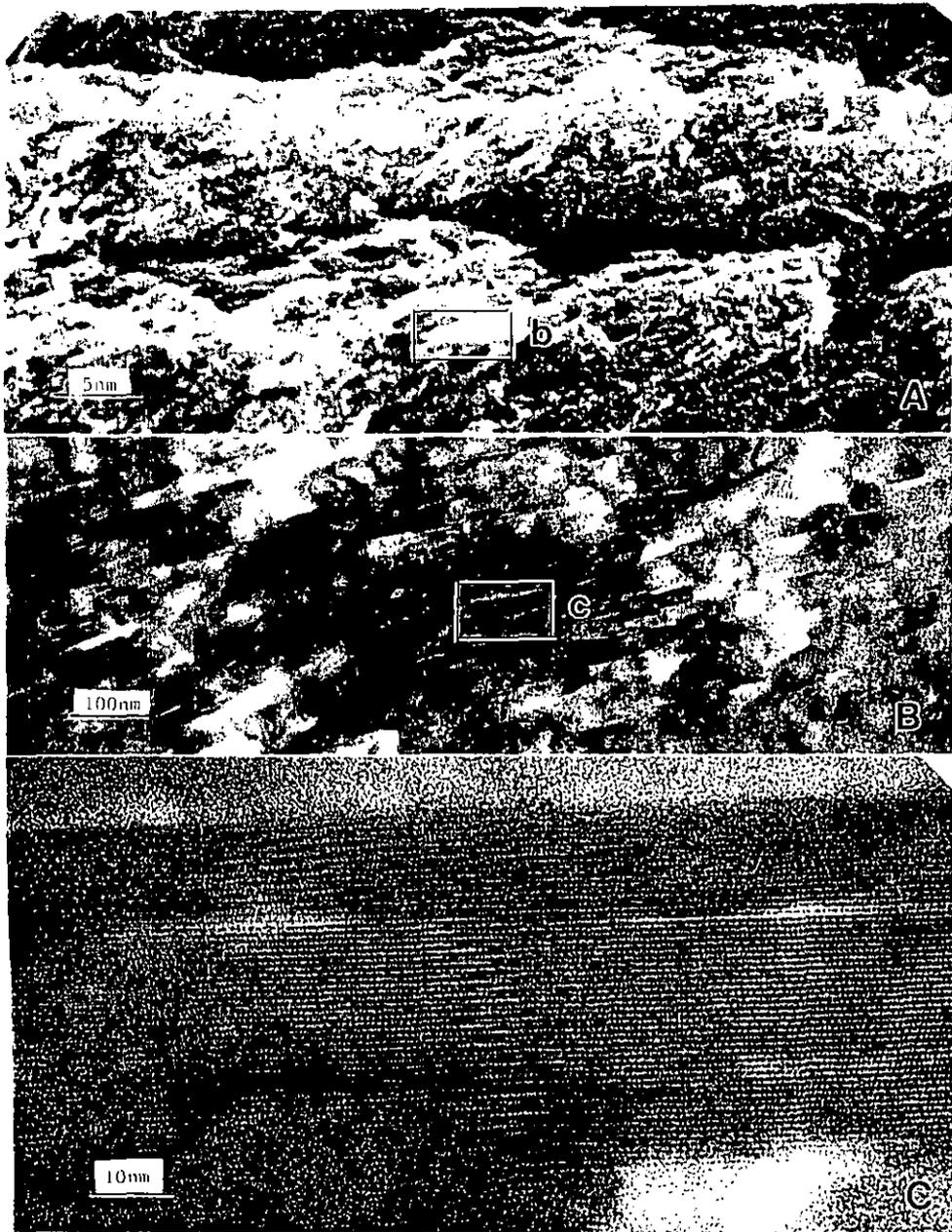


Fig IV.3. Imágenes del esmalte dental humano al ser observado por MEB (inciso A), MET (inciso B) y MET de alta resolución (inciso C). En (B) se muestra una ampliación del recuadro "b" mostrado en (A), y en (C) se muestra una ampliación del recuadro "c" mostrado en (B). Las líneas que se perciben en (C) corresponden a las distancias atómicas de la hidroxiapatita (2.8\AA).

nótese que en la sección media de los cristales se presenta una línea oscura y que se ha marcado con una flecha. Esta línea pasa aproximadamente por el centro del cristal del esmalte y es muy importante en la caracterización del esmalte en el nivel estructural; se conoce con el nombre de línea oscura, de la cual hablaremos más adelante. En el inciso C observamos la imagen con características a nivel nanométrico; es decir, se tomó uno de los cristales que se observan en el inciso B y se aumentó a una resolución casi atómica. La importancia de esta imagen radica en que se muestra la periodicidad de los átomos dentro de los cristales, es decir tenemos un arreglo cristalino que va de un punto a otro sin perder periodicidad, salvo un defecto que se observa en el centro mismo, y el cual se identifica fácilmente ya que representa un cambio en el contraste de la imagen.

Por lo tanto podemos decir que el prisma dental está formado por cristales de hidroxiapatita (capítulo II) que en sección transversal son altamente irregulares y están ordenados al azar, mientras que en sección longitudinal se muestran alargados siguiendo la dirección del prisma en una forma muy ordenada, es decir, tenemos un arreglo tal que los pequeños cristales siguen una dirección que, en una burda analogía, parecería la corriente de un río. Resumiendo, cuando el esmalte dental se observa por MET nos percatamos de que los prismas están formados por muchos cristales que se muestran elongados en secciones longitudinales y completamente irregular sin presentar un arreglo hexagonal en secciones transversales. (figura IV.4)

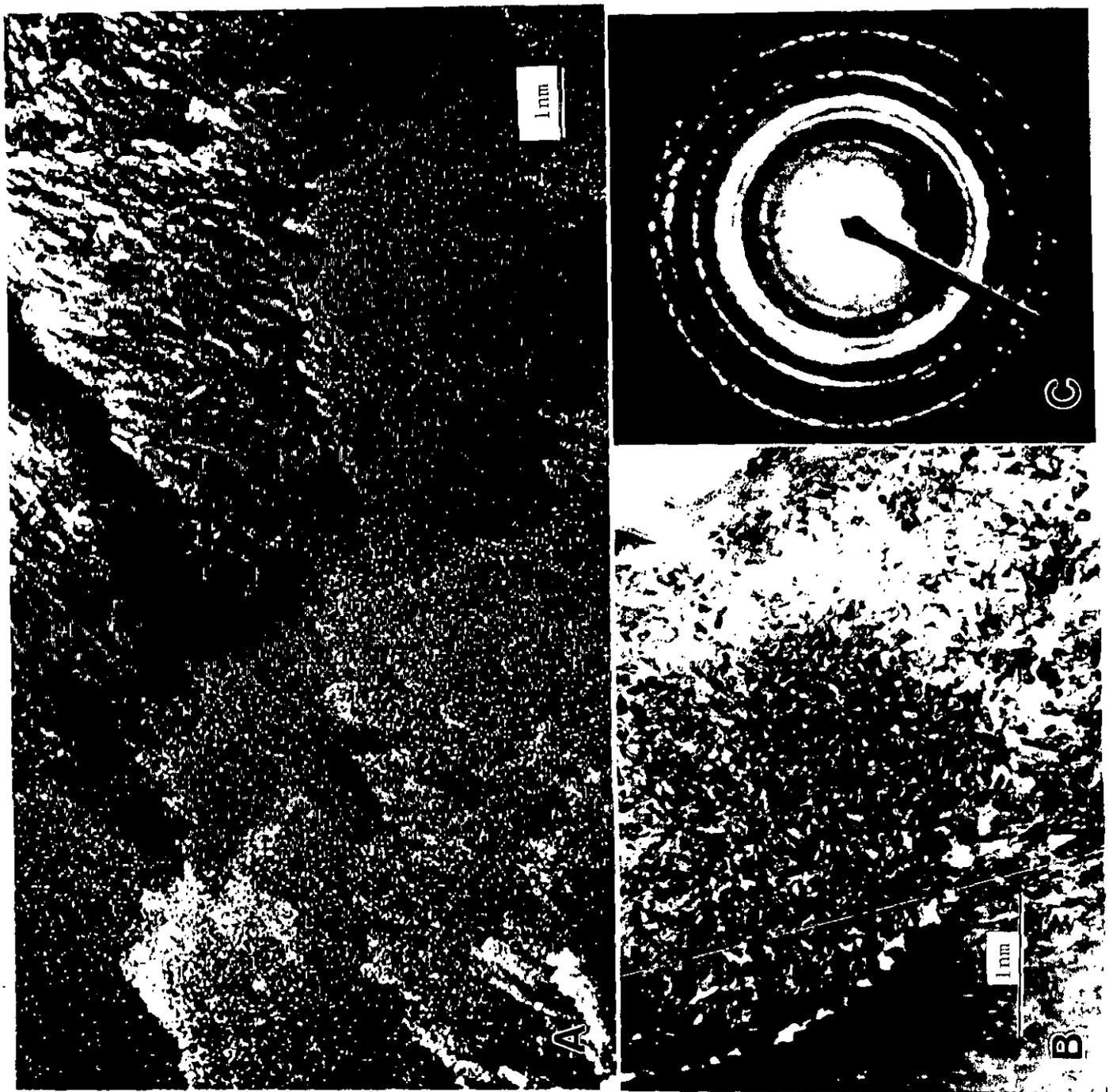


Fig IV.4. Imágenes del esmalte dental humano al ser observado en sección transversal por MEB (inciso A) y por MET (inciso B). En (C) se presenta al patrón de difracción de la imagen mostrada en (B). Observese que este patrón de difracción consiste de anillos concéntricos producidos por el arreglo policristalino que presenta (B). La imagen en (B) corresponde a sólo una parte de uno de los granos mostrados en (A).

