

463

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGIA

ESTUDIO ESTRUCTURAL DE LA DENTINA POR  
MICROSCOPIA FOTONICA, MICROSCOPIA ELECTRONICA Y  
DIFRACCION DE RAYOS X

293514

T E S I S  
Q U E P R E S E N T A :  
ANA GUADALUPE RODRIGUEZ HERNANDEZ  
P A R A O B T E N E R E L T I T U L O D E :  
C I R U J A N A D E N T I S T A

DIRECTOR DE TESIS: JOSE REYES GASCA



MEXICO, D. F.

2001



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## AGRADECIMIENTOS

Sería imposible agradecer con detalle a todas aquellas personas que han estado siempre a mi lado, apoyándome en todas mis aventuras y empresas, ya que sería interminable la lista de personas que han estado a mi lado.

Primero quiero agradecer a mis padres Rosa María Hernández y Luis Antonio Rodríguez, que siempre han estado a mi lado y que me han apoyado en todo, a pesar de que nunca les he demostrado lo mucho que los quiero y lo importantes que son en todos mis actos, la forma que lo hago ahora es presentando esta tesis en honor a todo su esfuerzo y dedicación para conmigo, y prometiendo que seguiré adelante con todas mis metas siguiendo su ejemplo.

A mi hermano Luis Martín al cual quiero mucho y deseo lo mejor para él y que sepa que gracias a sus ideas y energía me contagia de alegría y felicidad todos los días.

A la doctora Margarita García Garduño, ya que sin ella, no hubiera encontrado el camino para llegar al Instituto de Física, y gracias a su apoyo concluir con una meta más.

A José Reyes Gasga, por su paciencia, por su dedicación, por todo el apoyo brindado y por confiar en mí, solo puedo decirle "gracias", ya que no encuentro las palabras para agradecer su labor.

A Pedro Mexía, no encuentro las palabras para agradecerle todas sus enseñanzas y lo mas importante de todo su amistad, el apoyo brindado dentro y fuera del laboratorio me ayudo a continuar con este trabajo, además el invertir horas de trabajo extras en mi enseñanza y en la utilización de los laboratorios y equipos nunca sabré como pagar todas sus atenciones.

A Roberto Hernández, gracias por tu tiempo, por tu paciencia y por tener siempre una sonrisa para conmigo, además hay otras muchas cosas que no encuentro como pagar y que han sido un gran apoyo.

A Carlos Flores, agradezco su tiempo invertido en mi aprendizaje, así como el resolver todas mis dudas y el apoyo técnico brindado en la preparación de mis muestras, ya que sin él, esto no habría sido posible.

Gracias a Samuel Tehuacanero, por su paciencia y su apoyo dentro del laboratorio de digitalización de imágenes, gracias a Jacqueline Cañetas por su apoyo y dedicación en la observación de mis muestras.

También quiero agradecer al señor Luis Rendón ya que gracias a su apoyo y dedicación obtuvimos los resultados de Alta Resolución, así como a la Ingeniero Cristina Zorrilla por su apoyo en el Lab. de Digitalización y procesamiento de Imágenes, al Dr. Ramiro García por su apoyo en la interpretación.

Y los más importantes, al Instituto de Física UNAM, donde me abrieron las puertas y me dieron la oportunidad de incursionar en un área tan fascinante como lo es la investigación, y donde conocí a personas tan importantes en mi vida; y a la Facultad de Odontología de la UNAM.

Quiero agradecer el apoyo financiero parcial de CONACYT (Proyecto 31-695-N) y a DGAPAUNAM (Proyecto IN-103700) para la realización de esta investigación de tesis.

## ÍNDICE

	Pag.
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	2
<b>INTRODUCCIÓN</b>	11
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	14
<b>OBJETIVOS</b>	15
<b>HIPÓTESIS</b>	17
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	18
<b>I. DENTINA</b>	20
<b>Composición química</b>	20
<b>Tipos de dentina</b>	21
Dentina primaria	
Dentina secundaria	
Dentina irregular	
<b>Dentinogénesis</b>	24
<b>Formación de dentina radicular</b>	28
<b>Dentina del manto</b>	29
<b>Dentina circumpulpar</b>	30
<b>Dentina intertubular</b>	32
<b>Dentina peritubular</b>	32

<b>Mineralización</b>	33
<b>II. FUNDAMENTOS DE CRISTALOGRAFÍA</b>	36
<b>Cristales</b>	36
<b>Redes de Bravais</b>	38
<b>III. ESTRUCTURA Y CRISTALOGRAFIA DE LA HIDROXIAPATITA</b>	42
<b>IV. TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE LA DENTINA</b>	45
<b>Microscopía Fotónica</b>	45
El Microscopio Fotónico	46
Técnicas para Microscopía Fotónica	48
<i>Campo Claro</i>	48
<i>Contraste de Fases</i>	49
<i>Campo Oscuro</i>	51
<i>Fluorescencia</i>	52
<b>Microscopía Electrónica de Barrido</b>	55
<b>Microscopía Electrónica de Transmisión</b>	61
<b>Microscopía Electrónica de Alta Resolución</b>	64
<b>Difracción de Rayos X</b>	65
<b>V. METODOLOGÍA</b>	68
<b>Muestras</b>	69
<b>Material</b>	70
<b>Metodología para la preparación de muestras</b>	77
Microscopía Fotónica	77
Microscopía Electrónica de Barrido	78

Microscopía Electrónica de Transmisión	79
Difracción de Rayos X	81
<b>VI. RESULTADOS</b>	<b>83</b>
<b>Difracción de Rayos X</b>	<b>83</b>
<b>Microscopía Fotónica</b>	<b>91</b>
<b>Microscopía Electrónica de Barrido</b>	<b>95</b>
<b>Microscopía Electrónica de Transmisión</b>	<b>112</b>
<b>Microscopía Electrónica de Alta Resolución</b>	<b>118</b>
<b>VII. DISCUSIÓN</b>	<b>121</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>127</b>
<b>PROPUESTAS</b>	<b>129</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>130</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>I. DENTINA</b>	<b>pag.</b>
I.1 Esquema de la dentina	21
I.2 Dentina Primaria y Secundaria	23
I.3 Dentina terciaria	23
I.4 Dentinogénesis	26
I.5 Prolongaciones Odontoblasticas	27
I.6 Formación de dentina radicular	29
I.7 Dentina Circumpulpar	31
I.8 Dentina Peritubular e Intertubular	34
<b>II. FUNDAMENTOS DE CRISTALOGRAFÍA</b>	
II.1 Mosaico Periodico	37
II.2 Redes de Bravais	39
II.3 Tabla de los 32 grupos puntuales.	40
<b>III. ESTRUCTURA Y CRISTALOGRAFIA DE LA HIDROXIAPATITA</b>	
III.1 Estructura Hexagonal de Hidroxiapatita	43
III.2 Celda Unitaria de Hidroxiapatita	44
III.3 Tabla Internacional de la Hidroxiapatia	45
<b>IV. TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE LA DENTINA</b>	
IV.1 Microscopio Fotónico	46
IV.2 Fotografía de Campo Claro	49
IV.3 Fotografía de Contraste de Fases	50
IV.4 Iluminación en un Microscopio de Contraste de Fases	51

IV.5 Fotografía de Campo Oscuro	52
IV.6 Fotografía de Epifluorescencia	53
IV.7 Iluminación en un Microscopio de Epifluorescencia	55
IV.8 Esquema de un Microscopio de Barrido	59
IV.9 Esquema de las señales del haz electrónico	60
IV.10 Formación de imágenes en el Microscopio Electrónico	62
IV.11 Fotografía de un Patrón de Difracción	63
IV.12 Esquema de un átomo	65
IV.13 Esquema de la interacción del Rayo X	67
<b>V. METODOLOGÍA</b>	
V.1 Esquema del diente	69
V.2 Fotografía de la Cortadora	70
V.3 Fotografía del Pulidor Mecánico	71
V.4 Fotografía del Ion Mil	72
V.5 Fotografía del Microscopio Fotónico	73
V.6 Fotografía del Microscopio Electrónico de Transmisión	74
V.7 Fotografía del Microscopio Electrónico de Barrido	74
V.8 Fotografía del Difractómetro.	75
<b>VI. RESULTADOS</b>	
VI.1 Grafica de dentina	84
VI.2 Grafica de esmalte	86
VI.3 Grafica de dentina/esmalte	88
VI.4 Grafica de dentina/hueso	89
VI.5 Fotografía de dentina de microscopio fotónico	92

VI.6 Fotografía de dentina de Microscopio fotónico	94
VI.7 Fotografía de MEB de los túbulo dentinarios	96
VI.8 Fotografía de MEB de un túbulo dentinario	99
VI.9 Fotografía de MEB de la dentina	101
VI.10 Fotografía de MEB de la dentina en contacto con la pulpa	103
VI.11 Fotografía de MEB de prolongaciones odontoblasticas	104
VI.12 Fotografía de MEB de una prolongación odontoblastica	106
VI.13 Fotografía de MEB de un túbulo dentinario	107
VI.14 Fotografía de MEB de túbulo dentinario	109
VI.15 Fotografía de MEB de los cristales de hidroxiapatita	111
VI.16 Fotografía de MEB y MET de túbulos dentinarios	113
VI.17 Fotografía de MET de cristales de hidroxiapatita	114
VI.18 Histograma de dentina	116
VI.19 Fotografía de MET de dentina en polvo	119
VI.20 Fotografía de MET de alta resolución de un cristal	120

## INTRODUCCIÓN

Hasta hace poco el estudio del diente en sus diferentes partes histológicas (esmalte, dentina, cemento) y del hueso, se había enfocado principalmente al estudio de su parte orgánica. La parte inorgánica comienza a resurgir últimamente y a llenar el espacio faltante para una mayor comprensión de éstos.

La parte inorgánica común para estos tejidos, la componen en su mayor porcentaje la hidroxiapatita, un fosfato de calcio que se encuentra en íntima relación con las fibras colágenas, y en diferente proporción dependiendo de la zona y el tejido. Así mismo, cada uno de estos tejidos, posee propiedades diferentes y le otorga al diente características mecánicas y estructurales específicas.

La dentina presenta ciertas características estructurales como son, la presencia de dentina primaria, dentina secundaria, dentina terciaria o de reparación, dentina intertubular, dentina peritubular y dentina circumpulpar, cada una de ellas con características diferentes como son la organización de su material orgánico y la distribución de los cristales.

La parte inorgánica de la dentina, como ya se mencionó, esta compuesta por hidroxiapatita, la cual presenta una celda unitaria hexagonal descrita por la fórmula  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , definida cristalográficamente con un grupo espacial

P6<sub>3</sub>/m. Esta da lugar a cristalitas, los cuales se encuentran inmersos en una matriz inorgánica.

El presente trabajo pretende dar a conocer la estructura de la dentina, en su componente inorgánico principalmente, tanto a nivel micrométrico como a nivel atómico. De esta manera, se estudiarán las características de los cristales de hidroxiapatita que forman la dentina, como lo son su tamaño, y distribución en los diferentes componentes estructurales de la dentina.

Para analizar a este tejido se ha hecho uso de la Microscopía Electrónica de Transmisión, tanto en su modalidad convencional como de Alta Resolución, la Microscopía de Barrido y la Microscopía Fotónica. Así mismo las características químicas de los componentes inorgánicos de la dentina se estudiaron por difracción de Rayos X y de electrones.

Los equipos utilizados fueron microscopios electrónicos de transmisión 100cx y 4000EX de Jeol para hacer las observaciones de Microscopía convencional y de Alta Resolución, el Microscopio de Barrido un Jeol 5200, el Microscopio Fotónico Zeiss Axiotech de luz reflejada y transmitida y el equipo para la difracción de Rayos X fue un Difractometro de Rayos X D8 Advance Brucker axs.

La presentación escrita del presente trabajo de Tesis, fue dividida en 8 secciones para un mejor entendimiento de los resultados y las conclusiones obtenidas. En la

sección I se da a conocer la estructura y composición química de la dentina, así como los diferentes tipos de dentina, la dentinogenesis y la fase de mineralización.

En la sección II, se dan a conocer los fundamentos de cristalografía, la cual es la base para entender los siguientes capítulos. En la sección III se describe a la hidroxiapatita, su estructura cristalográfica así como la descripción y localización de los átomos que la conforman. En la sección IV se describen cada una de las técnicas que fueron empleadas para el estudio de la dentina, mencionando como se lleva a cabo la interacción del haz electrónico con la muestra así como los componentes de cada aparato y sus diferentes modalidades. Los materiales empleados, las muestras, así como la metodología empleada para la preparación de la muestra en estudio y así poder ser observadas y analizadas por cada una de las técnicas mencionadas, se describen en la sección V.

Los resultados obtenidos con cada una de las técnicas empleadas son presentadas y explicadas en la sección VI, analizando con detalle las observaciones realizadas. La discusión de éstos se comenta en la sección VII. y las conclusiones a las que se llegaron son presentadas al final de la presentación. De igual forma se incluye la lista de las publicaciones y libros consultados en la sección titulada "referencias". Antes de esta lista se comenta brevemente los posibles trabajos a futuro y perspectivas de investigación que el presente trabajo de tesis ofrece en el campo del estudio de la dentina.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El estudio ultraestructural de la dentina es un tema que surge, con la finalidad de conocer e identificar los cristales de Hidroxiapatita que la forman, así como sus características y componentes orgánicos a nivel nanométrico.

La dentina es el componente del diente que ocupa mayor peso en éste, y también se conoce que contiene mayor cantidad de tejido orgánico en comparación con el esmalte.

Los cuestionamientos que surgen con respecto a este tema son:

- ¿Cómo están distribuidos los cristales de Hidroxiapatita en la estructura de la dentina?
- ¿Cómo es su ordenamiento comparado con los cristales de hidroxiapatita que forman el esmalte?
- ¿Cuál es el tamaño y la estructura de los cristales de apatita en la dentina?
- ¿Cómo se comportan estos cristales al interactuar con el haz de electrones del microscopio?

Estos son los tipos de preguntas que hemos tratado de contestar en este trabajo de tesis.

## **OBJETIVOS**

### **GENERALES**

1. Identificar los elementos químicos y físicos de la estructura y localización de los cristales de Hidroxiapatita en la dentina.
2. Observación y estudio a nivel ultraestructural por Microscopía Electrónica de Transmisión, Microscopía Electrónica de Barrido y Microscopía de Alta Resolución de los elementos que componen a la dentina.
3. Análisis y observación del comportamiento de los componentes de la dentina al ser incididos por el haz electrónico durante su observación.

### **ESPECIFICOS.**

1. Obtener muestras de grosor y tamaño correcto para su estudio por diferentes tipos de microscopías, preparándolas adecuadamente en cada etapa por la cual es sometida, para poder identificar las características específicas de la dentina.
2. Conocimiento de los componentes de la dentina a nivel ultraestructural, para dar a conocer su comportamiento e importancia en la rehabilitación dental.

3. Conocer el componente principal de la fase inorgánica de la dentina, su estructura, sus dimensiones y su localización dentro de la matriz orgánica.
  
4. Presentar gráficamente los componentes estructurales de la dentina de acuerdo a la globalización de los resultados obtenidos por las diferentes técnicas utilizadas.

## **HIPOTESIS**

1. Los cristales de Hidroxiapatita son más pequeños y menos abundantes en la dentina en comparación con el esmalte.
2. Los cristales de Hidroxiapatita se encuentran en diferente proporción en las diferentes zonas de la dentina.
3. Los cristales de Hidroxiapatita forman una estructura casi amorfa comparada con la estructura que forman en el esmalte.

## JUSTIFICACIÓN

Este trabajo de tesis presenta el estudio por microscopía electrónica y fónica de la dentina. Estas técnicas nos permitirán, por lo tanto, conocer la estructura de ésta en su parte inorgánica a nivel micrométrico y nanométrico. Esto lo podemos asegurar por el tipo de preparación de muestras que se realiza. Por lo tanto, el presente trabajo de tesis nos permitirá conocer el arreglo que presentan los cristales de la dentina y compararlos con aquellos, que también son compuestos de hidroxiapatita, que forman los prismas del esmalte. De aquí la importancia de este estudio.