IV. IV DIFRACCIÓN ELECTRÓNICA

La figura IV.4 muestra a los prismas en secciones transversales; el inciso A corresponde al MEB y observamos nuevamente que los prismas están conformados por pequeños "hilos". Si preparamos una muestra de esmalte dental para MET observamos que estas estructuras -que parecen algodón-, se muestran altamente granulados tal como se observa en la figura IV.4. Por lo tanto, los granos que se observan en la imagen IV. 4A están conformados por cristales, lo cual se confirma por el patrón de difracción que se muestra en la figura IV.4C. Indexando la figura IV.4C se observa que el anillo más intenso corresponde al plano que difracta más fuertemente y el cual identifica al plano (211) de la estructura de la hidroxiapatita (capítulo II). Nótese también la regularidad que presentan los anillos en el patrón de difracción: son anillos totalmente concéntricos. Esto indica que el esmalte de esta figura es completamente aleatorio y policristalino . Aquí se observa que el anillo (211) esta acompañado por los anillos (102), (110), (310), (112), entre otros. Es importante resaltar aquí que si se toma un patrón de difracción en la sección transversal obtendremos anillos concéntricos muy bien definidos tal como se muestra en la imagen IV.4C.

La indexación de los anillos de este patrón de difracción se muestra en la Tabla II. Ahí se muestra la columna de las distancias (a) así como sus respectivos índices de Miller (h,k,l).

En la figura IV.5 se observa una ampliación de la figura IV.4b. En

ésta observamos que el esmalte es irregular, y, al momento de amplificar más el recuadro *b* se presenta el contraste observado en el inciso *B*. En esta imagen, hemos colocado de igual manera el recuadro *c* que muestra un arreglo de líneas con una periodicidad de 8 amstrongs. A medida que amplificamos el recuadro *c* mostrado en la imagen *B* obtenemos la imagen del inciso *c* la cual muestra pequeñas bolitas blancas que representan las posiciones atómicas en el esmalte dental. Obsérvese la periodicidad y la regularidad de los cristales formados principalmente por hidroxiapatita (capítulo II).

R (cm)	d (Amstrongs)	(hkl)
2.2	2.814	211
1.95	3.17	102
1.45	4.269	110
2.425	2.55	310
2.33	270	112

Tabla II

Indexación del patrón de difracción mostrado en la figura IV.4c. "R" es la distancia medida del patrón, "d" en su correspondiente distancia interplanar, y (hkl) sus respectivos índices de Miller.

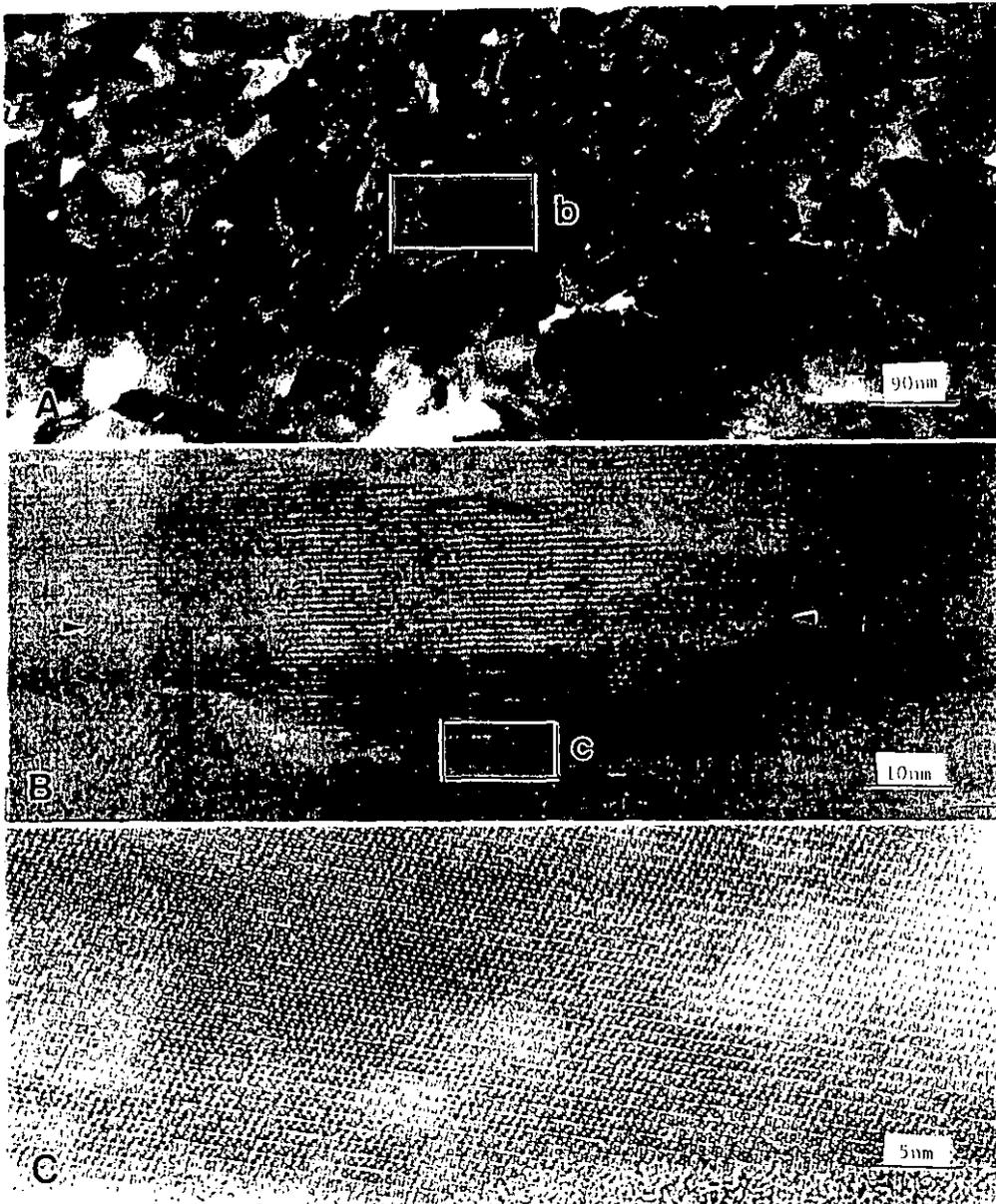


Fig. IV.5. Imágenes de MET (inciso A) y de MET de alta resolución (incisos B y C) del esmalte dental humano y que corresponde a mayores ampliaciones de la imagen mostrada en la figura IV.4 B . En (B) se observa una ampliación del recuadro "b" mostrado en (A) y en (C) una ampliación del recuadro "c" mostrada en (B). Obsérvese en (B) la presentación de una línea (marcada con los códigos de flecha) que cruza al cristal por la parte central (ver texto).

IV. V LÍNEA OBSCURA

La línea obscura observada en la figura IV.5B (marcada con las flechas) corresponde a un contraste de fase; es decir es un contraste que depende del foco: cuando se observa la estructura en foco esta línea desaparece, por eso la imagen IV.5B se observa borrosa. Por lo tanto, para poder observar esta línea tenemos que desenfocar y es entonces cuando se observara obscura. Contrariamente, si sobreenfocamos esta línea se verá blanca; de aquí que esta línea obscura bien pudiera nombrarse como blanca u obscura dependiendo del foco. Esta línea desempeña un papel muy importante en el esmalte dental. Algunos autores se han dado a la tarea de encontrar su función sin resultado aún ^{21,23,24,25}.

Si tomamos un proceso de disolución, como el que se presenta en la caries dental, observamos que este se inicia precisamente a lo largo de la línea obscura, pero también se ha demostrado que la línea obscura no es un signo de que el esmalte muestre un proceso carioso.²⁶ Esta línea se ha observado en fetos, y no sólo en el esmalte dental humano, sino que también se encuentra presente en el esmalte dental de serpientes, cerdos, tiburones y ratones. ^{27,28} El significado de esta línea aún es desconocido, sin embargo se cree que pueda corresponder a un material distinto a la hidroxiapatita que se presenta durante el proceso de nucleación del esmalte. Esto quiere decir que la hidroxiapatita comienza su nucleación alrededor de esta línea dándole cuerpo al esmalte dental.^{29,30,31}

En la figura IV. 6 se ha marcado con flechas la presencia de la línea obscura en varios cristales. El inciso *B* muestra a los cristales en sección longitudinal, y la línea obscura corre por el centro de los mismos; por lo tanto, podemos deducir, que la línea obscura no es una línea sino que, en realidad, corresponde a un plano ya que se observa en secciones tanto transversales como longitudinales; además debe tener características muy especiales para que se desarrolle el esmalte dental.

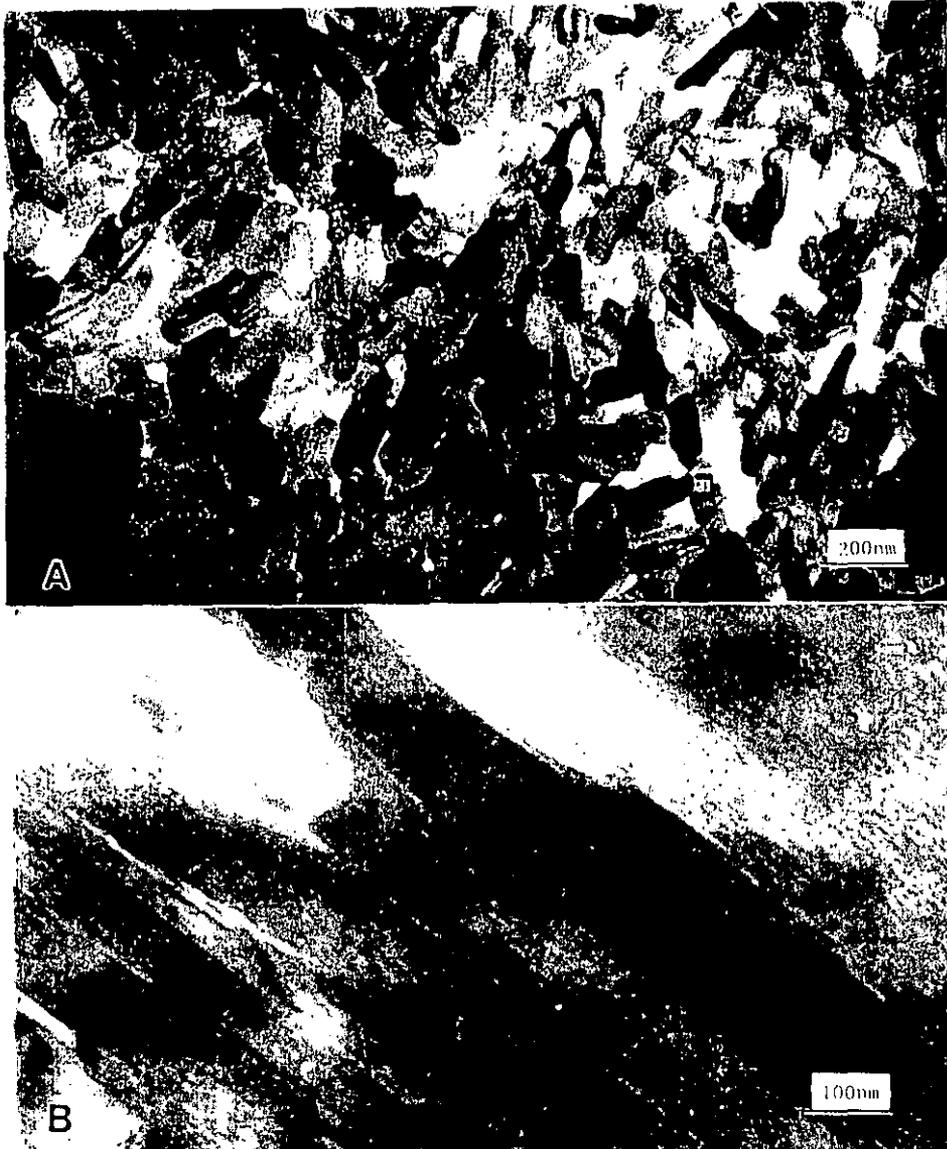


Fig. IV.6. Imágenes de MET del esmalte dental humano al ser observado en sección transversal (inciso A) y en sección longitudinal (inciso B). Nótese que en ambas imágenes existe una línea que cruza a la mayoría de los cristales por su parte central. Esta es la llamada "línea oscura" y que corresponde en realidad a un plano (ver texto).

IV. VI MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DEL ESMALTE EN SECCIÓN LONGITUDINAL

En la figura IV.7 observamos una imagen de MET en sección longitudinal. Aquí podemos observar que los cristales están elongados, además de presentar contraste de tipo Moiré. Hay que recordar que los contrastes de Moiré se producen cuando dos cristales se superponen y uno está girado sobre el otro o presentan diferentes distancias interplanares. Estos contrastes son muy importantes en la microscopía electrónica ya que se presentan diferentes tipos de imágenes y es una forma de analizar materiales con aparatos que no cuentan con una resolución en el nivel atómico. En esta imagen podemos decir que se superponen uno o más cristales y si pudiéramos hacer una imagen de alta resolución observaríamos que los cristales estarían ondulados ya que el patrón de Moiré se presenta ondulado o se presentan algunos defectos como se indica con la flecha. Otra característica observable en las muestras de esmalte dental en sección longitudinal es que el patrón de difracción ya no presenta patrones concéntricos, sino que ahora es un patrón formado por arcos tal y como se muestra en el recuadro de la figura IV.7. De aquí podríamos definir dos tipos de direcciones: uno que sería paralelo dirección Pp en la figura IV.10 y otro que es perpendicular dirección Pt en la figura IV.10 a los arcos mostrados. También podemos ver que los arcos no tienen la misma distancia en una dirección que en la otra. Esto es muy importante para estudiar la estructura. Este tipo de patrones de difracción

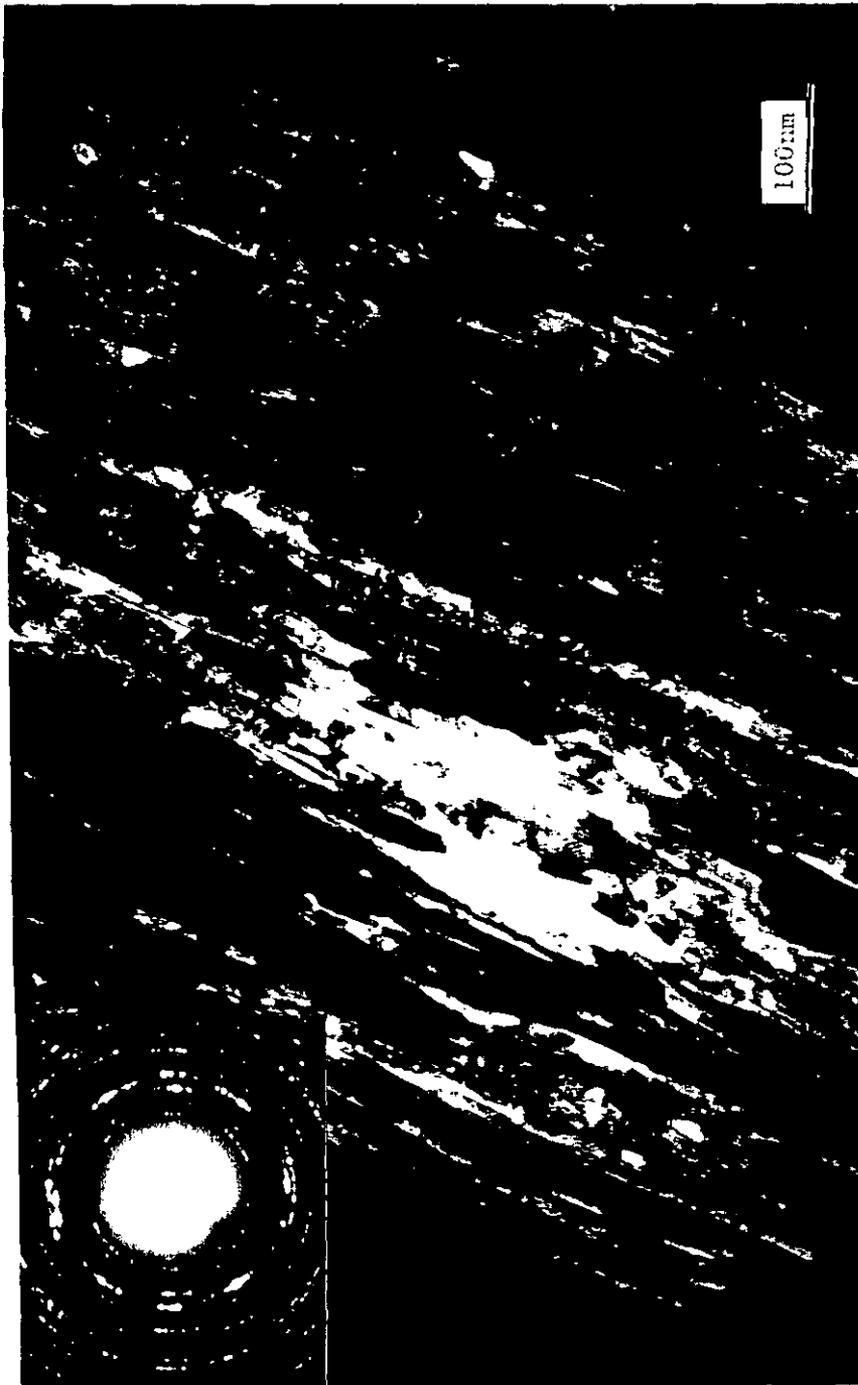


Fig. IV.7 Cristales del esmalte dental humano observados en sección longitudinal por MET. El recuadro presenta su correspondiente patrón de difracción. Obsérvese la presencia del contraste "Moire" en varias partes de la imagen.

corresponde a muestras altamente texturizadas formadas por agregados policristalinos con una orientación preferencial. Es claro pensar que en el esmalte dental hay una dirección preferencial, ya que los cristales crecen en la dirección definida por la unión amelodentinaria hacia la superficie del diente. En espacio recíproco (el espacio del patrón de difracción), los arcos son producidos cuando la esfera de Ewald corta la red recíproca, no es un sólo plano, sino que corta más de uno en una dirección determinada. Los arcos coinciden con los anillos concéntricos del patrón de difracción original mostrado en secciones transversales. Como existe un eje preferencial en el esmalte dental humano siempre vamos a observar este tipo de arcos; es decir, los arcos son el producto del arreglo prismático del esmalte dental. Por lo tanto tenemos un material altamente texturizado en la dirección longitudinal del esmalte dental humano.