Además este estudio además nos ayudará a conocer con mayor detalle los componentes estructurales de la dentina, el diámetro de los túbulos dentinales, su disposición y el número de éstos según la zona del diente.

En el campo de la Odontología servirá, para crear conciencia para la realización de tratamientos de cualquier índole y el éxito o fracaso de éstos, ya que la dentina, es el componente con mayor volumen dentro del diente, y la eliminación correcta de ésta al realizar un tratamiento y, conociendo el comportamiento físico de todos sus componentes, ayudara al mejor entendimiento de los posibles daños o repercusiones que el tratamiento pueda presentar.

Entender la manera en que los cristales de Hidroxiapatita se encuentran organizados en la dentina, y su importancia para el odontólogo al momento de colocar sus bases para la posterior restauración. Este trabajo pretende aportar, aunque sea en forma mínima, a este conocimiento.

## I. DENTINA

La dentina es un tejido conectivo especializado, mineralizado, que constituye la mayor parte del diente, de color amarillo claro, capaz de deformarse ligeramente ante ciertas fuerzas compresivas. Es de consistencia dura, siendo mayor que la del hueso, pero menor que la del esmalte. (Fig. I.1)

Por su contenido en sales minerales es radiopaca pero en menor grado que el esmalte <sup>(7)</sup>. Bajo la luz polarizada, la dentina muestra una birrefringencia ligeramente positiva. De hecho, las fibrillas de la matriz orgánica son ópticamente positivas y los cristales inorgánicos son ópticamente negativos <sup>(6)</sup>.

### Composición química.

El 30% de la dentina está formada por material orgánico (fibrillas de colágena y una sustancia fundamental de mucopolisacaridos) y agua, el otro 70 % está mineralizado por cristales de Hidroxiapatita <sup>(4)</sup>.

La dentina es un tejido altamente permeable permitiendo el paso de fluidos y moléculas así como invasiones microbianas. En el microscopio fotónico se pueden observar los túbulos dentinarios los cuales tienen un diámetro de 1 a 3 micrometros, éstos describen una forma sinoidal que va desde la pulpa hasta la Unión esmalte-dentina (Fig. I.1). Hay aproximadamente 15,000 tubos por mm

cuadrado en la dentina exterior; 25,000 en la parte central; y 55,000 cerca de la pulpa <sup>(4)</sup>.

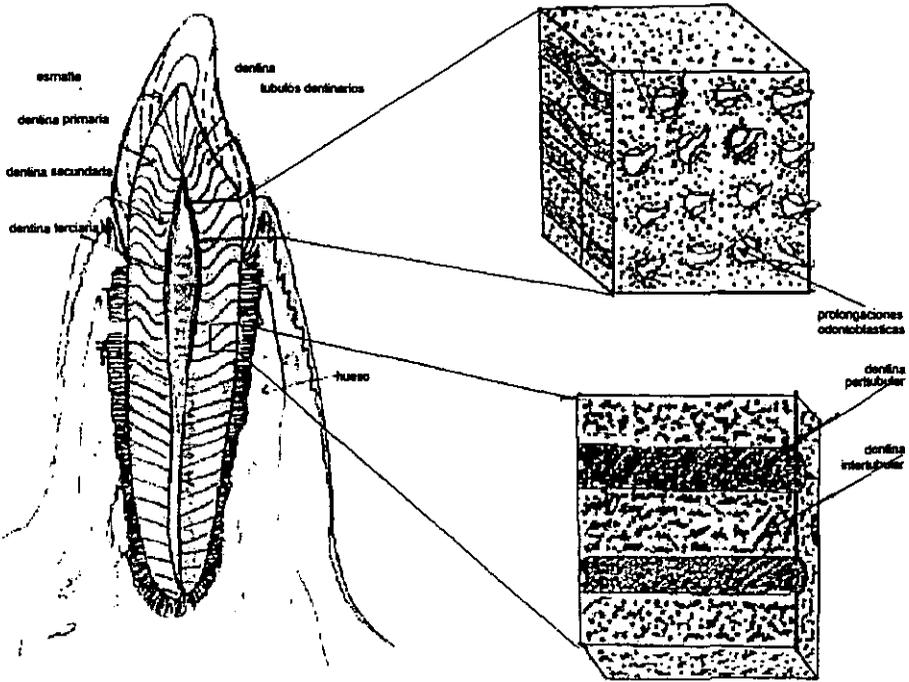


Fig. 1.1 Esquema del diente donde se aprecia la dentina y su estructura, así como sus prolongaciones odontoblásticas, en sección longitudinal y transversal.

## Tipos de dentina

### Dentina primaria

Constituye la mayor parte de la dentina y se encuentra tanto en la corona como en la raíz del diente. La formación de la dentina primaria es continua hasta

que la longitud total de la raíz del diente ha sido completada. La dentina formada en este momento se conoce como dentina primaria <sup>(6)</sup>. (Fig. 1.2)

### Dentina secundaria

La formación de dentina secundaria comienza después de que la longitud total de la raíz anatómica se ha establecido, aunque a una velocidad más lenta que la dentina primaria. Esta dentina da por resultado la reducción progresiva del tamaño de la cámara pulpar <sup>(4)</sup>. (Fig. 1.2)

### Dentina terciaria

Esta dentina se forma como respuesta a estímulos físicos, químicos, o biológicos como: atrición, caries, procesos restaurativos, etc. <sup>(4)</sup>, (Fig. 1.3). La dentina terciaria puede ser formada durante toda la vida del diente y solo se efectúa en ciertos lugares, específicamente los que responden a estímulos nocivos.

En algunos casos, esta dentina reparadora se puede caracterizar por:

- 1) Presencia de células semejantes a los osteoblastos.
- 2) Disminución o ausencia de túbulos dentinales



Fig. 1.2, Imagen en la que se aprecia una imagen de la dentina en sección longitudinal. La zona con la curvatura hacia arriba es la dentina primaria y la curvatura hacia abajo corresponde a la dentina secundaria.<sup>(33)</sup>

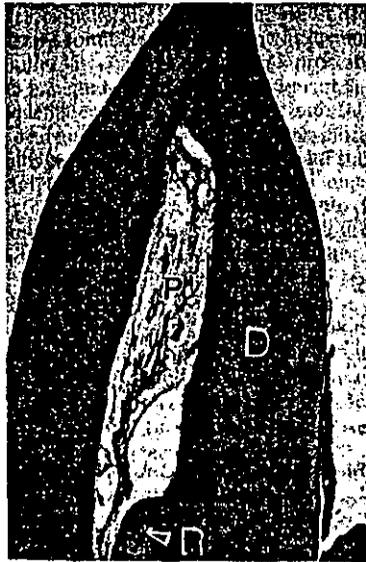


Fig. 1.3, Imagen de dentina, en la cual la P, corresponde a la pulpa dental, la d corresponde a la dentina y la r, corresponde a la dentina de reparación o terciaria.<sup>(6)</sup>

- 3) Presencia de vesículas de matriz en mineralización
- 4) Un modelo de birrefringencia semejante al hueso.

En algunas ocasiones esta dentina es semejante al hueso y por lo tanto se le denomina osteodentina <sup>(7)</sup>.

### **Dentinogénesis**

La dentina es formada por los odontoblastos, que se diferencian a partir de las células ectomesenquimales de la papila dentaria, bajo la influencia organizadora del epitelio dentario interno. De esta manera, esta papila es el órgano formador de la dentina <sup>(4)</sup>.

La formación de dentina comienza de la 14 a la 16° semana de vida intrauterina, en el estadio de campana del desarrollo en el tejido papilar adyacente al plegamiento extremo del epitelio dentario interno. Su formación y mineralización comienza en el vértice de las cúspides o en los bordes incisales avanzando en sentido centripeto por la aposición rítmica de capas cónicas una dentro de la otra, hasta llegar a su fin en la dentina radicular. En ella intervienen varios factores que toman lugar en esta etapa de diferenciación y morfogénesis la cual se lleva a cabo en la matriz extracelular de la dentina <sup>(7)</sup>.

La primera evidencia histológica de la formación de la dentina coronaria clásicamente se verifica en las células del epitelio dentario interno. Antes de que comience la dentinogénesis, las células del epitelio interno, de forma corta y cilíndrica, se dividen rápidamente para acomodarse al crecimiento del germen dentario; estando apoyadas en una membrana basal que separa el epitelio de la papila. Las células de la papila dentaria se hallan en este momento separadas del epitelio interno por una zona acelular. Estas células se caracterizan por ser ectomesenquimales pequeñas, con un núcleo central y citoplasma escaso con pocos organitos citoplásmicos, estando ubicados en una sustancia fundamental amorfa, constituida por fibrillas colágenas finas y escasas <sup>(5)</sup> (Fig. 1.4)

La dentinogénesis se inicia sucesivamente en los sitios donde se formarán las cúspides. Está precedida por el cese de la división celular de las células del epitelio dentario interno, y seguida de un cambio de forma, de cortas y cilíndricas a altas y cilíndricas, y por la migración de sus núcleos hacia el polo de la célula que está alejado de la papila. Este cambio de posición del núcleo revierte la polaridad de la célula. Casi inmediatamente después de que ocurren esos cambios dentro del epitelio interno, también surgen cambios en la papila dentaria adyacente. Las células ectomesenquimales que se hallan cercanas a la zona acelular se agrandan rápidamente a medida que su citoplasma aumenta de volumen para poder contener cantidades crecientes de retículo endoplásmico rugoso y complejo de Golgi. Estas células recientemente diferenciadas se llaman odontoblastos. Se

opuestamente al epitelio dentario interno. La zona acelular entre la papila y el epitelio interno desaparece gradualmente a medida que los odontoblastos (que se diferencian a partir de las células ectomesenquimales) aumentan de tamaño y ocupa esta zona <sup>(4)</sup>.

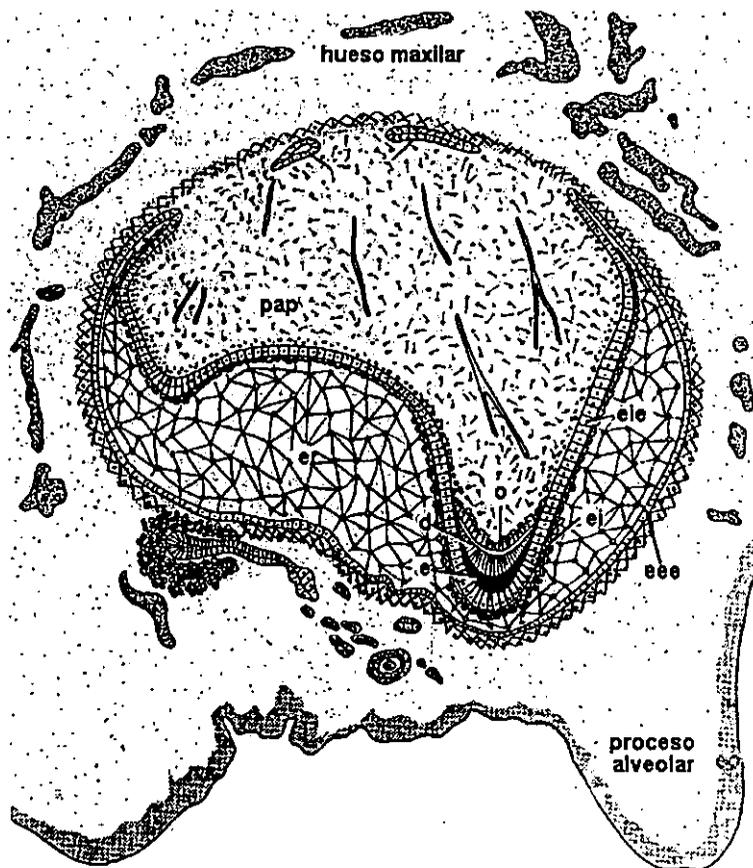


Fig. 1.4 Esquema de la formación del diente y sus estructuras. (d) dentina, (e) esmalte, (eie) epitelio interno del esmalte, (eee) epitelio externo del esmalte (o) odontoblasto, (pap) papila, (ei) estrato intermedio, (er) estrato reticular. <sup>(3)</sup>

A medida que se forma la matriz, el odontoblasto comienza a moverse hacia el centro de la pulpa. Mientras lo hace, una de las cortas prolongaciones a la que se hizo mención antes se hace más evidente y es dejada por detrás formando la extensión principal de la célula, la prolongación o proceso odontoblástico (en la Fig. 1.5, puede observarse un odontoblasto viajando a lo largo de un túbulo dentinario). Es dentro de este medio que se depositan los cristales de apatita. Primero aparecen dentro de la vesícula de la matriz como cristales únicos que crecen rápidamente y que se rompen a partir de bordes de la vesícula para esparcirse como un racimo de cristalitos, hasta que se unen con racimos adyacentes para formar la matriz ya mineralizada por completo. A medida que se depositan, los cristalitos de apatita, enmascaran las fibrillas colágenas de la matriz. De esta manera, se formará la dentina del manto coronal <sup>(4)</sup>.

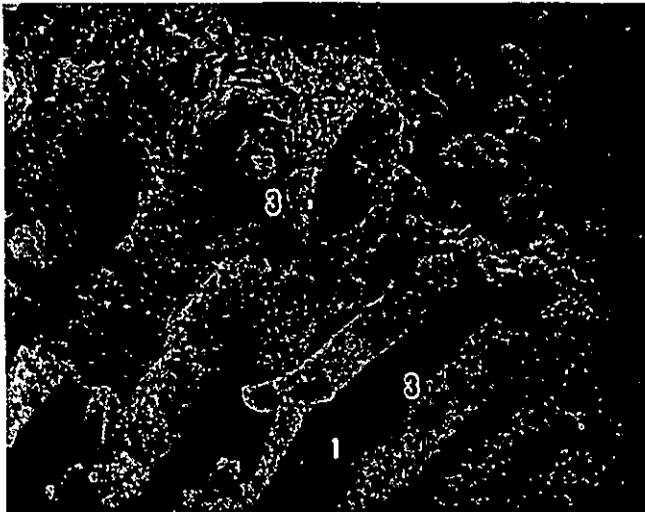


Fig. 1.5 Imagen de MEB, donde se aprecia una prolongación odontoblástica (2) dentro del túbulo dentinario (1) y la dentina intertubular (3). <sup>(31)</sup>

## **Formación de dentina radicular**

La dentina radicular se forma en un estadio ligeramente posterior de desarrollo.

Para la formación de la dentina radicular se requiere que el epitelio del borde cervical del órgano dentario, prolifere alrededor de la papila dentaria formando una vaina de células epiteliales denominada vaina epitelial radicular de Hertwig. Esta inducirá la diferenciación de las células ectomesenquimales de la papila dentaria, de la futura zona radicular en odontoblastos, los cuales comenzaron el proceso de dentinogénesis radicular.

El comienzo de formación de la raíz precede ligeramente al comienzo de la erupción dentaria. Cuando el diente alcanza su posición funcional, se ha formado alrededor de dos tercios de la dentina radicular.