En la figura IV.8 se muestra un tipo particular de difracción electrónica. Si comparamos el patrón de difracción de la figura IV.8 que proviene de la zona marcada en el recuadro *b*, obtenemos un patrón de puntos que están muy bien definidos; en este caso el patrón de difracción ya no proviene de muchos cristales como el mostrado en el recuadro de la figura IV.7, sino de uno sólo y nos muestra la dirección [100] del esmalte dental. Por lo tanto el esmalte puede ser analizado por patrones de difracción monocristalinos o policristalinos. En este trabajo observaremos los patrones policristalinos ya que nos permiten estudiar de un modo más general la organización de los cristales en los prismas del esmalte. Esto no sería posible si únicamente

tomáramos patrones monocristalinos ya que tendríamos direcciones muy bien definidas que no nos darían información acerca de la relación existente entre este cristal y los cristales circunvecinos.



Fig. IV.8 Imágenes de MET de los cristales del esmalte dental humano en sección longitudinal. El recuadro muestra el patrón de difracción de un solo cristal: aquel mostrado en el recuadro "b" de la imagen. Nótese la diferencia entre este tipo de patrón de difracción y aquel mostrado de figura IV.7 (ver texto).

La figura IV.9 muestra una imagen de campo claro en su inciso *A* y una imagen campo oscuro en el inciso *B*. En el inciso *A* observamos cristales alargados y secciones en las que se presentan patrones de Moiré; en el inciso *B* observamos la imagen de campo oscuro, y vemos que un cristal que en el inciso *A* se ve alargado en el *B* aunque se muestra también alargado, en vez de tener un contraste completamente iluminado, únicamente se ven secciones iluminadas y secciones que no lo están. Este contraste es importante en la interpretación de la estructura en sección longitudinal. Por lo tanto comparando imágenes en campo claro y oscuro es importante recalcar que aquellos cristales que se muestran elongados en campo claro no se observan igual en campo oscuro, sino que están formado por varios "subgranos" tal como se observa en la figura IV.9 *B*. A partir de estas imágenes se pueden obtener ciertas medidas; el esmalte dental de niño presenta, en una imagen de campo claro, un tamaño de grano en su diámetro transversal de aproximadamente 29.7 nm, mientras que en sección longitudinal presenta un tamaño promedio de 300 nm, en el caso del adulto tenemos un diámetro en sección transversal de 51.4 nm, mientras que en sección longitudinal presenta 600 nm. En ancianos tenemos un diámetro en sección transversal de 58.4 nm, mientras que en sección longitudinal tenemos una distancia de 800 nm.

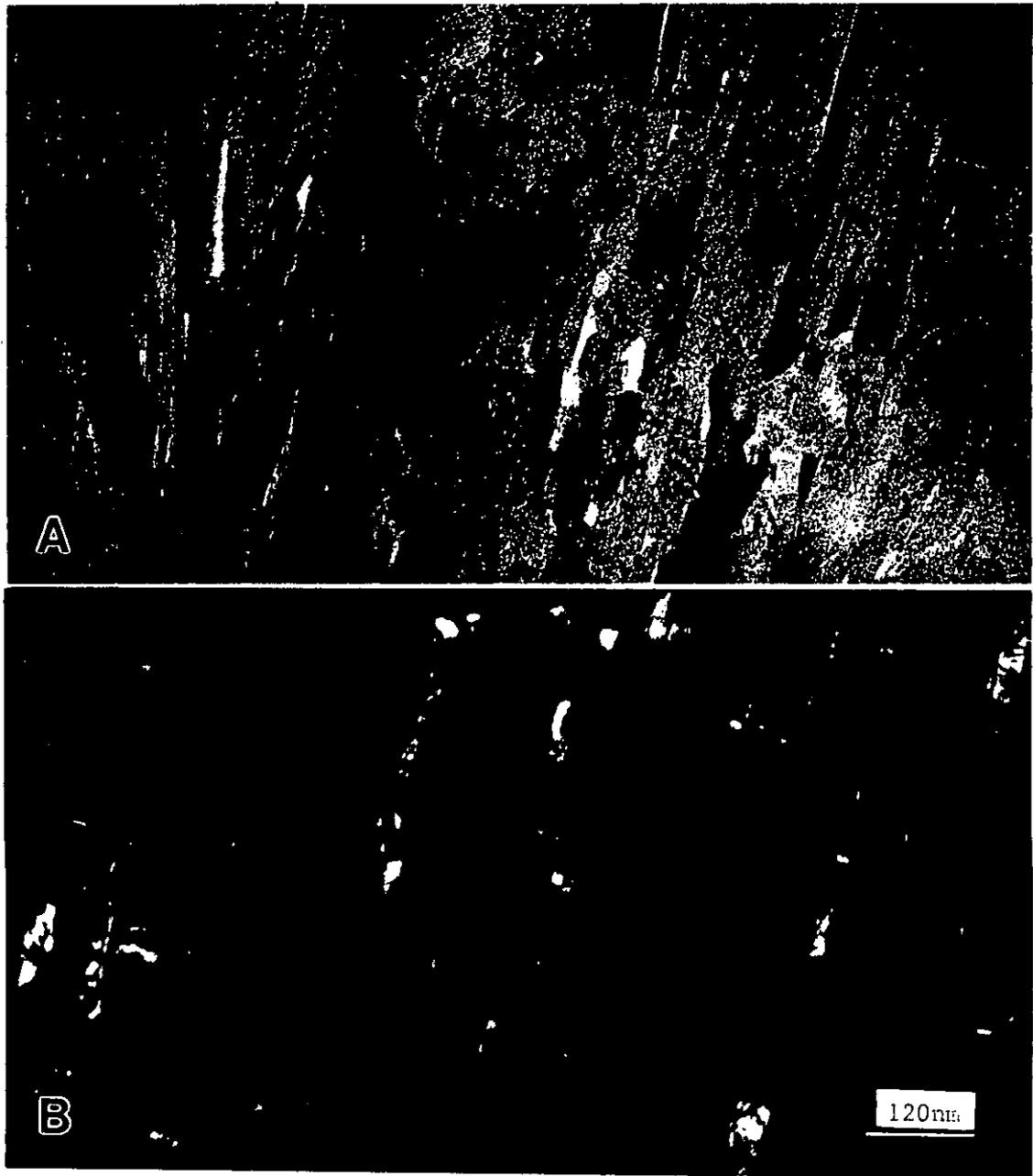


Fig. IV.9 Imágenes de MET del esmalte dental humano en campo claro (inciso A) y en campo oscuro (inciso B) en dirección longitudinal. Nótese que en el inciso (B) los cristales no se iluminan completamente sino por partes (ver texto).

La figura IV.10 presenta el patrón de difracción de área selecta del esmalte dental de niño en su inciso *A*, el esmalte dental de adulto en el inciso *B* y el esmalte dental de anciano en el inciso *C*; esta figura corresponde a una sección longitudinal, mientras que los patrones de la figura IV.11 fueron tomados en sección transversal. En sección transversal el patrón de difracción consiste de anillos concéntricos.

La figura IV.11 muestra el patrón de difracción de área selecta del esmalte dental en sección transversal, el cual está formado de anillos concéntricos. El inciso *A* corresponde a una apertura de área selecta más grande que la usada en el inciso *B*. Aquí podemos observar que en el inciso *B* el número de anillos ha disminuido considerablemente, pero sin embargo siguen siendo los mismos que se observan en el inciso *A*. La importancia de tomar la imagen con una apertura más pequeña es que nos permite estudiar distancias interplanares que se esconden fácilmente por la intensidad del haz transmitido como se observa en el inciso *A*. En este caso sólo se muestra una sola figura, pues las muestras del esmalte dental en la sección transversal del niño, adulto o anciano, no presentan ninguna diferencia y por lo tanto sólo mostraremos la figura IV.11. Si se indexa este patrón no tendremos ningún problema en encontrar los anillos que pertenecen al plano (211), que es el más intenso. En la tabla III se muestra la indexación de éste y los demás patrones de difracción analizados en este capítulo.

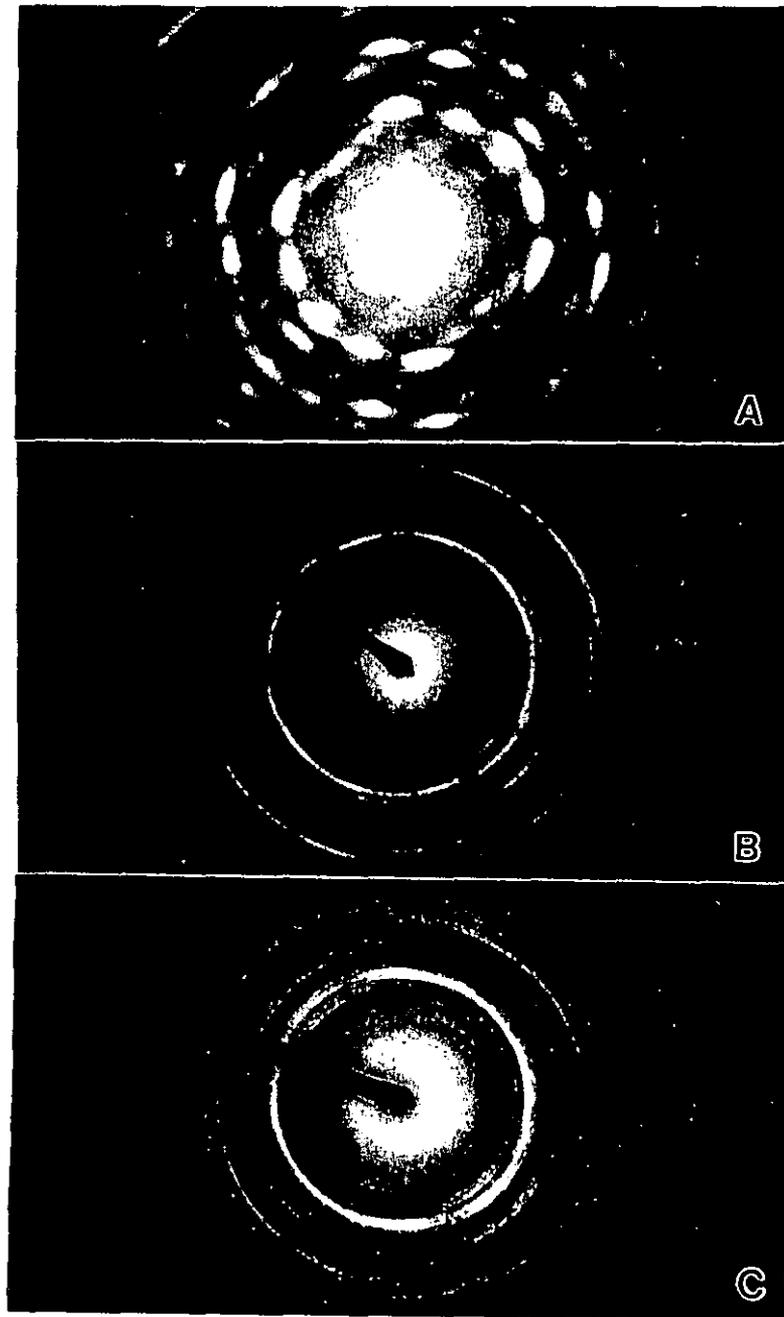


Fig. IV.10 Patrones de difracción del esmalte dental humano en sección longitudinal correspondiente a: A) niño, B) adulto, C) anciano. Nótese que estos patrones presentan arcos, característicos de estructuras texturizados, y no anillos, concéntricos, característicos de estructuras equiaxiales (ver texto, sección IV.VI). Nótese además la diferencia entre (A) con (B) y (C).

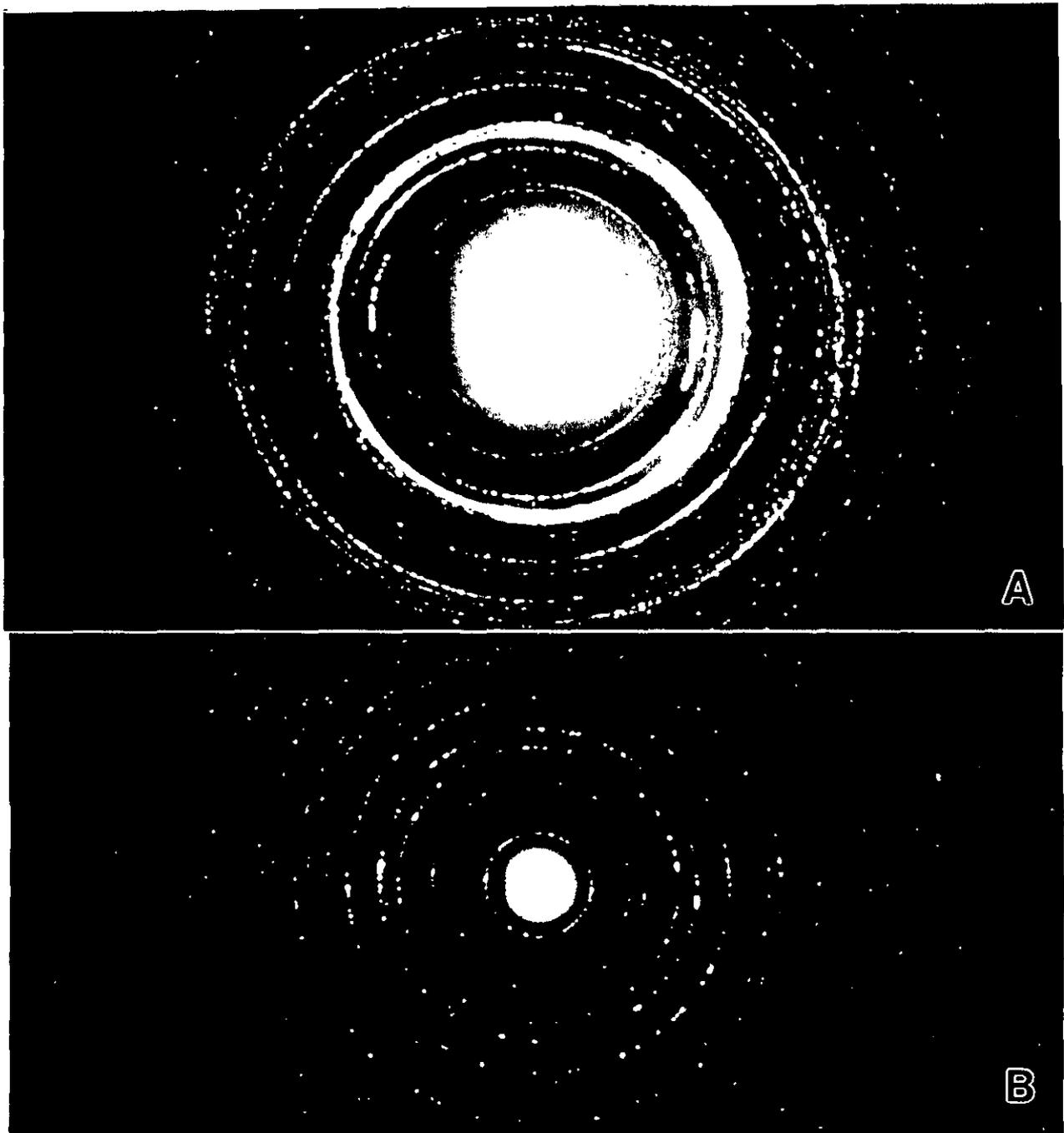


Fig. IV.11. Patrones de difracción del esmalte dental humano en sección transversal. A) sin apertura de área selecta y B) con apertura de área selecta. Obsérvese la difracción de éstos con los mostrados en la figura IV.10

TABLA III

Cuadro indexación del patrón de la figura IV.11a

R (cm)	d (Å)	(hkl)
3.125	2.814	211
1.1	7.99	100
1.625	5.41	101
2.125	4.138	200
2.55	3.45	002
2.85	3.085	210
3.25	2.71	112
3.875	2.27	212

Cuadro Indexación del patrón de la figura IV.11b

R (cm)	d (Å)	(hkl)
0.825	8.17	100
1.45	4.65	110
1.675	4.02	200
2.2	3.06	210
2.5	2.696	300
3.0	2.25	310

La figura IV. 10 es interesante porque los cambios entre los 3 tipos de esmalte son más claros. En el inciso A se aprecia que el patrón de difracción del esmalte de niño presenta un arreglo mucho más pronunciado que en los otros dos casos, por eso es que se ven puntos alargados; de hecho se puede decir que existe una "periodicidad" a lo

largo de la línea perpendicular de 7 Å. Como se deduce de este resultado, tenemos que el esmalte del niño es más ordenado que para el adulto y anciano. Nuevamente vemos en los 3 casos los arcos característicos de estructuras texturizadas que se deben a los cristales elongados en la sección longitudinal (véase la sección IV.VI). Aquí se observan "anillos" que debido a los arcos se produce un efecto de elipsidad. En el caso del esmalte adulto, tenemos que el patrón de difracción presenta arcos bien definidos, y en el del anciano no se ven tan claramente definidos. Por lo tanto tenemos una estructura texturizada con mayor definición, en el caso de adulto que en el del anciano.

En estas imágenes se pueden definir dos direcciones completamente arbitrarias, de acuerdo a la "elipsidad": una "Pp" paralela, y otra "Pt" transversal. En los cuadros del I al IV de la Tabla IV se muestra la indexación de estos patrones de acuerdo a estas direcciones. En conclusión, el esmalte dental de niño en sección longitudinal es altamente ordenado, y cuando llega a adulto se tiene un esmalte menos ordenado, altamente texturizado y con variaciones en la dirección de crecimiento. En el de anciano se puede hablar de una indefinición en la dirección de elongación.

TABLA IV. Indexaciones de los patrones de difracción de la figura IV.10.

Cuadro III. Indexación de la dirección Pp de la figura. IV.10A

R (cm)	d (Å)	(hkl)
2.35	2.814	211
2.05	3.22	102
1.55	4.266	200
2.825	2.34	212
3.4	1.945	222
3.6	1.837	213
4.1	1.613	313

Cuadro II. Indexación de la dirección Pt de la figura IV10A.

R (cm)	d (Å)	(hkl)
0.95	6.96	[c]
1.875	3.527	201
2.325	2.84	211
2.9	2.28	212
3.75	1.76	402

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Cuadro III. Indexación de la dirección Pp de la figura IV.10B

R (cm)	d (Å)	(hkl)
2.425	2.814	211
1.275	5.35	101
2.125	3.21	102
2.575	2.65	202
3.675	1.86	312

Cuadro IV. Indexación de la dirección Pt de la figura IV.10B.

R (cm)	d (Å)	(hkl)
0.825	8.27	100
1.65	4.13	200
2.175	3.137	102
2.475	2.757	112
2.975	2.29	212
3.775	1.81	321

Cuadro V. Indexación de la dirección Pp de la figura IV.10C.

R (cm)	d (Å)	(hkl)
2.3	2.814	211
1.45	4.46	110
1.65	3.92	111
1.85	3.498	201
2.075	3.12	102
2.85	2.27	310
3.0	2.157	311
3.325	1.946	222

Cuadro VI. Indexación de la dirección Pt de la figura IV.10C.

R (cm)	d (Å)	(hkl)
1.6	4.045	200
2.1	3.08	210
2.4	2.696	300
2.85	2.27	310
3.6	1.797	321

IV.VII. Contraste de los cristales del EDH.

Un hallazgo interesante de la figuras en sección longitudinal, observado tanto en campo claro como obscuro es la presencia de diferente contraste a lo largo del cristal de hidroxiapatita.