La formación de la raíz no finaliza en los dientes deciduales hasta los 18 meses después de que el diente ha erupcionado hacia el interior de la cavidad bucal y en los dientes permanentes alrededor de los dos o tres años después de que hayan erupcionado. La velocidad de aposición de la dentina en la raíz es generalmente menor que la de aposición de la dentina en la corona de un mismo diente <sup>(7)</sup>. (Fig. 1.6)

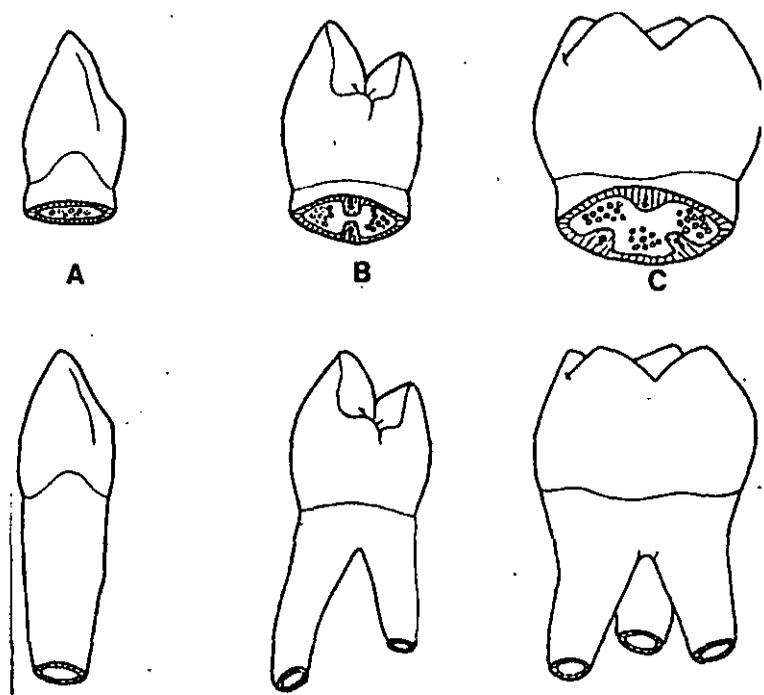


Fig. 1.6. Esquema de la formación de la raíz en un diente anterior (A), un premolar (B) y un molar (C).<sup>(33)</sup>

**Dentina del manto.**

Es un término utilizado para describir la dentina primaria que se forma en un diente. Esta dentina constituye una capa de 20 micrómetros de espesor aproximadamente y esta formada por fibrillas gruesas de colágena, producidas por los odontoblastos. En la corona del diente, esta dentina contiene fibrillas, en forma perpendicular a la unión dentina-esmalte y paralelas a los túbulos dentinales. En la raíz, la dentina del manto contiene fibras colágenas gruesas,

gruesas, orientadas paralelamente a la interfase entre cemento y dentina y perpendiculares a los túbulos dentinales <sup>(6)</sup>.

En la dentina del manto encontramos fibras con afinidad por la plata, se conocieron originalmente como fibras de von Korff, y se creyó que representaban haces específicos de fibras colágenas. Ahora las fibras de von Korff, que solo aparecen durante las primeras fases de la dentinogénesis, se considera como sustancia fundamental amorfa rica en carbohidratos. Por lo tanto la dentina del manto es rica en sustancia fundamental amorfa o sea glucosaminoglucanos, antiguamente llamados mucopolisacaridos ácidos <sup>(4)</sup>.

### **Dentina circumpulpar.**

Las características de las fibrillas de colágena que forman la matriz son diferentes.

Las fibrillas que forman la matriz de la dentina circumpulpar en comparación con las de la dentina del manto son más pequeñas en diámetro (50nm), mas estrechamente empaquetadas y entremezcladas, las unas con las otras y se encuentran alineadas, generalmente en ángulo recto respecto de los túbulos dentinarios. (Fig. 1.7)

Toda la sustancia fundamental de la dentina circumpulpar es un producto exclusivo del odontoblasto esto es debido al estrecho empaquetamiento de la

capa celular odontoblástica y nada de la sustancia fundamental de la papila dentaria esta incorporada. Por otro lado la matriz de la dentina del manto se constituye por incorporación parcial de sustancia fundamental preexistente de la zona acelular.

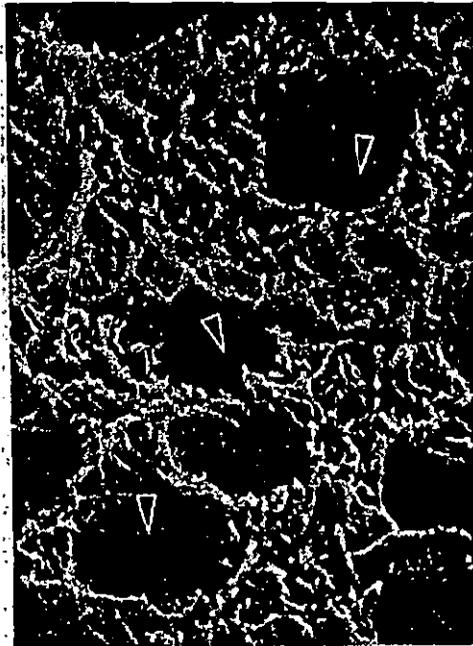


Fig. 1.7 Imagen de la dentina por MEB, donde se observa a la dentina circumpulpar descalcificada. Las fibras colágenas forman una matriz densamente empaquetada que rodea a los tubulos dentinales (flechas).<sup>(6)</sup>

El patrón de mineralización de la dentina circumpulpar y la del manto es ligeramente diferente, ya que en la dentina circumpulpar no hay vesículas matriciales presentes a medida que se forma la dentina circumpulpar, la mineralización implica nucleación heterogénea, nucleación secundaria y crecimiento cristalino.

A pesar de esas diferencias entre la formación de la dentina circumpulpar y la de la dentina del manto, el resultado final de la odontogénesis en ambas dentinas es:

- a) La producción de la matriz mineralizada con cristales de hidroxiapatita a través de la cual corren prolongaciones odontoblasticas, ocupando el interior de los túbulos dentinales.
  
- b) Siempre la formación de una capa no mineralizada de dentina (denominada matriz dentinaria, dentinoide o predentina) se formará subyacente a la capa de dentina mineralizada.

### **Dentina intertubular**

Es la matriz de dentina situada entre los túbulos dentinales <sup>(6)</sup>.

### **Dentina peritubular**

Es la dentina que rodea directamente el espacio periodontoblástica del túbulo dentinal. Este espacio se localiza entre las prolongaciones odontoblasticas y la pared interna de los túbulos dentinales. Es la parte de la dentina mejor mineralizada <sup>(6)</sup>. (Fig. 1.8 donde se aprecia los dos tipos de dentinas antes mencionadas, peritubular e intertubular).

La aposición de la dentina coronaria se hace a una velocidad de alrededor de 4 a 8 micrómetros por día de manera física o incremental. A medida que se forma nueva dentina, hay cambios ulteriores dentro de la dentina previamente formada <sup>(4)</sup>.

La prolongación odontoblástica disminuye de diámetro y es responsable de la aposición de una capa de dentina más altamente mineralizada alrededor de sí misma, en el espacio así creado. Esa capa de dentina hipermineralizada es la dentina peritubular, en humanos esta dentina forma una estructura bien demarcada y altamente mineralizada (Vaina de Newman) alrededor del túbulo dentinal, de 0.5 a 1 micrometros de grosor <sup>(4)</sup>.

La matriz orgánica de la dentina peritubular es virtualmente desprovista de estructuras fibrosas.

### **Mineralización**

La continua mineralización de la matriz de la dentina peritubular resulta de la aposición de cristalitos de apatita alrededor de las fibrillas colágenas y dentro de ellas. En realidad la dentina peritubular es intertubular, esta es depositada sobre el interior de la superficie de la luz de largos túbulos por la subsecuente formación de los odontoblastos de dentina intertubular <sup>(3)</sup>.

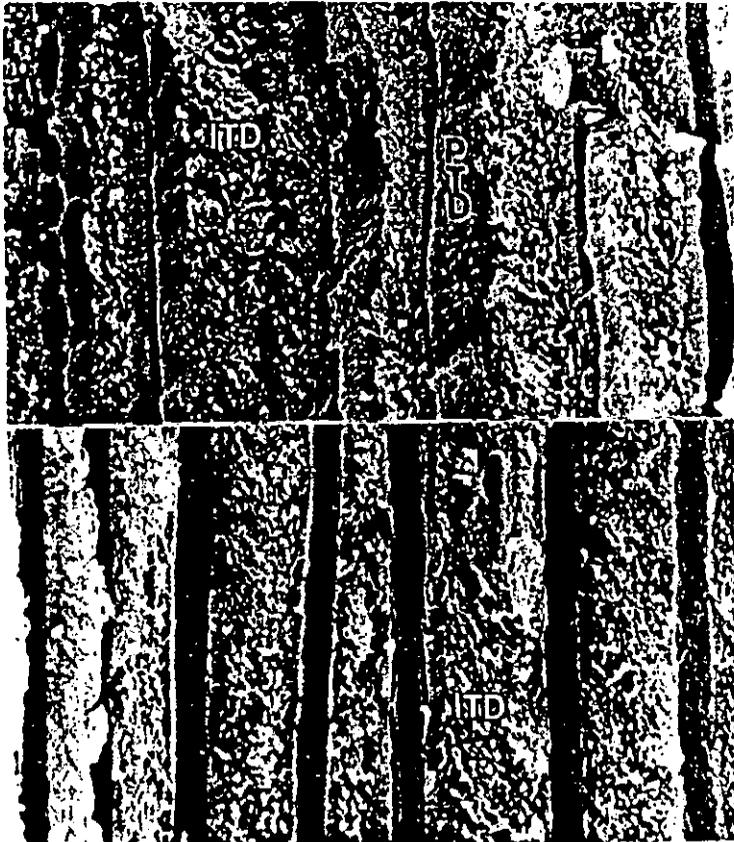


Fig. 1.8 Imagen de Barrido en la que se aprecia a la Dentina Intertubular (ITD) y a la dentina Peritubular (PTD).

La calcificación lineal indica la deposición de cristales a lo largo de un frente ininterrumpido, y es el patrón principal de mineralización hallado en la dentina del manto una vez que los cristallitos originados en las vesículas matriciales han hecho coalescencia. La calcificación globular, por calcoferitos, es la aposición de cristales en varias zonas de la matriz al mismo tiempo. Al continuar la mineralización, se

desarrollan masas globulares que se agrandan y oportunamente se fusionan para formar una sola masa calcificada. Este tipo de mineralización se ve principalmente en la dentina circumpulpar formada justo por debajo de la dentina del manto. En el resto de la dentina circumpulpar hay un patrón combinado de calcificación con una fase globular alternando con una fase lineal <sup>(2)</sup>.

La mineralización de la dentina se verifica en etapas o fases, cada una de las cuales se representa en los cortes como una línea incremental. Las técnicas de alta resolución han revelado que los cristales son estructuras paralelepipedas con dimensiones de 36 X 26 X 10 nm <sup>(4)</sup>.

En la capa de células formadoras de matriz orgánica de colágeno se deposita un fosfato calcico inorgánico en forma de cristales minerales.

Las técnicas de Microscopía Electrónica de Alta Resolución indican que los cristales se forman por superficies planas paralelepipedas, y el crecimiento completo de cristalización se lleva a cabo en la superficie de las fibras colágenas, las cuales tienen 100 a 120 nm de diámetro, este periodo en banda es conocido como la organización de la fase mineral. De este modo los cristales están localizados en la superficie de la fibra o en los espacios libres entre las subunidades de las fibras <sup>(2)</sup>.

La fase mineral esta compuesta principalmente por Hidroxiapatita, pero también es rica en magnesio y carbonatos. Las deficiencias e irregularidades en la

mineralización se hallan usualmente en la dentina y se ven como líneas incrementales y como áreas de dentina, conocidas como dentina interglobular (o espacios interglobulares de Czermak), donde los calcoferitos no se han fusionado por completo.

## II. FUNDAMENTOS DE CRISTALOGRAFIA

La aplicación del fenómeno de difracción en cristales ha sido la herramienta más importante para elucidar la estructura cristalina de la materia. La clasificación de los grupos de simetría espaciales y el desarrollo de la teoría de la difracción le han dado cuerpo a lo que conocemos como cristalografía. La cristalografía estudia el arreglo geométrico de los átomos en los cristales.

### Cristales

Un cristal esta basado en un sistema tridimensional, aunque, para una mejor visualización de éste, se hará referencia al concepto en dos dimensiones llamado mosaico. El mosaico tiene la propiedad de ser periódico; es decir, consiste de un motivo fundamental que se repite periódicamente (Fig. II.1) por lo tanto, a todo mosaico le podemos asociar una red de la siguiente manera:

1. Seleccionamos un punto al azar en el mosaico.
2. Encontramos todos los puntos de idéntica posición en el motivo que se repite.

mineralización se hallan usualmente en la dentina y se ven como líneas incrementales y como áreas de dentina, conocidas como dentina interglobular (o espacios interglobulares de Czermak), donde los calcoferitos no se han fusionado por completo.

## II. FUNDAMENTOS DE CRISTALOGRAFIA

La aplicación del fenómeno de difracción en cristales ha sido la herramienta más importante para elucidar la estructura cristalina de la materia. La clasificación de los grupos de simetría espaciales y el desarrollo de la teoría de la difracción le han dado cuerpo a lo que conocemos como cristalografía. La cristalografía estudia el arreglo geométrico de los átomos en los cristales.

### **Cristales**

Un cristal esta basado en un sistema tridimensional, aunque, para una mejor visualización de éste, se hará referencia al concepto en dos dimensiones llamado mosaico. El mosaico tiene la propiedad de ser periódico; es decir, consiste de un motivo fundamental que se repite periódicamente (Fig. II.1) por lo tanto, a todo mosaico le podemos asociar una red de la siguiente manera:

1. Seleccionamos un punto al azar en el mosaico.
2. Encontramos todos los puntos de idéntica posición en el motivo que se repite.

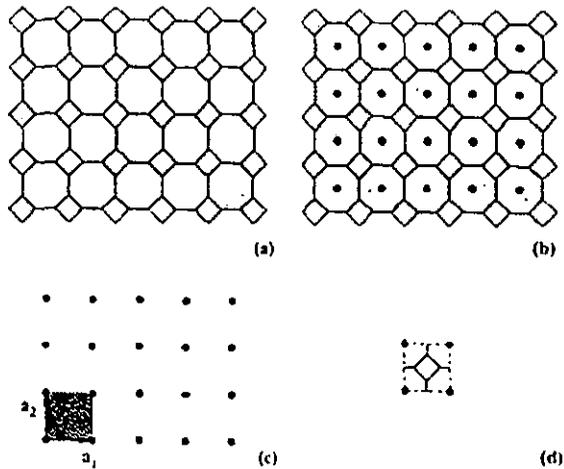


Fig. II.1 Mosaico periódico (a) y su red de bravais asociado (b), la celda unitaria se muestra sombreada en (c), y la decoración en (d)

La red no es más que una colección de puntos en el espacio que, al igual que el mosaico, es periódica, y se genera por la traslación regular de puntos en el espacio. Al igual que el mosaico, la red se genera por las traslaciones de una unidad (paralelepipedo) que se conoce como **celda unitaria**.

La celda unitaria puede contener un punto en su interior, en tal caso se denomina **centrada**. Si su interior se encuentra vacío, se trata de una celda **primitiva**.

Al contenido de la celda unitaria se le llama decoración. Si conocemos la red y la decoración de la celda unitaria, podemos reproducir el mosaico de la siguiente manera:

MOSAICO = RED BIDIMENSIONAL + DECORACION.

Un cristal real consiste de un arreglo tridimensional periódico de átomos que, como los mosaicos, pueden describirse con una red tridimensional más una decoración o unidad estructural. La decoración en este caso consiste de un grupo de átomos o de un único átomo. El cristal, por lo tanto, se forma de la siguiente manera

CRISTAL= RED TRIDIMENSIONAL+DECORACION ATOMICA

### **Redes de Bravais**

Existen 14 formas de acomodar los puntos en las redes cristalinas, de tal modo que todos los puntos de dichas redes tengan exactamente el mismo medio circundante. Estas redes reticulares reciben un nombre especial: **Red de Bravais**. Una red de Bravais es necesariamente periódica y describe todas las formas geométricas que un cristal puede presentar. (Fig. 11.2, donde se muestran las redes en los casos tridimensionales).