En todas las figuras (por ejemplo, véase la figura IV.9) se ha observado que los cristales en sección longitudinal observados en campo claro y campo obscuro se presentan diferentes contrastes. Algunos autores han interpretado el contraste del campo obscuro suponiendo que cada cristal está formado por el apilamiento de cristalitos. Es decir, se dice que el esmalte en dirección longitudinal, está formado por un cristalito al que se le pega otro cristalito y así sucesivamente, y esta sería la razón de que se observe un cristal claro, uno obscuro, uno claro, etc. De acuerdo con nuestros resultados, esto no es así, y lo podemos comprobar con una serie de imágenes de alta resolución.

En la figura IV.12 observamos una imagen de microscopía electrónica de alta resolución de un cristal elongado, en la que el cristalito muestra regiones en donde el contraste cambia. Como ya se comentó anteriormente, esta imagen muestra posiciones atómicas. Si vemos con detenimiento la figura IV.12, vemos zonas en las que se ve un contraste, luego cambia a otro y así sucesivamente. Si sólo analizamos el contraste podríamos decir que los autores antes mencionados estaban en lo correcto, y que el esmalte en sección longitudinal está formado por varios "subgranos" que van rotando a lo largo del cristal, pues vemos un tipo de contraste y luego otro.

Para comprobar esto, tomamos patrones de difracción: colocamos la imagen en un banco óptico, donde el láser es la fuente de iluminación. Así, tomando la figura IV.12 como rejilla de difracción y registramos los patrones de difracción producidos en cada sección marcada tal y como se muestra en la figura IV.13. Con el área marcada con el número 1, obtendremos el patrón de difracción que se observa con el número 1, luego el 2 en otra región y así sucesivamente. Esta imagen muestra que a lo largo de todo el cristal no tenemos un cristal que se pega a otro, sino sólo un cristal con variaciones de intensidad en los patrones de difracción; es decir, tenemos solo el patrón de difracción electrónico a lo largo del eje [021], (el cual se muestra arriba a la derecha) y vemos su forma. Aquí se ve el hexágono formado por los puntos intensos. Si lo comparamos con los demás veremos que todos tienen casi el mismo

arreglo geométrico del patrón de difracción original, concluyendo así que el cristal en sección longitudinal no está formado por varios cristales sino por uno sólo, que está en una dirección y se producen diferentes intensidades porque está curvado. Si tomamos un cristal curvado tendremos secciones que se iluminan y secciones que no, tal y como se obtienen en las imágenes de campo oscuro del esmalte dental humano en sección longitudinal. (figura IV.9).

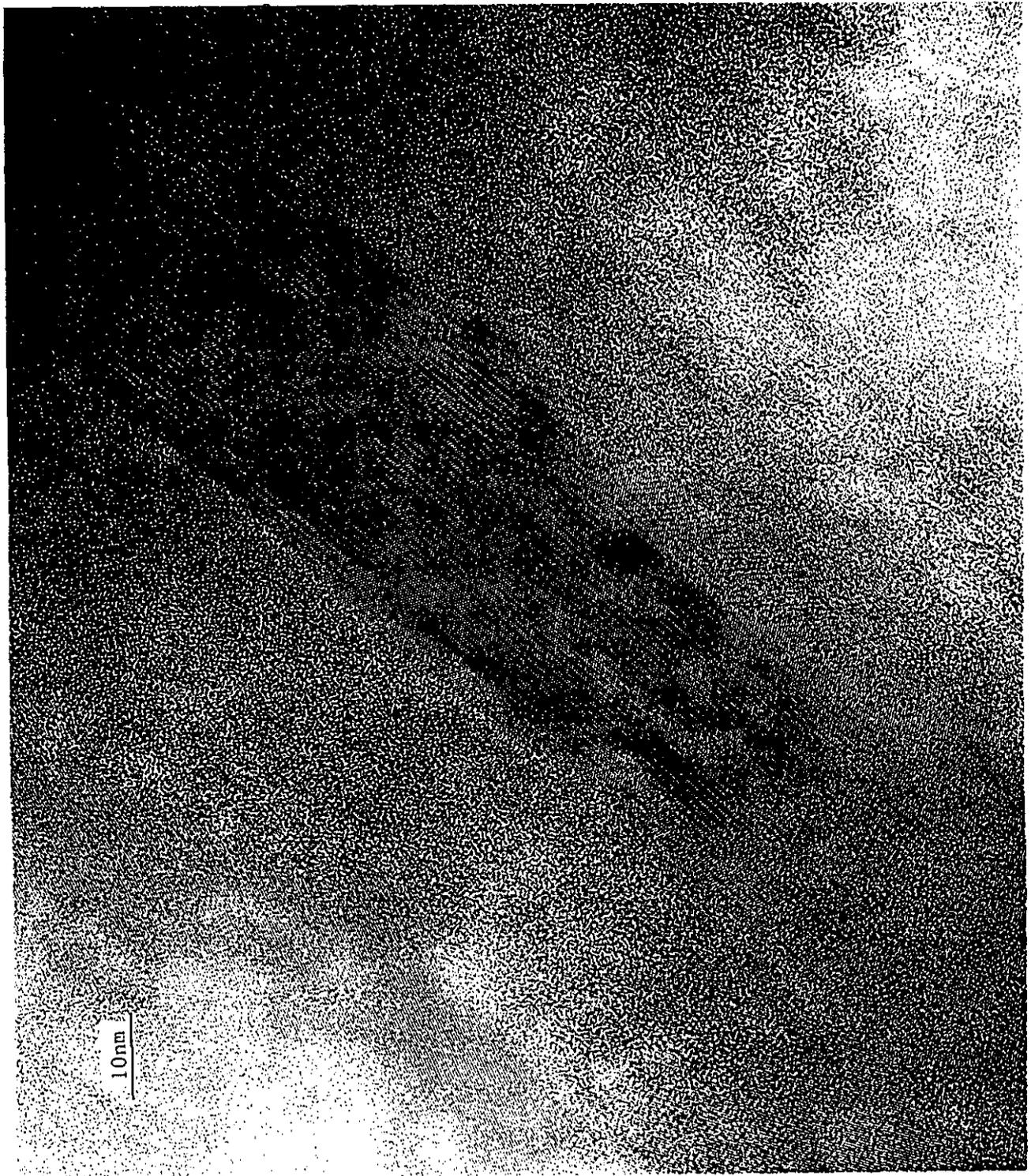


Fig. IV.12 Imagen de MET de alta resolución de un solo cristal de esmalte dental humano en sección longitudinal. Nótese el cambio de contraste que se presenta en diferentes áreas de este cristal (ver texto).

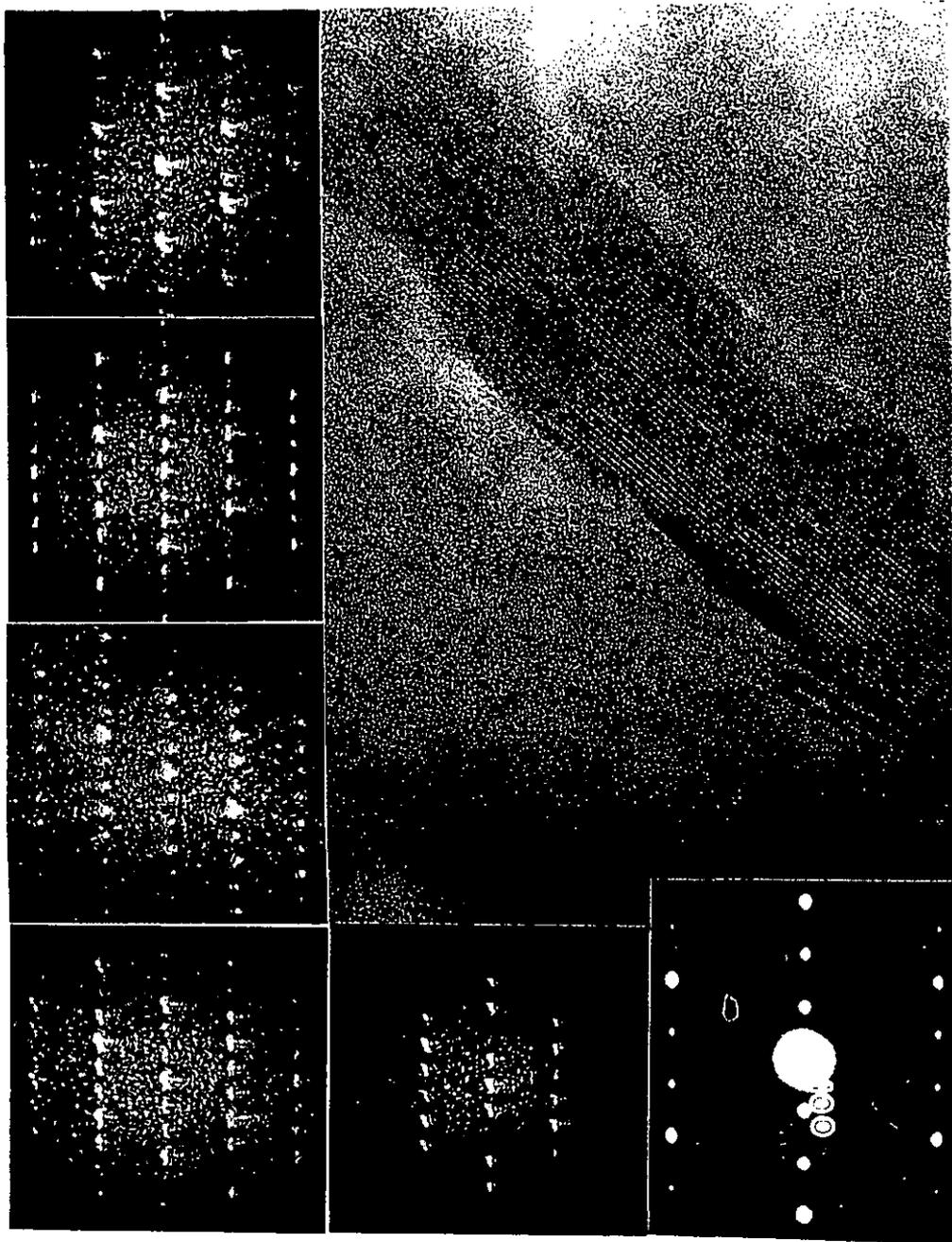


Fig. IV.13 Patrones de difracción "ópticos " de diferentes áreas del cristal elongado de la figura IV.12. Nótese como estos patrones cambian en intensidad aunque siempre muestran el mismo tipo de arreglo geométrico. El recuadro más grande muestra el patrón de difracción electrónico tomado en este cristal (ver texto).

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

Los resultados que se reportan en el capítulo anterior pueden ser catalogados como excelentes. Durante el estudio pudimos observar el esmalte dental de niños, adultos y ancianos; esto nos ha permitido analizar la evolución a través del tiempo en las variaciones encontradas en los patrones de difracción.

V.I El esmalte dental humano de niño, adulto y anciano.

El análisis del esmalte se llevó a cabo en secciones transversales y longitudinales, utilizando MEB, MET y análisis químico, conjuntando así una serie de datos interesantes. Dentro de éstos podemos recalcar que las observaciones en sección transversal por medio de MET se comportan exactamente igual en los tres grupos de edad; es decir, presentan un patrón de difracción en forma de anillos concéntricos, lo cual quiere decir que *en sección transversal el esmalte no presenta ningún cambio en función del tiempo*. A partir de esta observación es que podemos darle *una mayor importancia a la sección longitudinal*. Así, en sección longitudinal encontramos que el patrón de difracción no muestra anillos completamente concéntricos, sino que presenta arcos; es decir, los patrones están altamente texturizados y se asemejan a curvas, elípticas. Por lo tanto, *en sección longitudinal el esmalte presenta granos alargados; es decir, es una estructura texturizada, mientras que en sección transversal los granos del esmalte se presentan equiaxiales*.

El esmalte de niño en sección longitudinal presenta un mayor ordenamiento que los otros grupos. La estructura atómica de los tres grupos, esta compuesta por HA en el nivel nanométrico y los patrones de difracción están arreglados de acuerdo con la edad del esmalte. De esta forma, hemos observado que el esmalte de niño presenta un mayor ordenamiento en sección longitudinal que los de adulto y anciano, de los cuales este último presenta un mayor desorden. La comprobación de lo anterior requerirá de un mayor estudio, con análisis más exactos: en investigaciones posteriores tendríamos que comprobar que el esmalte dental del anciano ha perdido su orden en muestras a lo largo de la sección longitudinal sin que presente cambios en la sección transversal.

V.II El contraste del esmalte dental humano en sección longitudinal.

Uno de los resultados importantes que se obtuvieron en este trabajo de tesis, es que *el cristal del esmalte dental humano, que se observa elongado en sección longitudinal y completamente al azar en sección transversal, no está formado por una secuencia de cristales en la dirección c. Se ha demostrado, a partir de una serie de patrones de difracción, que estos cristales elongados, son un solo cristal que se encuentra curvado tridimensionalmente enrollado a semejanza de un listón "enrollado" sobre sí mismo, siguiendo un eje longitudinal. Si se realiza una serie de análisis por medio de MET en campo claro u obscuro se obtienen secciones claras u oscuras, debido a la*

curvatura del cristal, y producen un contraste como si se tratara de diferentes cristales en diferentes direcciones. Haciendo un análisis de la curvatura, se demuestra que es una serie de granos apilados en un solo cristal, pero curvado. Otros autores han mencionado cambiando su orientación a lo largo de su longitud, pero nosotros hemos demostrado que *es un solo cristal que se encuentra curvado a semejanza de un listón enrollado sobre sí mismo, siguiendo su eje longitudinal.*

V.II La línea Oscura

La observación del esmalte en sección transversal y longitudinal nos ha permitido determinar otro tipo de comportamientos, tal como el que presenta la línea oscura. *Se ha demostrado que esta línea se presenta, tanto en secciones transversales como longitudinales, lo que nos indica que se trata de un plano que cruza los cristales y no de una línea.* El hecho de que se trate de un plano nos permite abrir nuevas líneas de investigación, pues surgen nuevas incógnitas. Si es un plano, y en el sistema hexagonal se tienen tres planos que son completamente equivalentes, la pregunta es: ¿por que solo uno de los tres es escogido para que pase por ahí la línea oscura?, ¿qué es lo que hace a este plano tan especial?. La respuesta tiene que ser dada en futuras investigaciones.

Se han dado algunos parámetros acerca de la línea oscura, pero aún quedan muchas incógnitas. Vargas Ulloa ^{1,20} en su tesis observó que

hay ciertas diferencias en el contenido químico de la línea oscura y en el de los cristales del esmalte. *La línea oscura es una de las zonas más vulnerables del esmalte, lo cual no quiere decir que sea la zona de inicio del proceso carioso, sin embargo, al ser un defecto, es una zona muy susceptible de ser atacada por éste.* Todo lo anterior demuestra que la línea oscura requiere de mayores estudios, pero lo dificulta el hecho de que sólo se observa bajo ciertas condiciones de foco, por lo que tenemos que buscar diferentes métodos de preparación de muestras. Se han realizado intentos por mejorar el contraste de la línea oscura utilizando diferentes métodos químicos. La preparación de muestras biológicas, parece estar dando buenos resultados, es decir posiblemente se tenga que teñir el material, o introducir algún metal pesado para hacerlo detectable, lo cual significaría un gran avance en su estudio.

V.IV. La aportación del presente trabajo

Finalmente, se debe comentar que esta tesis representa la continuación del proyecto entre el Instituto de Física y la Facultad de Odontología, ambas de la UNAM. *La importancia del presente trabajo, es que ha dejado muy claro que si queremos obtener mayor información del esmalte dental, los estudios deben enfocarse a la sección longitudinal de éste.* Por lo tanto, tenemos que hacer varios análisis en sección longitudinal y tratar, en estudios futuros de aclarar puntos tales como: ¿que sucede con la unión amelodentinaria?. Esta es una unión muy importante, pues se unen dos materiales

completamente diferentes, lo que la convierte en una zona crucial. También se han encontrado cambios en la composición química del esmalte, es decir, no son iguales en la unión que cerca de la superficie. *Hay que considerar en futuros estudios, el proceso que sufre el esmalte del anciano, porque aún cuando no hay muchas diferencias en las secciones transversales y longitudinal, hay que establecer si las diferencias son estructurales o químicas.* Otro punto que queda en el aire, es el tipo de ordenamiento: ¿ que hace diferentes a los esmaltes de niño, adulto y anciano ?, ¿ de qué tipo de orden estamos hablando?, ¿ habrá diferencias en la estructura química?, ¿se tendrán diferentes estructuras conforme va evolucionando el diente?. Este trabajo nos ha permitido hacer estas interrogantes y de aquí en aportación e importancia.

CONCLUSIONES Y PROPUESTAS DE INVESTIGACIÓN

Resumiendo los resultados presentados en el capítulo anterior podemos enumerar las siguientes conclusiones:

1.- Se ha observado que el esmalte del niño es más ordenado en sección longitudinal que el del adulto y anciano. Sin embargo, aunque hay un cierto desorden entre el esmalte del adulto y anciano, este último es más desordenado.

2.- En sección longitudinal tenemos anillos que no son completamente concéntricos sino que presentan arcos, lo cual les da un aspecto de elipsidad. En sección transversal todos los anillos son concéntricos. Por lo tanto los granos del esmalte dental presentan texturización, siendo elongados en sección longitudinal y equiaxiales en sección transversal. El esmalte dental del niño en sección longitudinal aún presenta muchas características que deben ser analizados en mayor profundidad.

3.- Se ha observado que los cristales están elongados en sección longitudinal y al azar en sección transversal. Se ha demostrado que la línea obscura se presenta en secciones transversales y longitudinales lo que nos indica que es un plano que cruza a los cristales.

4.- Los cristales elongados que se observan en secciones longitudinales del esmalte no están formados por muchos cristales sino que es el mismo cristal pero curvado a semejanza de un listón enrollado.

Propuestas

Si analizamos el esmalte dental en sección transversal y longitudinal por medio de difracción electrónica encontramos que en sección transversal los patrones son casi iguales, sin embargo en sección longitudinal no lo son. El esmalte dental humano por lo tanto debe ser estudiado en sección longitudinal para obtener una mayor información acerca de éste.

En un futuro muy cercano, y como resultado del presente trabajo de tesis, debe de realizarse un estudio detallado sobre las propiedades estructurales del esmalte infantil. Debemos analizar las diferencias que presentan tanto los dientes desiguos como los permanentes de los niños y adultos jóvenes. Solo de esta forma se aclarará el porqué de las diferencias que se presentaron entre los patrones de difracción de niño, adolescente y anciano.