Para estudiar el grupo puntual de alguna de las redes de Bravais es suficiente con analizar la simetría puntual de su celda unitaria. La combinación de un grupo puntual con la simetría de una red da lugar al *grupo espacial*. En el caso de dos dimensiones, en un mosaico, el grupo puntual de la decoración debe mostrar una de las 10 posibles simetrías. Combinando esta simetría con la simetría de la red observamos que sólo existen 17 grupos espaciales en el plano; 13 se obtienen por simple localización de los elementos de simetría de los 10 grupos puntuales en las redes de Bravais y las otras 4 a partir de operaciones compuestas entre reflexión y rotación.

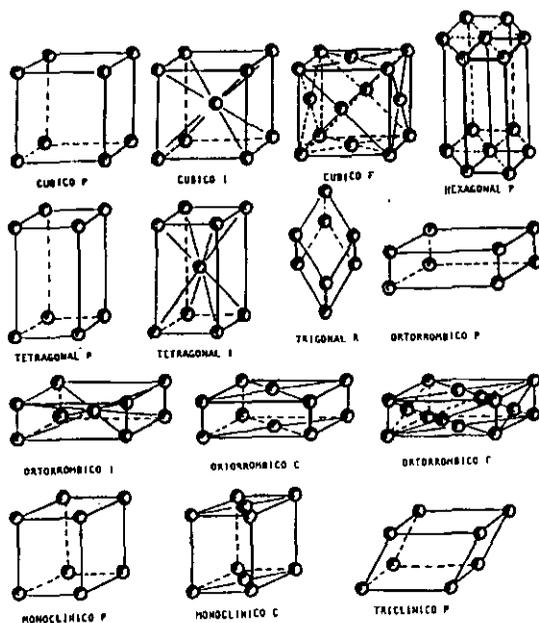


Fig. II.2 Redes de Bravais en el caso tridimensional y el sistema cristalino al que pertenecen.(22)

Existen 32 grupos puntuales distintos en 3 dimensiones que una estructura cristalina puede tener. A cada grupo puntual cristalográfico tridimensional que pueda expresarse en términos de uno de los 6 conjuntos de ejes cristalográficos se le llama un **sistema cristalino**.<sup>(21)</sup>

En el espacio, los grupos espaciales en 3 dimensiones son un total de 230. estos se pueden consultar en las tablas internacionales de rayos x. (Fig. II.3)

Sistema	Grupo puntual	Grupos espaciales					
Triclínico	1	$P1$					
Monoclínico	2 2/m	$P2_1$ $C2/m$	$C2$ $C2/m$	$C2$ $C2/m$	$C2$ $C2/m$	$C2/m$ $C2/m$	$C2/m$ $C2/m$
Ortorrombica	222	$P222$ $F222$	$C222$ $I222$	$P2_12_12_1$ $I2_12_12_1$	$P2_12_12_1$ $I2_12_12_1$	$C222$ $I222$	$C222$ $I222$
	mmm	$Pmm2$ $Fmm2$ $Ccm2$ $Fcm2$	$Pmc2_1$ $Fmc2_1$ $Cmc2_1$ $Fmc2_1$	$P2_12_12_1$ $F2_12_12_1$ $C2_12_12_1$ $F2_12_12_1$	$P2_12_12_1$ $F2_12_12_1$ $C2_12_12_1$ $F2_12_12_1$	$C222$ $I222$ $C222$ $I222$	$Pmc2_1$ $Cmc2_1$ $Fmm2$ $Pmm2$
	mmm	$Pmmm$ $Fmmm$ $Cmmm$ $Fmmm$ $Immm$	$P2_12_12_1$ $F2_12_12_1$ $C2_12_12_1$ $F2_12_12_1$ $I2_12_12_1$	$P2_12_12_1$ $F2_12_12_1$ $C2_12_12_1$ $F2_12_12_1$ $I2_12_12_1$	$P2_12_12_1$ $F2_12_12_1$ $C2_12_12_1$ $F2_12_12_1$ $I2_12_12_1$	$P2_12_12_1$ $F2_12_12_1$ $C2_12_12_1$ $F2_12_12_1$ $I2_12_12_1$	$P2_12_12_1$ $F2_12_12_1$ $C2_12_12_1$ $F2_12_12_1$ $I2_12_12_1$
Tetragonal	4	$P4$	$P4$	$P4/m$	$P4$	$P4$	$P4$
	2	$P4/m$	$P4/m$	$P4/m$	$P4/m$	$P4/m$	$P4/m$
	4/m	$P4/m$	$P4/m$	$P4/m$	$P4/m$	$P4/m$	$P4/m$
Tetragonal	422	$P422$ $F422$	$P422$ $F422$	$P422$ $F422$	$P422$ $F422$	$P422$ $F422$	$P422$ $F422$
	4mm	$P4mm$ $F4mm$ $P4/m$	$P4mm$ $F4mm$ $P4/m$	$P4mm$ $F4mm$ $P4/m$	$P4mm$ $F4mm$ $P4/m$	$P4mm$ $F4mm$ $P4/m$	$P4mm$ $F4mm$ $P4/m$
	4/mmm	$P4/mmm$ $F4/mmm$ $P4/mmm$ $F4/mmm$	$P4/mmm$ $F4/mmm$ $P4/mmm$ $F4/mmm$	$P4/mmm$ $F4/mmm$ $P4/mmm$ $F4/mmm$	$P4/mmm$ $F4/mmm$ $P4/mmm$ $F4/mmm$	$P4/mmm$ $F4/mmm$ $P4/mmm$ $F4/mmm$	$P4/mmm$ $F4/mmm$ $P4/mmm$ $F4/mmm$
Trigonal	3	$P3$	$P3$	$P3$	$P3$	$P3$	$P3$
	2	$P3$	$P3$	$P3$	$P3$	$P3$	$P3$
	32	$P32$ $R32$	$P32$ $R32$	$P32$ $R32$	$P32$ $R32$	$P32$ $R32$	$P32$ $R32$
Hexagonal	6	$P6$	$P6$	$P6$	$P6$	$P6$	$P6$
	3	$P6$	$P6$	$P6$	$P6$	$P6$	$P6$
	6/m	$P6/m$	$P6/m$	$P6/m$	$P6/m$	$P6/m$	$P6/m$
Hexagonal	622	$P622$ $F622$	$P622$ $F622$	$P622$ $F622$	$P622$ $F622$	$P622$ $F622$	$P622$ $F622$
	6mm	$P6mm$ $F6mm$ $P6/m$	$P6mm$ $F6mm$ $P6/m$	$P6mm$ $F6mm$ $P6/m$	$P6mm$ $F6mm$ $P6/m$	$P6mm$ $F6mm$ $P6/m$	$P6mm$ $F6mm$ $P6/m$
	6/mmm	$P6/mmm$ $F6/mmm$ $P6/mmm$ $F6/mmm$	$P6/mmm$ $F6/mmm$ $P6/mmm$ $F6/mmm$	$P6/mmm$ $F6/mmm$ $P6/mmm$ $F6/mmm$	$P6/mmm$ $F6/mmm$ $P6/mmm$ $F6/mmm$	$P6/mmm$ $F6/mmm$ $P6/mmm$ $F6/mmm$	$P6/mmm$ $F6/mmm$ $P6/mmm$ $F6/mmm$
Cúbica	23	$P23$ $Fm3$	$P23$ $Fm3$	$P23$ $Fm3$	$P23$ $Fm3$	$P23$ $Fm3$	$P23$ $Fm3$
	m3	$P23$ $Fm3$ $Ia3$	$P23$ $Fm3$ $Ia3$	$P23$ $Fm3$ $Ia3$	$P23$ $Fm3$ $Ia3$	$P23$ $Fm3$ $Ia3$	$P23$ $Fm3$ $Ia3$
	432	$P432$ $F432$	$P432$ $F432$	$P432$ $F432$	$P432$ $F432$	$P432$ $F432$	$P432$ $F432$
Cúbica	32	$P432$ $F432$	$P432$ $F432$	$P432$ $F432$	$P432$ $F432$	$P432$ $F432$	$P432$ $F432$
	m3	$P432$ $F432$ $Ia3$	$P432$ $F432$ $Ia3$	$P432$ $F432$ $Ia3$	$P432$ $F432$ $Ia3$	$P432$ $F432$ $Ia3$	$P432$ $F432$ $Ia3$
	m3m	$P432$ $F432$ $Ia3$ $Fm3m$	$P432$ $F432$ $Ia3$ $Fm3m$	$P432$ $F432$ $Ia3$ $Fm3m$	$P432$ $F432$ $Ia3$ $Fm3m$	$P432$ $F432$ $Ia3$ $Fm3m$	$P432$ $F432$ $Ia3$ $Fm3m$

Fig. II.3 Tabla donde se muestran los 32 grupos puntuales y los 230 grupos espaciales <sup>(10)</sup>, en los que se clasifican cristalográficamente todos los materiales existentes.

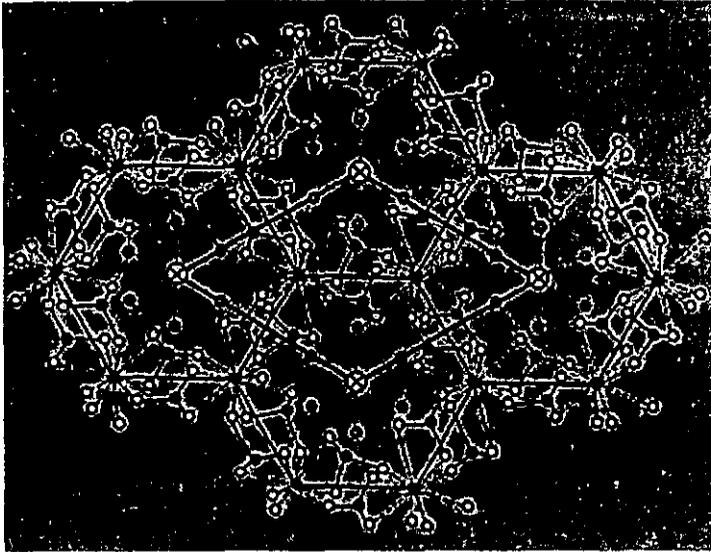
### III. ESTRUCTURA Y CRISTALOGRAFIA DE LA HIDROXIAPATITA.

La hidroxiapatita es un fosfato de calcio, el principal componente inorgánico de esmalte, dentina, cemento radicular y hueso <sup>(12,13,14)</sup>. De acuerdo a lo reportado por Gross et al.<sup>(23)</sup> 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.

De las apatitas biológicas, la hidroxiapatita es la más conocida, pero se sabe que en forma natural no es completamente pura puesto que permite con facilidad el acomodo de átomos de impureza en su celda unitaria <sup>(24)</sup>.

La hidroxiapatita puede presentarse tanto como celda unitaria hexagonal como monocíclica <sup>(21)</sup>. La principal diferencia entre los sistemas hexagonal y monocíclicos es la ausencia de desorden estadístico en los sitios OH. Se presume que la hidroxiapatita pura se presenta con una celda unitaria monocíclica. Sin embargo la estructura hexagonal, descrita por la fórmula  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , es mucho más abundante en la naturaleza.

La hidroxiapatita con sistema hexagonal <sup>(15,16, 17)</sup> tiene un grupo espacial  $P6_3/m$  con parámetros de red  $a=0.942\text{nm}$ ,  $c=0.688\text{nm}$  (Fig. III.3).



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

Figura III.1 La estructura hexagonal de la hidroxiapatita en la dirección [001], donde se observan las posiciones de los átomos de Ca, P, O, H. <sup>(24)</sup>

En la Fig. III.1 se muestra el sistema hexagonal de la hidroxiapatita, la zona marcada con la línea oscura muestra la celda unitaria en donde se incluye 10 átomos de calcio, 6 grupos de fosfato (PO<sub>4</sub>) y 2 grupos oxhidrilos (OH). En la Fig.

III.2 los grupos oxhidrilos se encuentran ubicados en las esquinas de la celda unitaria.

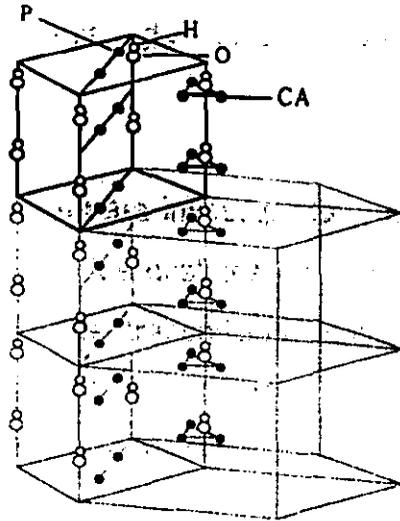


Fig. III.2 Estructura de la Hidroxiapatita en la cual se pueden observar la posición de los elementos dentro de su estructura. Nótese el eje helicoidal que forman los hidroxilos, así como las posiciones de los fosfatos. Esto es lo que define al grupo espacial  $P6_3/m$ .<sup>(24)</sup>

Los diez átomos de calcio están definidos como calcio 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); 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 grupos PO4

están ordenados alrededor de los grupos OH ubicados en las esquinas de la celda unitaria. (Fig. III.2) <sup>(17)</sup>.

d	2.81	2.78	2.72	2.17	$Ca_5(PO_4)_3(OH)$ $1/2(Ca(OH)_2 \cdot 3Ca_3(PO_4)_2)$		★			
I/I <sub>1</sub>	100	60	60	11	CALCIUM HYDROXIDE ORTHOPHOSPHATE (HYDROXYAPATITE)					
Rad. CuK <sub>α</sub>	λ 1.5405	Filter	Dia. 114.6MM							
Cut off S <sub>0</sub>	I/I, PHOTOMETER <sup>a</sup>	(GUINIER CAMERA)			d Å	I/I <sub>1</sub>	hkl	d Å	I/I <sub>1</sub>	hkl
Ref. DEROLFF, TECHN. PHYS. DIENST, DELFT, HOLLAND										
Sys. HEXAGONAL	S.G. P6 <sub>3</sub> /m (176)									
a <sub>0</sub> 9.418	b <sub>0</sub>	c <sub>0</sub> 6.884 <td>A <td>C 0.7309</td> <td colspan="6"></td> </td>	A <td>C 0.7309</td> <td colspan="6"></td>	C 0.7309						
a	β <td>γ <td>Z 2</td> <td>Dz 3.16</td> <td colspan="6"></td> </td>	γ <td>Z 2</td> <td>Dz 3.16</td> <td colspan="6"></td>	Z 2	Dz 3.16						
Ref. Ig.D.										
±ε	n <sub>ωβ</sub>	I <sub>γ</sub>	Sign							
±V	D 3.08	mp	Color							
Ref.										
<sup>a</sup> I/I <sub>1</sub> ARE PEAK VALUES FROM A PATTERN WHICH SHOWS SLIGHT BROADENING OF PRISM REFLECTIONS. SAMPLE OBTAINED FOLLOWING THE PROCEDURE INDICATED BY HODGE C.S., IND. ENG. CHEM. ANAL. ED. 10 156 (1938).					8.17	12	100	2.060	2	400
					5.28	6	101	2.000	6	203
					4.72	4	110	1.943	30	222
					4.07	10	200	1.890	16	312
					3.88	10	111	1.871	6	320
					3.51	2	201	1.841	40	213
					3.44	40	002	1.806	20	321
					3.17	12	102	1.780	12	410
					3.08	18	210	1.754	16	402,303
					2.814	100	211	1.722	20	004,411
					2.778	60	112	1.684	4	104
					2.720	60	300	1.644	10	322,223
					2.631	25	202	1.611	8	313
					2.528	4	301	1.587	4	501,204
					2.296	8	212	1.542	6	420
					2.262	20	310	1.530	6	331
					2.228	2	221	1.500	10	214,421
					2.148	10	311	1.474	12	502
					2.134	4	302	1.462	4	510
					2.065	8	113	PLUS ADDITIONAL LINES		

Figura III.3 Tabla internacional de Rayos X de la Hidroxiapatita en donde se muestra su estructura hexagonal <sup>(34)</sup>, y otros parámetros importantes para su caracterización por técnicas de Rayos X.