BIBLIOGRAFIA

1. Vargas Ulloa, L.: Análisis estructural y químico de la línea oscura de los granos del esmalte dental humano por medio de microscopía electrónica. *Tesis de Maestría*, Facultad de Odontología UNAM, 1997.
2. Cristoffersen M., Cristoffersen J.: Possible mechanisms for the growth of the biomaterial, calcium hydroxyapatite microcrystals. *J. Crystal Growth*. 1992; 1211: 617-630.
3. Amizuka N., Uchida T., Fukae M., Yamada M., Ozawa H.: Ultrastructural and immunocytochemical studies of enamel tufts in human permanent teeth. *Arch. Histol. Cytol.* 1992; 55(2): 179- 90.
4. Arends J., Jongebloed W.L.: Crystallinities dimensions of enamel. *J. Biol. Buccale*. 1978 ;6(3):161-71.
5. Cuisinier F., Steurer P., Senger B., Voegel J., Frank R.: Human Amelogenesis: High Resolution Electron Microscopy Study of Ribbon-like Crystals. *Calcif. Tissue Int.* 1992; 51: 259-268.

6. 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; 232:466-478.
7. González Trejo A., Madrigal Colín A.: Análisis Estructural y Químico del Esmalte Dental Humano por Técnicas de Microscopía Electrónica. *Tesis de licenciatura*. Odontología, UNAM. 1994.
8. Bres E.F., Barry J.C., Hutchinson J.L.: A structural basis for the caries dissolution of the apatite crystals of human tooth enamel. *Ultramicroscopy*. 1984; 12:367.
9. Gross J.K., Mehmel M.J.: "Über die Stuktur des Apatits", *Zeits. Krizt.* 1930; 75:323.
10. Warshawsky P., Nanci A.: Analysis of Crystallite Shape in Rat Incisor Enamel. *Anat. Rec.* 1987; 218:380-390.
11. Bigeard L., Hemmerle J., "Two site model of human dental enamel". *J. Dent. Child.* 1996; 63(1) : 2233-31.

12. Ichijo T., Yamashita Y., Terashima T.: Observations on structural features and characteristics of biological apatite crystals. Observation on lattice imperfection of human tooth and bone crystals II. *Bull. Tokyo Med. Dent. Univ.* 1993; 40:193-205.
13. Bres E.F., Steuer P., Voegel J.C.: Observation of the loss of the hydroxyapatite sixfold symmetry in a human fetal tooth enamel crystal. *J. Microsc.* 1993; 170(2) :147-154.
14. Spears I.R., Van Noort R., Crompton R.H., Carden G.E., Howard I.C.: The effects of enamel anisotropy on the distribution of stress in a tooth. *J. Dent Res.* 1993; 72(11): 1526-1531.
15. Van Duk J.W., Waters N.E., Borggeven P.M., Driessens F.C.M.: Some Electrochemical Characteristics of Human Tooth Enamel. *Achs. Oral Biol.* 1997; 22:399-409.
16. Anderson P., Elliott J.C.: Subsurface Demineralization in Dental Enamel and Other Permeable Solids During Acid Dissolution. *J. Dent. Res.* 1992;12(5):355-357.

17. Grobler S.R., Du Torr I.J.: The Effect of honey on human tooth enamel in vitro observed by electron microscopy and microhardness measurements. *Arch Oral Biol.* 1994; 39(2):147-153.
18. Alcántara Rodríguez C.: Caracterización del Esmalte Dental Humano por Microscopía Electrónica de Transmisión. *Tesis de Licenciatura.* Odontología UNAM, 1993.
19. Gloria Hernández M. J.: Proceso de disolución in vitro del esmalte dental humano durante un ataque ácido, observado por microscopía electrónica. *Tesis de licenciatura.* Odontología, UNAM. 1994.
20. Yacamán M., Reyes-Gasga J.: Microscopía electrónica, una visión del microcosmos. *Fondo de cultura económica,* México D.F. 1995.
21. Nylen M.: Crystal growth in rat enamel. *J. Cell. Biol.,* 1963;(18):109-123.
22. Kay M.I., Young R.A.: Thermal decomposition of human tooth enamel. *Calcif. Tiss. Res.,* 1980;(31):189-193.
23. Jøgebloed J.: "Stages in the dissolution of human enamel crystal". *Calcif. Tiss. Res.,* 1975;19,109-111.
24. Vogel J. C., Stager I.N.: The dissolution of human enamel crystals

in dental caries. *Calcif Tiss. Res.* 1977; 24:19-27.

25.Nelson D.G.A., Wood. G.J.: The structure of (100) defects in carbonated apatite crystallites: A high resolution electron microscope study. *Ultramicroscopy.* 1986;19:253-266.

26.Bres E. F.: Theoretical detection of a dark contrast line in twinned apatite biocrystals and its possible correlation with the chemical properties of human and enamel crystals. *J. Biosphys.* 1986; 50:1185-1193.

27.Warshawsky H.: External shape of enamel crystals. *Scanning microscopy.* 1987;1 (4), 1913-1923.

28.Dalcusi G.: High-resolution electron microscope study of human enamel crystallites: size, shape and growth. *J. Ultrastruc. Res.* 1978;65:163-172.

29.Voegel C.: Stages in the dissolution of the human enamel crystals in dental caries. *Calcif. Tissue Res.* 1977; 24:19-27.

30.Dalcusi G.: Some ultrastructural aspects of biological apatite and possible role of dislocations. *J. Biol. Buccale.* 1977;(5),185-193.

31. Ichijo T., Yamashita Y., Terashima T.: Observation on Structural Features and Characteristics of Biological Apatite Crystals. Observation on Fusion of Human Enamel Crystals. *Bull Tokyo Med. Dent. Univ.* 1993; 40:207-216.
32. Bres E.F., Voegel J. C.: High resolution electron microscopy of human enamel crystals. *J. Microsc.* 1990; 160(2): 183-201.
33. Shibahara H., Tohda H., Yanagizawa T.: High resolution electron microscopic observation of hydroxyapatite in tooth crystals. *J. Electron. Microsc.* 1994; 43:89-94.
34. Simer J.P., Fincham A.G.: Molecular mechanisms of dental enamel formation. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 1995; 6(2):84-108.
35. Cuisinier F.J.G., Voegel J.C., Yacaman J., Frank R.M.: Structure of initial crystals formed during human amelogenesis. *J. Cryst. Growth.* 1992; 116: 314-318.
36. Palamara J., Phakey P.P., Rachinger W.A.: Ultrastructure of spindles and tufts in human dental enamel. *Adv. Dent. Res.* 1989; 3(2):249-5.

37. Phakey P., Palmara J., Hall R.K.: "Sequential time and position of enamel protein expression during embryonic fetal neonatal and early postnatal stages of mouse molar organogenesis". *Connect. Tiss. Res.* 1995; 32 (1-4):253-9.
38. Kerebel B., Daculsi G., Kerebel L.M.: Application of the ion thinning methods to the high resolution study of human dental enamel crystals. *Acad. Sci. Hebd.* 1978;286(25):1903-6.
39. Ekstrand K.R., Bjornland T., Thylstrup A.: Light and transmission electron microscopy study of enamel organ cells in germectomized human third mandibular molars. *Scand. J. Dent. Res.* 1991; 99(6):445-56.
40. Kattie A.L., Cottrel M.: The structure, ultrastructure and physicochemical analysis of the hard dental tissues of the Viperidae. *Bull. Int. Rech. Sci. Stomatol. Odontol.* 1989; 32(4): 217-25.
41. Rey C.: Calcium phosphate biomaterials and bone mineral. Differences in composition, structures and properties. *Biomaterials.* 1990: 11,13-19.

42. Pellen J.G., Rejda B.V., De Groot K.: Preparations and properties of Sintered Hydroxyapatite. *Ceram. Int.* 1978; 4:71-75.
43. Le Geros R.Z., Kijkowska R., Le Geros J.P.: "Formation of octacalcium phosphates, OCP. A preliminary report". *Scann. Microsc.* 1984,14(IV), 1771-1777.
44. Kanaya. K., Baba N., Shinohara L., Ichijo T.: "A digital Fourier harmonic superposition method for the structural analysis of human tooth enamel obtained by electron microscopy". *Micron. Microsc. Acta* 1984,15:17-35.

Curriculum Vitae

Datos Generales

Nombre completo: América de Lourdes Ayuso Arce

Fecha y lugar de nacimiento: 23 abril de 1959
Cd. de México, D.F.

Nacionalidad: Mexicana

Nombre de los padres: Sra. Aurora Arce León +
Sr. Porfirio Ayuso Martínez +

Domicilio Actual: Av. Central 30. A Barrio de Xaltocan, Xochimilco
México D.,F. C.P. 16090

Teléfono: 6.06.37.31

Estudios Profesionales Posgrado.

Licenciatura: Centro Interdisciplinario en Ciencias de la Salud, I.P.N.
Licenciatura en Odontología
1976 – 1981.

Especialidad: Hospital General "Dr. Manuel Gea González", S.S.A.
Ortodoncia 1990 – 1993.

Certificación: Consejo Mexicano de Ortodoncia
Certificado No. 285
1996.

Maestría: Facultad de Odontología. UNAM
Maestría en Odontología
1995 – 1996.

Experiencia docente: Centro Interdisciplinario de Ciencias de la Salud, I.P.N.
Profesor Titular de Ortodoncia y Ortopedia
Abril 1993 a Mayo 1995.

Hospital Infantil "Dr. Federico Gómez".
Profesor titular de Ortopedia Funcional.
Enero 1993 a la fecha.

Experiencia profesional: Práctica privada desde 1981 a la fecha.

ESTA TESIS
FUE IMPRESA POR EL
SR. VICTOR ZARATE T.
ATENCION PERSONAL

REP. DE CUBA 99 DESP. 9
TEL. 510-02-99
HORARIO 10:00 A 20:00 HRS.
COL. CENTRO C.P. 06010

TEL. PART. 649-02-51
HORARIO 7:00 A 9:00 HRS.
Y 21:00 A 23:00 HRS.