#### IV. TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE LA DENTINA

##### Microscopía fotónica

No podemos hablar de técnicas de microscopía fotónica, sin antes recordar como es un microscopio fotónico o de luz y sus componentes.

El microscopio fotónico.

El microscopio compuesto esta formado por tres sistemas:

1. Sistema de iluminación
2. Sistema óptico
3. Sistema mecánico. (Fig. IV.1)

1. El sistema de iluminación.

### *Lámpara.*

La fuente de iluminación proviene de una lámpara incorporada de bajo voltaje, la cual genera luz que pasa a través de la lente colectora y le permite seguir un camino vertical ascendente pasando por el diafragma de campo hacia el condensador.

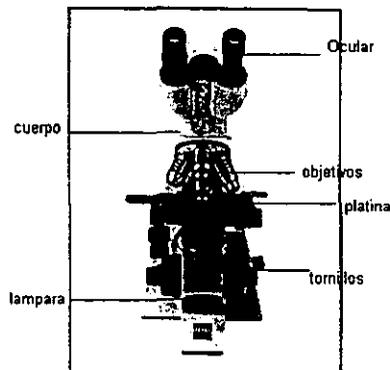


Fig. IV.1 Imagen en la cual se aprecian las partes del Microscopio fotónico. <sup>(8)</sup>

### *Diafragma de campo.*

Este se encuentra situado en la base del microscopio y cuya función es de regular el diámetro de la emisión de la luz a fin de que se ilumine sólo el área de campo visual.

## 2. Sistema óptico.

### *Condensador.*

Este sistema de lentes es capaz de agrupar todos los rayos de luz que inciden sobre el, y los dirige hacia el plano focal del objetivo. El condensador más utilizado es el condensador de Abbe.

### *Objetivo.*

Parte óptica esencial en un microscopio, la cual permite obtener el aumento inicial del objeto, estos van desde el 5x, 10x, 20x, 50x y 100x, puede además utilizarse objetivos de inmersión ó secos.

### *Ocular.*

Es la parte óptica final externa, situados en el tubo a través de los cuales se obtiene la imagen final. Los oculares tienen aumento propio y estos pueden ser de 4x, 5x, 6.3x, 8x, 10x, 12.5x, 16x, 20x ó 25x.

### 3. El sistema mecánico.

Este formado por:

Base, Mandos coaxiales de enfoque, platina y revolver <sup>(9)</sup>.

Técnicas para microscopia fotónica.

#### *Campo claro*

En esencia el microscopio de campo claro consiste en una fuente luminosa, un condensador que enfoca los rayos de luz sobre la muestra, una platina sobre la cual se coloca la muestra, un objetivo y un ocular a través del cual se puede observar directamente el espécimen.

La muestra que se va a observar con el microscopio óptico debe ser bastante fina como para que la luz pueda atravesarla. Al pasar por la muestra, parte de la luz es absorbida y la diferencia de absorción de la luz en diferentes partes del espécimen producen contrastes que revelan detalles de su estructura. (Fig. IV.2)

La utilidad del microscopio fotónico reside en su capacidad de ampliación y, lo que es más importante, su capacidad de resolver detalles estructurales. El poder de resolución es la capacidad de una lente o sistema óptico de producir imágenes separadas de objetos que se encuentran muy próximos. El grado de

resolución depende no sólo del sistema óptico sino también de la longitud de onda de la fuente luminosa y de otros factores como el grosor del espécimen <sup>(25)</sup>.

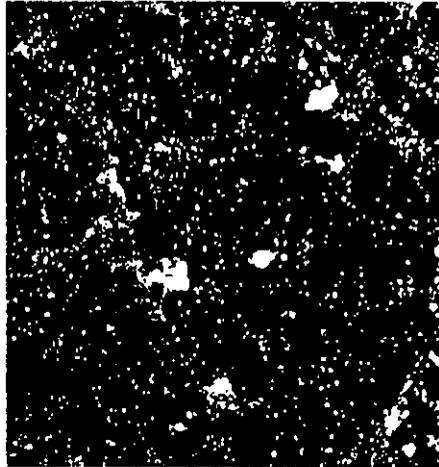


Fig. IV.2 Fotografía de cromo-magnesio, iluminación de campo claro. <sup>(37)</sup>

### *Contraste de fases.*

El índice de refracción de un medio se correlaciona en forma inversa con la velocidad de propagación de la luz, cuanto mayor sea el índice de refracción, menor será dicha velocidad. Esta propiedad se aprovecha en la técnica que a continuación se describe que de otra manera serían poco visibles.

Cuando un haz de luz incide sobre dos estructuras transparentes A y B, que poseen índices de refracción distintos y espesores iguales, la onda que atraviesa la capa B se retrasa, en relación a la onda que atraviesa la capa A. El ojo no

percibe este retraso y los dos medios parecen igualmente transparentes. (Fig. IV.3)

En la técnica de contraste de fases se introducen elementos ópticos para aprovechar la diferencia de retrasos que se originan por las diferencias en índices de refracción del objeto. Para ello, se separa la radiación directa de la difractada y se produce en esta última un retraso de fase respecto a la primera para formar una imagen con la suma de las dos. Los pequeños cambios de fase que se producen en el objeto se amplían y se traducen en cambios de intensidad en la imagen, viéndose estas partes más o menos oscuras.

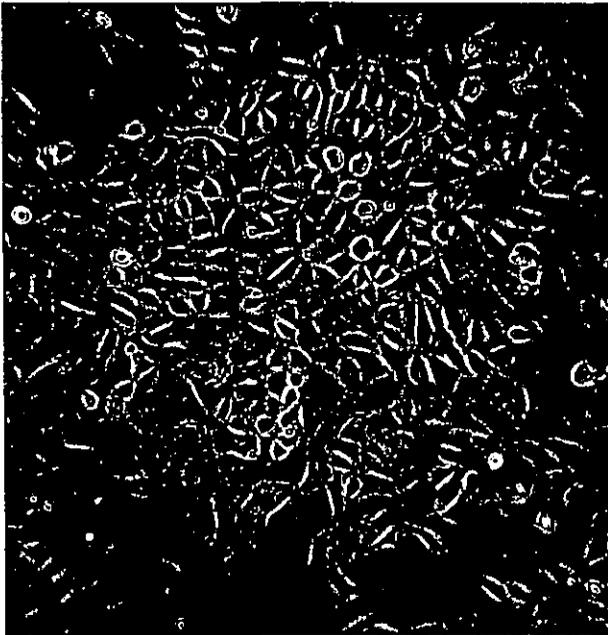


Fig. IV.3 Células V79, línea de células permanentes, imagen de contraste de fases. <sup>(39)</sup>

Dentro del condensador se monta un diafragma anular dentro del objetivo. En este objetivo se encuentra otro diafragma anular Ph1, Ph2 o Ph3, que es un filtro neutro en forma de anillo.

La radiación difractada procedente del objeto atraviesa el anillo Ph en la zona semitransparente en donde se introduce un retraso adicional; esta diferencia es un retraso de aproximadamente  $\frac{1}{4}$  de longitud de onda. <sup>(9)</sup> (Fig. IV.4)

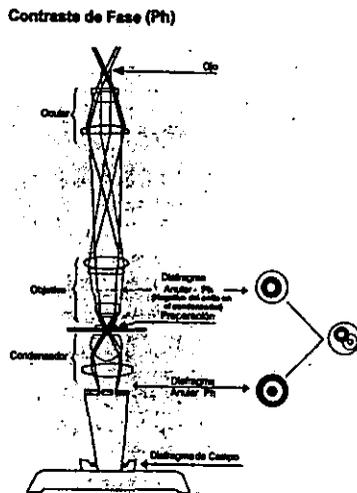


Fig. IV.4 Esquema de la dirección de la luz en un microscopio de contraste de fase. <sup>(9)</sup>

*Campo oscuro.*

La microscopia de campo oscuro emplea dos tipos especiales de condensadores: paraboide y carboide. La preparación se ilumina con un haz de luz, suficientemente fino, bajo un ángulo agudo de forma que no incida en la lente

frontal del objetivo. El campo aparecerá uniformemente oscuro y cada partícula se verá como un punto luminoso por efecto de difusión de la luz que incide sobre ella.

(Fig. IV.5)

La apertura numérica del objetivo tiene que ser suficientemente baja para excluir la luz directa del condensador.



Fig. IV.5 Fotografía de Perlita de campo oscuro. <sup>(38)</sup>

### *Fluorescencia.*

Es la luminosidad de una sustancia causada por su exposición a una radiación de longitud de onda específica a la que se denomina radiación excitada.

La luz fluorescente emitida tiene una longitud de onda más larga que la radiación con la cual se irradia la sustancia fluorescente.

La radiación fluorescente tiene menor energía que la radiación inicial o de excitación. Como sabemos existe una relación inversa de la energía de radiación y la longitud de onda: las radiaciones luminosas y térmicas de longitud de onda larga tienen menos fuerza de penetración que las de longitud de onda corta, que son más ricas en energía, como los rayos gamma o rayos X <sup>(9)</sup>.

Consecuentemente una sustancia fluorescente puede ser excitada por una radiación invisible como la UV para ser vista en el espectro visible. (Fig. IV.6)



Fig. IV.6. Fotografía de células ES, de ratón, cultivo primario; imagen de epifluorescencia, coloración DAPI. <sup>(39)</sup>

También puede lograrse la fluorescencia mediante radiación azul o verde y se obtiene fluorescencia de longitud de onda más larga: fluorescencia verde, amarilla o roja (Fig. IV.7)

El microscopio de fluorescencia necesita de algunos requisitos indispensables de equipo para su funcionamiento. Estos son:

- Lámpara. Una fuente de luz que generalmente es una fuente de mercurio de alta presión, que emita la suficiente radiación de aquellas longitudes de onda requeridas para propósitos de excitación de los fluorocromos.
  
- Reflector porta filtros. En este reflector están contenidos tres filtros: filtro excitador, filtro divisor cromático y filtro barrera o emisor.
  
- Filtro excitador. Permite el paso de la radiación necesaria para lograr la excitación del fluorocromo utilizado y retiene las demás longitudes de onda no requeridas.

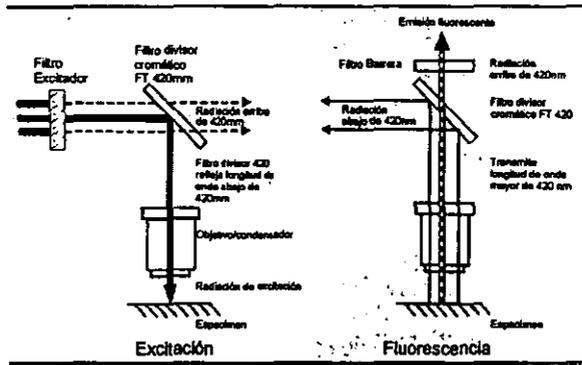


Fig. IV.7 Imagen de la dirección de la luz en un microscopio de epifluorescencia y como se transmite la emisión fluorescente. <sup>(9)</sup>

### Microscopia Electrónica de Barrido

Utilizando los electrones retrodispersados y secundarios, los cuales, como ya se indicó anteriormente, nos dan información sobre la superficie de la muestra, nos permiten de este modo obtener una imagen topográfica de ella, la cual con un detector localizado a un lado de la muestra recolectara información para la Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) (Fig. IV.8) <sup>(11)</sup>

Este instrumento está diseñado para estudiar en alta resolución la superficie de los sólidos. En este aspecto el MEB, pudiera ser comparado con el microscopio fotónico donde el MEB, posee una profundidad de foco y resolución mayores. Si esto fuera todo, aun así el MEB presentaría mayores ventajas que el Microscopio fotónico, debido a la utilización de un mayor número de señales que provienen de la interacción de los electrones con los sólidos y que nos permiten obtener mayor

información sobre, la orientación cristalina, la composición química, la estructura magnética o el potencial eléctrico del material en observación.

Con este aparato se puede formar la imagen de los detalles más profundos de la superficie de la muestra, ya que, como se mencionó, su profundidad de foco es mucho mayor que en un microscopio fotónico, razón por la cual esta técnica da una impresión más real de la tridimensionalidad.

Con los microscopios electrónicos de barrido modernos, los aumentos posibles sólo son ligeramente inferiores a los logrados con un microscopio electrónico de transmisión. Sin embargo la resolución de este tipo dependerá directamente del tamaño del haz de electrones que se emplee para barrer. En la práctica, ese tamaño es bastante pequeño, pero no podemos esperar resoluciones mayores de los 5nm. para este tipo de equipo. El MEB tiene un tipo de funcionamiento diferente respecto al MET. Está basado en el hecho de barrer la muestra con un haz electrónico de sección transversal pequeña y de alta energía y generar una imagen punto a punto de ella. Para ejemplificar esto, supóngase que tenemos una superficie a la cual bombardeamos con electrones emitidos en un punto son recolectados por medio de detectores apropiados y utilizados para modular la polarización de la rejilla de un tubo de rayos catódicos (monitor de TV). De esta manera se establece una correspondencia uno a uno entre la cantidad de electrones detectada y la intensidad del punto correspondiente en la pantalla del tubo. Si repetimos la operación varias veces y empezamos a barrer la muestra,

esa imagen punto a punto representará las características topográficas de la muestra.

Por lo tanto, la imagen en la pantalla de televisión del microscopio electrónico de barrido es un mapa de las intensidades de los electrones emitidos por la superficie de la muestra en observación.

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 ésta. Estas señales son: electrones retrodispersados, secundarios, absorbidos, Auger, transmitidos y Rayos X característicos.(Fig. IV.9)

(8)

Todas estas señales que nos envía el sólido pueden ser detectadas y amplificadas por medio de dispositivos adecuados a cada caso.

1. **Electrones retrodispersados.** Son aquellos que se desvían hacia atrás debido a dispersión elástica por los átomos de la red; por lo tanto, su energía está muy cercana al haz incidente. Estos eventos se llevan muy cerca de la superficie de incidencia, por lo que el número de electrones dispersados a un ángulo dado dependerá de la posición del área donde incide el haz (ángulo de incidencia). La intensidad del haz retrodispersado está determinada principalmente por la probabilidad de que un electrón sea absorbido, entonces podemos esperar que la intensidad del haz

retrodispersado aumente cuando se incremente el número atómico de los elementos que forman al sólido. Esto nos permite detectar zonas de diferente composición en el material.

2. **Electrones Secundarios.** Son originados en el sólido y emitidos como el resultado de excitación atómica por el haz primario y se caracteriza por tener un espectro de energías comparativamente bajo en relación al haz inicial. La emisión de secundarios depende tanto de la densidad como topografía del sólido, por lo que podemos formar con ellos imágenes parecidas a las de electrones retrodispersados.
  
3. **Electrones absorbidos.** Los electrones que pierden tal cantidad de energía que no pueden salir del sólido, podrán ser detectados si ponemos electrodos en la muestra. Esta técnica puede ser utilizada para examinar con éxito variaciones en la resistividad en juntas semiconductoras.
  
4. **Rayos X característicos y Electrones Auger.** Es de esperarse que se emitan Rayos X característicos debido a las transiciones de los electrones excitados por el haz primario, por lo que si utilizamos algún espectrómetro apropiado, y un detector tipo Geiger o un fotomultiplicador, podremos construir un perfil de intensidades y conocer los elementos que componen a la muestra, como también su concentración; es decir podemos efectuar un análisis químico.

5. Estos son electrones del haz inicial que atraviesan la muestra estudiada y llevan información sobre la estructura interna de la misma. <sup>(11)</sup>

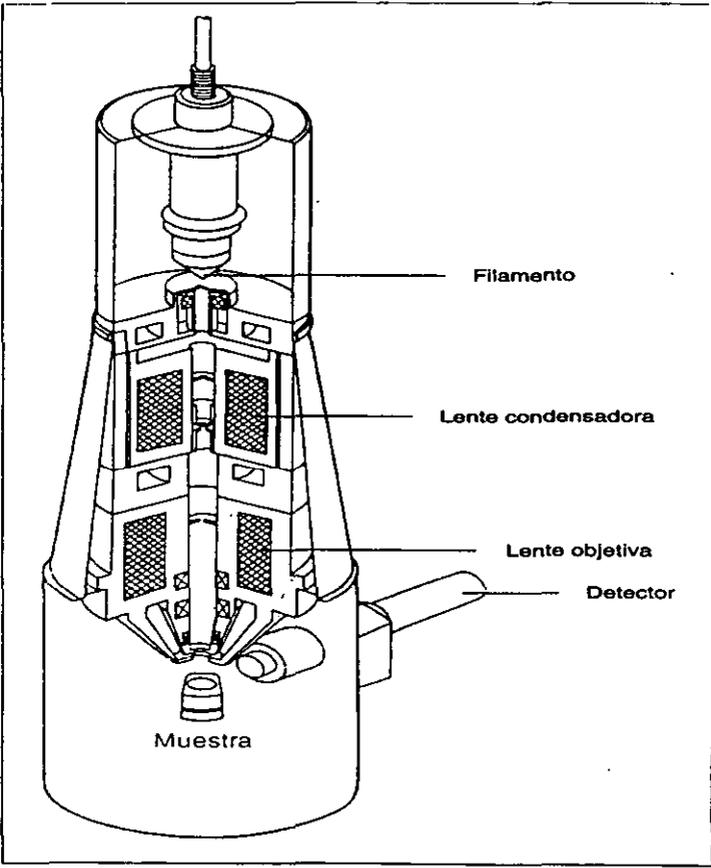


Fig. IV.8 Esquema del interior de un MEB para mostrar sus componentes así como la colocación de la muestra. <sup>(8)</sup>

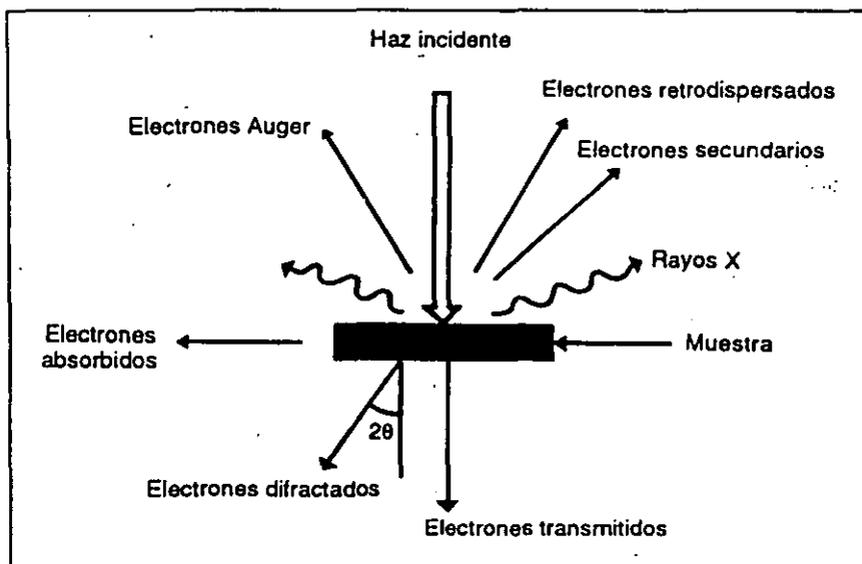


Fig. IV.9 Esquema de las señales producidas por el haz al interactuar con la muestra <sup>(8)</sup>

Los electrones retrodispersados, por ejemplo, provienen de una región que se encuentra a 0,5 micrómetros por debajo de la superficie. Por otro lado, los electrones secundarios sólo logran penetrar de 5 a 10nm por debajo de la superficie de la muestra. La resolución que se logra con electrones secundarios para formar imágenes de la superficie de la muestra es mucho mayor, por lo tanto, si queremos estudiar la superficie de la muestra, generalmente utilizaremos electrones secundarios para formar su imagen <sup>(8)</sup>

## **Microscopía Electrónica de Transmisión.**

El microscopio electrónico de transmisión consiste fundamentalmente en un cañón de electrones (su fuente de iluminación), lentes condensadoras, lente objetiva, lentes intermedias y lente proyectora. El cañón electrónico es la única lente electrostática que tiene el microscopio electrónico; las demás son lentes electromagnéticas.

Como se puede observar existe una gran analogía en la formación de imágenes de los microscopios electrónicos y fotónicos. (Fig. IV.10)

La amplificación de una imagen es llevada a cabo de la siguiente manera: la imagen producida por la lente objetiva sirve como objeto para la lente intermedia, la cual producirá una segunda imagen, que a su vez es amplificada por la lente proyectora para producir la imagen final en la pantalla o en una placa fotográfica.

Si en lugar de enfocar el plano-imagen de la lente objetiva para observar la imagen de la muestra, enfocamos el plano focal de ésta, lo que observamos es un arreglo de puntos luminosos que no son mas que el arreglo de los haces difractados y transmitidos (Fig. IV.11). Este arreglo recibe el nombre de patrón de difracción.

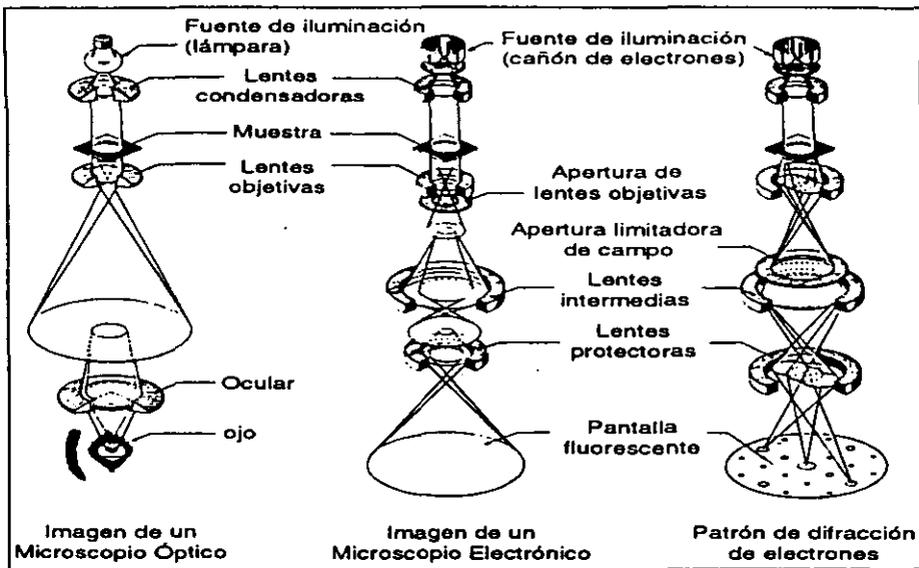


Fig. IV.10 Imagen que representa la similitud en la formación de imágenes entre un Microscopio Electrónico y un Microscopio Fotónico<sup>(6)</sup>

Si en lugar de enfocar el plano-imagen de la lente objetiva para observar la imagen de la muestra, enfocamos el plano focal de ésta, lo que observamos es un arreglo de puntos luminosos que no son mas que el arreglo de los haces difractados y transmitidos (Fig. IV.11). Este arreglo recibe el nombre de patrón de difracción.

Esta imagen presenta un punto muy intenso (central), el cual corresponde al haz transmitido rodeados de varios puntos (los haces difractados), presentando un arreglo geométrico, el cual es característico de nuestra muestra. Por lo tanto el análisis del patrón de difracción nos permitirá hacer el estudio de la estructura atómica de la muestra.

De hecho los patrones de difracción son la huella digital de esta. Como se puede observar de lo anterior, el análisis de cada una de las señales producidas durante la interacción haz-muestra nos permite hacer una caracterización completa de la muestra.

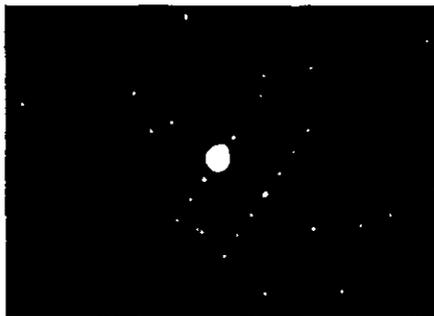


Fig. IV.11 Fotografía de un patrón de difracción donde se puede apreciar el haz central y los haces difractados.

El microscopio electrónico cuenta con tres aperturas, las cuales realizan distintas funciones. La apertura condensadora nos permite obtener un haz electrónico más homogéneo, puesto que al no permitir el paso de los electrones que se han desviado bastante del eje óptico, reduce en gran medida la aberración cromática. La apertura colocada después de la lente objetiva es utilizada para permitir el paso de un solo haz, del conjunto de haces difractados, y el haz transmitido. Si la imagen es producida dejando pasar sólo el haz transmitido, se dice que se observa una imagen de campo claro. Por otro lado si la imagen es formada dejando pasar uno de los haces difractados se produce una imagen de campo oscuro. En este tipo de imágenes sólo la región de donde proviene el haz

difractado seleccionado se mostrará brillante; el resto de la imagen se mostrará oscura y de ahí su nombre.

La apertura localizada en el plano-imagen de la lente objetiva se conoce como apertura de área selecta. Como su nombre lo dice, nos permite seleccionar con precisión el área de donde proviene el patrón de difracción. <sup>(8)</sup>

### **Microscopia Electrónica de Transmisión de Alta Resolución.**

Existe un microscopio electrónico cuya característica principal es la alta calidad de su lente objetiva y la inclusión de una pequeña lente auxiliar, que permite disminuir más la aberración esférica del sistema y aumenta su poder de resolución. La resolución que se ha logrado obtener hasta el momento en este tipo de microscopio es de 0.17 nm, es decir, resolución atómica. Por lo tanto a este se le llama de alta resolución.

A diferencia del procedimiento seguido para observar imágenes de campo claro y campo oscuro, para obtener las imágenes de alta resolución la apertura objetiva debe de permitir el paso de varios haces difractados junto con el haz transmitido. De esta forma, la imagen formada por la interferencia de un número grande de haces difractados. Mientras más grande es el número de haces difractados que son usados para formar la imagen final, más confiable será su contraste para conocer las características de la muestra.

## Difracción de Rayos X.

Los rayos x son un tipo de radiación electromagnética, cuya región en el espectro electromagnético está entre 0.05 y 125 KeV y se producen, como se menciona anteriormente, por el bombardeo de la muestra por electrones. Sabemos que el átomo está formado de electrones que se mueven en diferentes niveles o capas de energía alrededor de él. Estos niveles son llamados "K", el nivel más próximo al átomo y que puede acomodar 2 electrones; el siguiente nivel es "L", el cual puede acomodar 8 electrones; el tercero es llamado "M", con 18 electrones. Los otros niveles llamados, "N" y "O", estarán también ocupados en los átomos de los elementos más pesados. La energía de estos niveles decrece conforme aumenta la distancia al núcleo. (Fig. IV.12)

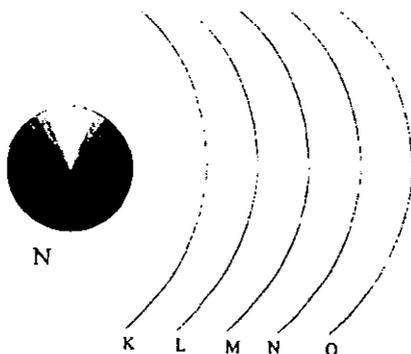


Fig. IV.12 Esquema del átomo mostrando los niveles subatómicos. <sup>(24)</sup>

Se dice que un átomo está en su "estado base" cuando su energía total es mínima. Cuando los electrones son movidos a niveles de energía no superiores o sacados del átomo, dejando un hueco en un nivel inferior, se dice que el átomo está "excitado". De esta manera, si el haz electrónico tiene la suficiente energía para excitar los electrones K de un átomo es capaz de excitar los electrones L y M. Por lo tanto las energías de los rayos X característicos son clasificadas de acuerdo con el tipo de transición que las provoca. Al interactuar la muestra con los rayos X (Fig. IV.13), éstas se reflejan en los planos atómicos de la muestra de acuerdo a la ley de Bragg produciendo una interferencia constructiva de acuerdo con la relación:

$$2 d \operatorname{sen} \theta = n \lambda$$

donde "d" es la distancia interplanar,  $\lambda$  es la longitud de onda del rayo x que se utilice,  $\theta$  es la posición angular del pico de intensidad que se registra, y n es un número entero.

Conociendo el número de picos y su intensidad, puede medirse la energía de los rayos X y la composición química de la muestra. <sup>(8)</sup>

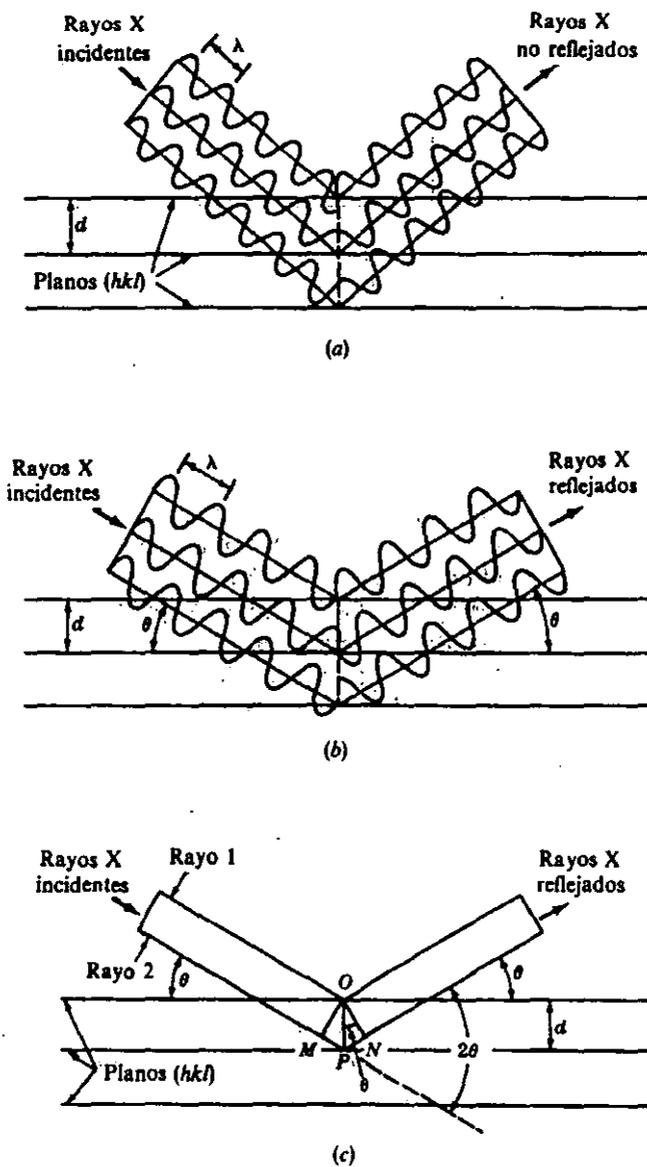


Fig. IV.13 Esquema del ángulo de incidencia y refracción al interactuar el Rayo X con la muestra.

## V. METODOLOGÍA

La metodología empleada para el análisis de la dentina que nos permitirá su estudio estructural y químico será, como se menciona anteriormente, por técnicas de Microscopía Fotónica (MF), Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) y análisis por Difracción de Rayos X (DRX). Para esto se necesita el manejo de diversas técnicas de preparación de muestras de acuerdo a la técnica que se vaya a utilizar para su observación.

La preparación de la muestra para MEB es muy sencilla. Solo se selecciona la zona de estudio del diente, y se pule a espejo con algunas lijas y paños naturales; se ataca con ácido ortofosfórico y se recubre con una capa nanométrica de carbón. Este recubrimiento es necesario ya que la muestra no es conductora y los electrones la dañarían. Estas muestras así preparadas son muy adecuadas para ser observadas también por MF.

Para la observación en el MET la muestra se preparó por técnicas de pulido mecánico y desbaste iónico con argón, que más adelante describiremos con detalle.

El equipo y material mencionado en esta sección y que es necesario para la elaboración del presente trabajo de tesis se encuentra en el Laboratorio de Microscopía Electrónica del Instituto de Física de la UNAM.

## Muestras

Las muestras fueron obtenidas de individuos sanos de edades que oscilan entre los 16 y 23 años de edad.

Los especímenes son terceros molares no erupcionados obtenidos por técnicas quirúrgicas encontrándose todavía incluidos en el hueso de soporte, ya que estas piezas no han sido expuestas a las fuerzas de masticación, ni han estado en contacto con bacterias causantes de caries.

Los dientes fueron cortados de tal forma que se separe el esmalte de la dentina (Fig. V.1) completamente. La dentina fue seccionada tanto en dirección longitudinal como transversal.

Fig. V.1 Imagen esquemática del diente donde se aprecian:

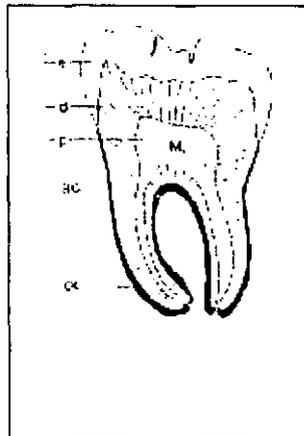
E: esmalte

D: dentina

P: pulpa

Ac: cemento acelular

Cc: cemento celular



## Material

Cortadora de disco de diamante

Cortadora "Jean Wirtz", tiene un sistema de enfriamiento y lubricación. Cuenta con un tornillo micrométrico, el cual permite determinar el grosor del corte. En el caso del diente, se usa agua para enfriar y lubricar (Fig. V.2)

Disco de diamante de 10.2 cm. de diámetro y 0.3 mm de espesor, el cual va a realizar el corte.



Fig. V.2 Fotografía de la cortadora empleada para la obtención de muestras indicando algunas de sus partes. El portamuestras cuenta con un sistema micrométrico para realizar cortes muy finos.  
(36)

Planchas térmicas "Thermolyne" modelo 1900, que maneja temperaturas de hasta 300° C., se utiliza para calentar los portamuestras y la resina termoplástica para pegar la muestra.

## Pulidor mecánico

Pulidor orbital "Buehler", modelo Minimer; nos ayuda a desgastar y pulir los cortes obtenidos en la cortadora (Fig. V.3). Cuenta con portamuestras de acero inoxidable y bases de vidrio para adherir las lijas y paños, los cuales van a desgastar y pulir las muestras por medio de movimientos circulatorios y puede además agregársele presión o no durante el pulido. Se usaron lijas con un grosor de grano de 320, 600, 1200, 4000. después de la última lija se usaron paños. Los paños son para pulir la muestra después de haber obtenido un aspecto de espejo con la lija 4000. Como lubricante se usó polvo de alumina diluido en agua.

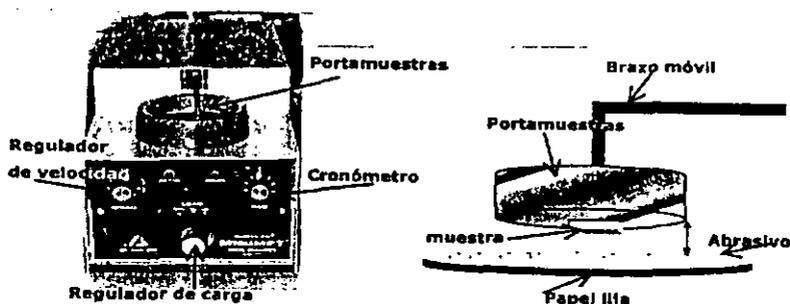


Fig. V.3 Fotografía de la pulidora mecánica, en la cual se muestran sus partes, así como el esquema de los componentes del brazo en la imagen del lado derecho. <sup>(36)</sup>

Pulidor Mecánico Dimpler: es un sistema digital "Fischione" modelo 660, aparato indispensable para la preparación de muestras para microscopía electrónica de transmisión, ya que permite pulir muestras con dimensiones de 3 mm de diámetro y 10 micrómetros de espesor. Durante el pulido se usa polvo de diamante: se

emplea junto con el Dimpler para lograr el desgaste de la muestra con un grosor de grano de 3 y 6 micrómetros.

#### Pulidor iónico.

Este equipo es del tipo Ion Mill, "Gatan". Es un erosionador iónico modelo 600, de doble cañón con sistema de enfriamiento de nitrógeno líquido. Este dará a la muestra la perforación para poder ser observada en el MET, ya que asegura la obtención de espesores menores a 10 nm. (Fig. V.4)

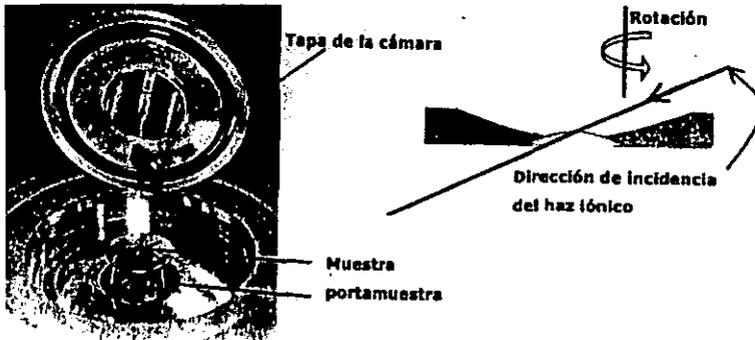


Fig. V.4 Fotografía de la cámara de vacío del Ion Mill en la cual se muestra la zona donde se coloca la muestra. El esquema muestra como se realiza el ataque iónico, así como la dirección del haz.

#### Equipo para recubrir las muestras con películas delgadas de carbón.

Este consiste de cámara de vacío con filamentos de carbón, y permite depositar una película nanométrica de carbón, y poder observar la muestra tanto por MET como por MEB "sputter" evaporadora de carbón, marca Fullam.

### Microscopio fotónico

El microscopio fotonico que se utiliza para observar las muestras fue marca "Zeiss", modelo Axiotech, de luz transmitida y luz difractada, permitiendo imagen de campo oscuro, campo claro, contraste de fases. Cuenta con objetivos de 5, 10, 20, 50 y 100 x y con sistema fotográfico y de vídeo. (Fig. V.5)

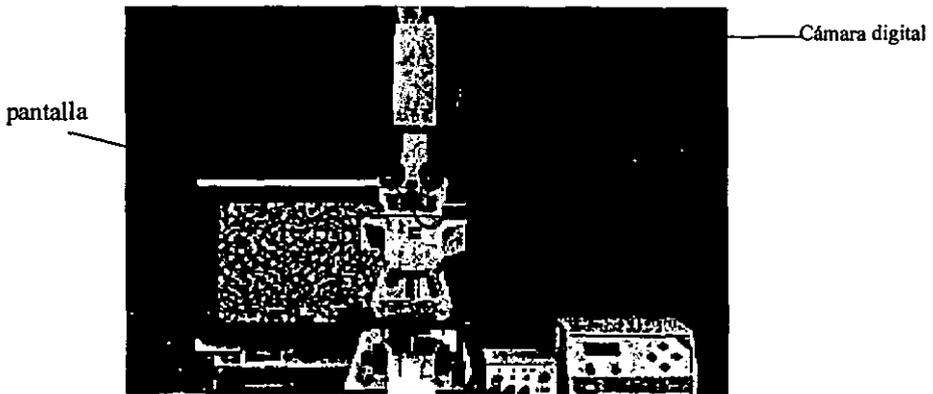


Fig. V.5 Imagen en la cual se observa un microscopio fotónico de luz transmitida y reflejada, y sus componentes, como un monitor y una cámara digital en el tubo del microscopio

### Microscopio Electrónico de Transmisión.

Microscopio Analítico de Transmisión, JEOL 100 CX, equipado con un sistema microanalizador de rayos X EDS-KEVEX, y con resolución de 3Å. Utiliza un filamento de tungsteno. (Fig. V.6)

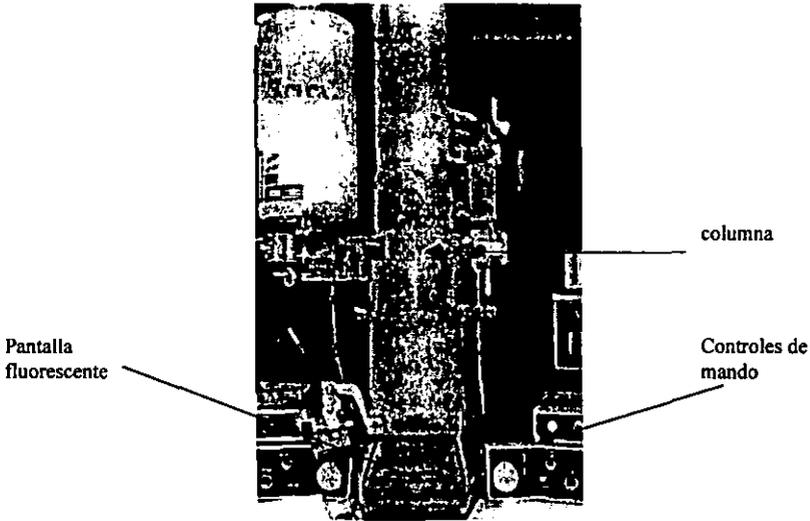


Fig. V.6 Imagen de un Microscopio Electrónico de Transmisión en la cual se pueden apreciar algunos de sus componentes. <sup>(36)</sup>

### Microscopio Electrónico de Barrido

Microscopio Electrónico de Barrido que se usó fue marca JEOL 5200 con resolución de 100 Å. Permite obtener imágenes de electrones retrodispersados.

Utilizan un filamento de tungsteno. (Fig. V.7)



Fig. V.7 Fotografía de un Microscopio Electrónico de Barrido, el cual muestra sus componentes principales. <sup>(36)</sup>

Difractómetro de Rayos X D8 Advance Brucker axs.

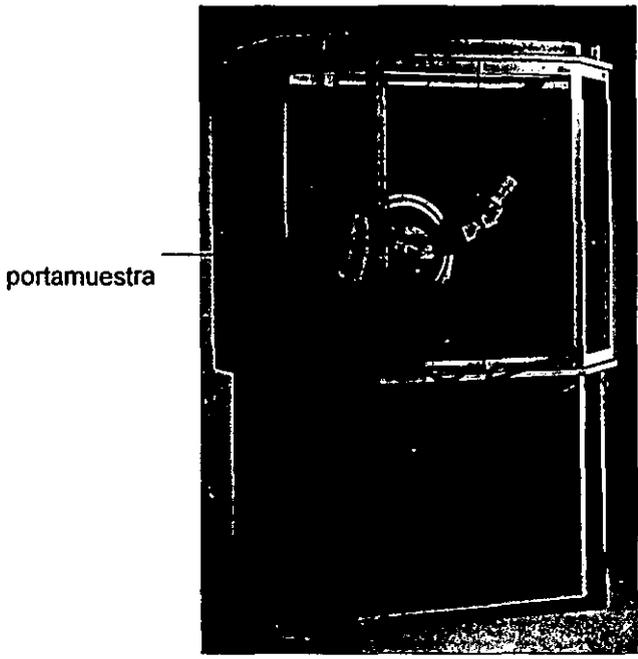


Fig. V.8 Fotografía del difractómetro empleado para el análisis de las muestras de polvo. <sup>(32)</sup>

Otros equipos y material de consumo usado.

Equipo fotográfico especializado. Amplificadoras fotográficas con lentes condensadoras, papel fotográfico 100 ASA Multigrado, guillotina, pinzas, racks porta películas, negativos para el microscopio electrónico de transmisión y barrido. Soluciones y reactivos. Reveladores, fijadores para papel y para negativos, fotoflu, nitrógeno líquido, acetona, agua destilada, alcohol isopropílico, pintura de plata, resina termoplástica.

## **Metodología para la preparación de muestras**

Muestras para Microscopia Fotónica.

### *Corte de la muestra*

El corte de la muestra se realiza con un disco abrasivo de diamante.

Las medidas de la muestra serán de 3 mm de superficie y 1 mm de altura las secciones de dentina localizada a cortar estan entre la cámara pulpar y el esmalte.

### *Montaje de la muestra.*

La muestra fue montada en un portamuestras de aluminio de 2 cm de diámetro por medio de una resina termoplástica, diluible en acetona.

### *Pulido de la muestra.*

Para su observación y estudio la muestra fue desgastada y pulida por mecanismos de abrasión. El desgaste de la muestra se realizó con abrasivos que van desde un grosor de grano de 320 hasta 4000. De este modo el desgaste proporciona una superficie cada vez con menor número de rayas e imperfecciones, se debe alcanzar un espesor mínimo de 100 micrometros. El pulido final se realiza frotando la muestra con un paño de tejido natural o sintético empapado en una solución de agua y oxido de aluminio o alúmina. Todo esto se realiza con el objeto eliminar estrías o líneas de rayado.

Finalmente a la superficie pulida a espejo se le somete a un ataque ácido para revelar su estructura. El ataque se realiza con ácido ortofosfórico durante 30 segundos.

## Muestras para Microscopía Electrónica de Barrido

### *Corte de la muestra*

El corte de la muestra se debe de realizar con el disco abrasivo de diamante, a una velocidad de entre 1000 y 1100 r.p.m. Las medidas de la muestra para su observación por MEB oscilarán entre 1 cm. y 1.5 cm. de cada lado y .5 cm. de espesor.

Las muestras provienen de secciones de dentina localizadas entre la cámara pulpar y el esmalte.

### *Montaje de la muestra.*

La muestra será montada en un portamuestras de aluminio de 2 cm de diámetro por medio de una resina termoplástica, diluible en acetona, para su fácil limpieza y manejo.

### *Pulido de la muestra.*

Para su posterior observación y estudio, la muestra debe ser desgastada y pulida por mecanismos de abrasión. El pulido de la muestra se realiza con

abrasivos que tienen un grosor de grano 4000. Y el pulido final se realiza frotando la muestra con un paño de tejido natural o sintético empapado en una solución de agua y óxido de aluminio o alúmina. Para la eliminación de todo tipo de estrías o líneas de rayado.

Se pega la muestra a un portamuestras de aluminio del MEB, con pintura de plata y se le recubre una película nanométrica de carbón.

Después que la superficie de la muestra fue pulida a espejo, se somete a un ataque ácido con la finalidad de remover los residuos de los materiales utilizados y develar su estructura. Este ataque se realizó con ácido ortofosfórico por un tiempo de 30 segundos.

**Muestras para Microscopía Electrónica de Transmisión.**

#### *Corte de la muestra*

Las muestras fueron secciones de dentina localizada entre la cámara pulpar y el esmalte. El corte de la muestra se debe de realizar con un disco abrasivo de diamante, de espesor delgado de 10.2 cm. de diámetro y 0.3 mm. de espesor, a una velocidad de entre 1000 y 1100 r.p.m. Las medidas de la muestra son de entre 2 mm. de superficie y 1mm. de altura.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

### *Montaje de la muestra.*

La muestra fue montada en un portamuestras de aluminio de 2 cm. de diámetro por medio de una resina termoplástica, diluible en acetona, para su fácil limpieza y eliminación de la superficie de la muestra.

### *Pulido de la muestra.*

Para su posterior observación y estudio, la muestra debe ser desgastada y pulida por mecanismos de abrasión. La muestra debe tener ciertas características:

- 1) Estar libre de rayas, manchas, u otras imperfecciones que tiendan a desfigurar la superficie.
- 2) Estar exenta de astillas y raspaduras en las fases.
- 3) No presentar traza alguna de material deformado.

El desgaste de la muestra se realiza con abrasivos que van desde un grosor de grano de 320 hasta 4000. Esto proporciona una superficie cada vez con menor numero de rayas e imperfecciones en su superficie. Y el pulido final se realiza frotando la muestra con un paño de tejido natural o sintético empapado en una solución de agua y oxido de aluminio o alúmina, con el objeto de la eliminación de todo tipo de estrías o líneas de rayado.

Posteriormente se coloca en otro portamuestras que es especial ya que permite a la muestra ser colocada en el Dimpler. El desgaste se realiza con una

rueda y el polvo de diamante, para hacer un socavado con un grosor mínimo de 10 micrómetros.

Ya realizada la preparación mencionada, el paso final en la preparación de la muestra, consiste en un ataque iónico con argón. Este va a perforar la muestra y dejar una zona muy delgada en las cercanías del agujero, áreas que presentan el espesor adecuado para su observación en el MET y el MET de alta resolución.

Una vez hecha la perforación con el haz iónico, y debido a su propiedad de ser un material aislante, la muestra es recubierta con una película delgada de carbón. La colocación de carbón evaporado permite a la muestra su fácil interacción con los electrones y su fácil observación en los microscopios.

#### Muestras para difracción de Rayos X

Para la obtención del espectro de difracción de Rayos X, es necesario la obtención de un polvo muy fino de dentina. Para obtenerlo se prosiguió de la siguiente manera.

Primero se separa la corona anatómica de la raíz. Posteriormente se separa el esmalte de la dentina procurando no utilizar la dentina cerca de la cámara pulpar, ni del esmalte, con el fin de no introducir elementos diferentes en la muestra a analizar.

Se tritura la dentina con un molino de bolas o en su defecto con un mortero y pistilo de onix, el cual por sus propiedades, no desprenderá partículas propias de este material. Esto nos asegura una buena limpieza en la obtención del polvo.

Después de esto, se seleccionan los granos con un espesor menor a los 44 micrómetros, para esto se utiliza un tamiz de 325 mesh.

Posteriormente se coloca en un portamuestras de cristal especial para el difractor. Con este portamuestras se evitan señales que provengan del contenedor de polvo y asegura que toda señal que se registre en el difractor sea producida completamente por la estructura de la muestra bajo estudio.

## VI. RESULTADOS

En esta sección se presentarán los resultados obtenidos por las diferentes técnicas que fueron utilizadas para analizar la estructura y la composición química de la dentina. La presentación de éstos se hará de tal forma que la secuencia vaya dando una idea clara de cómo se obtuvo la información sobre la dentina. De este modo se presenta primero los resultados de rayos x, seguidos de los obtenidos por MF, MEB, MET y finalmente MET de Alta Resolución.

### RAYOS X

Como ya se mencionó en el capítulo del procedimiento experimental el estudio de la dentina se produjo utilizando una muestra en polvo. La idea de utilizar los resultados obtenidos por la técnica de rayos X es la de dar información acerca de la composición química y estructura de la dentina de una manera rápida y convincente, ya que es fácil detectar las emisiones producidas por la muestra al incidir sobre ella los rayos X.

En la Fig. VI.1 se puede apreciar el difractograma del polvo de dentina. Los picos obtenidos en este difractograma concuerdan con los datos presentados de la celda unitaria de la hidroxiapatita de la tarjeta 432 (Fig. III.3).

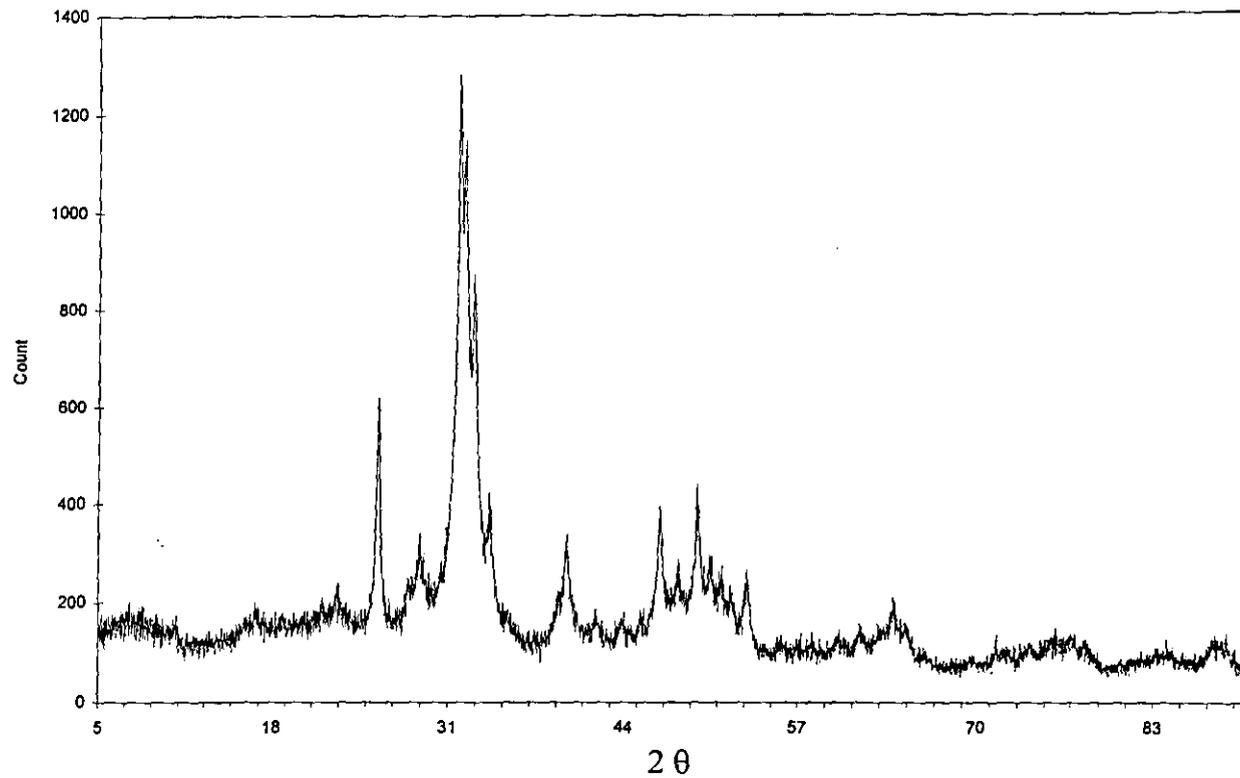


Fig. VI.1 Difractograma de Rayos X de la muestra en polvo de dentina, el cual coincide con la tarjeta 432 (Fig. II.3)

En esta imagen se presenta un difractograma con una gran cantidad de ruido lo cual puede ser indicador de las dimensiones del grano del polvo de dentina. También podemos observar en esta figura que el ajuste entre los parámetros entre la tarjeta mencionada y el espectro obtenido es bastante bueno, por lo tanto no existe ningún problema en afirmar que la parte inorgánica de la dentina está constituida por cristales de hidroxiapatita. Debido al ancho de los picos del espectro, podemos asegurar que estos cristales son de un tamaño muy pequeño. Esto se puede comentar ya que se tiene cierta experiencia en el estudio de la estructura y composición de la hidroxiapatita del esmalte dental obtenidas por esta técnica.

En la figura VI.2 se pueden observar los picos que forman el espectro de rayos x de una muestra en polvo del esmalte dental. Aquí las señales de hidroxiapatita concuerdan de nuevo con el espectro obtenido. En la figura VI.3 se ha sobre puesto los espectros de la dentina y del esmalte obtenidos con las mismas condiciones experimentales. Por lo tanto podemos asegurar que la dentina está formada por cristales de hidroxiapatita. Y la única diferencia es el tamaño del grano, y el ordenamiento o arreglo que presenta en ambas estructuras. Esto no es muy fácil de observar si solo comparamos la Fig. VI.1 con la Fig. VI.2. Pero gracias al software de la máquina con la cual se obtienen los difractogramas de rayos x nos permite hacer esto detalladamente tal y como se presenta, en la Fig. VI.3 en la cual se puede apreciar claramente la diferencia de tamaño de los picos.

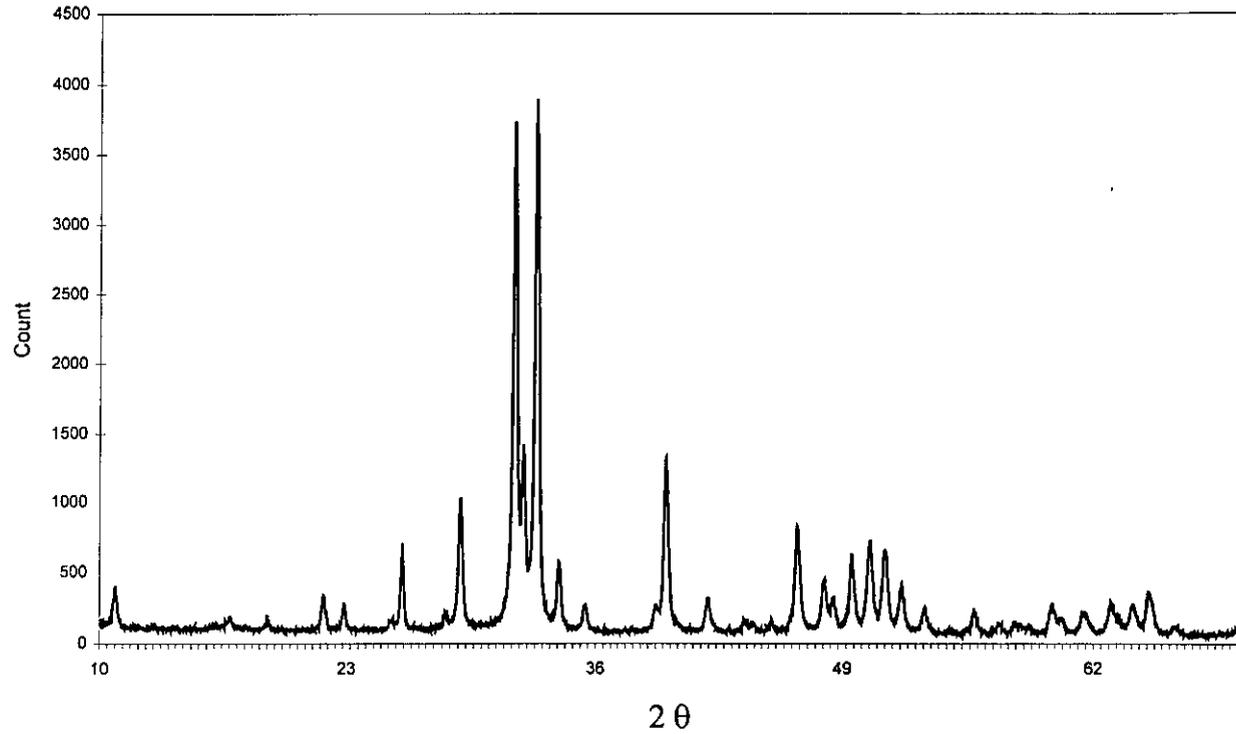


Fig. VI.2 Difractograma de Rayos X de polvo de la muestra de esmalte. Nótese la concordancia que existe entre los picos que se presentan y los de la hidroxiapatita reportados en la tarjeta 432.

Es decir, que el esmalte dental esta formado por un tamaño determinado de cristal, pero el tamaño de grano de este cristal en la dentina es mucho menor, esto puede observarse no solo por la altura del espectro sino también por el ancho de los picos obtenidos. En este caso en la Fig. VI.3 el espectro en negro es el que muestra el espectro de la dentina, por lo tanto, podemos decir que aunque sea el mismo material, hidroxiapatita, la diferencia entre los granos de cristalitos es lo que va a dar la consistencia a cada uno de los componentes del diente, en este caso a la dentina y el esmalte.

Se nos ha comentado que el hueso también está constituido de hidroxiapatita, por lo tanto para hacer un poco mas explicita la explicación de los resultados para la hidroxiapatita no solamente en la estructura de la dentina y el esmalte sino también en hueso, obtuvimos difractograma de rayos x de una muestra de polvo para ser comparada con los espectros mostrados anteriormente (Fig. VI.4). El hueso, aun con las mismas condiciones que los casos anteriores, presenta un espectro donde se definen muy bien los picos de la hidroxiapatita, sin embargo el ruido es mayor. Esto quiere decir, que el tamaño del grano es todavía mas pequeño que en la dentina. ( Fig. VI.4). En este caso podemos asegurar que la dentina, el esmalte y el hueso están constituidos en su parte inorgánica por hidroxiapatita, pero el cristal que se encuentra en el esmalte, es mucho más grande, en comparación con la dentina y el hueso. Comparando el cristal del hueso con la dentina tendríamos que en el hueso, el cristal de hidroxiapatita todavía es más pequeño que en la dentina.

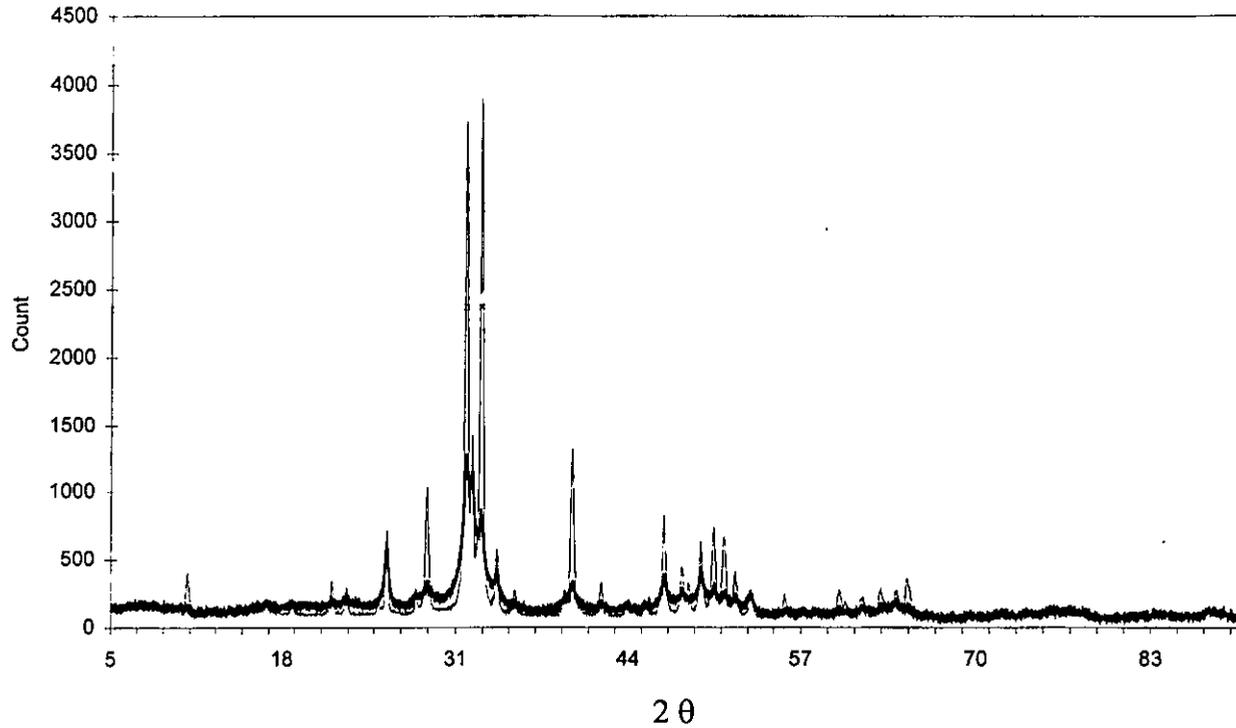


Fig. VI.3 Sobreposición de los Difractogramas de rayos x de dentina y esmalte, mostrados en las figuras VI.1 y VI.2, en la cual se pueden apreciar claramente la diferencia de tamaño de los picos y la anchura de éstos.

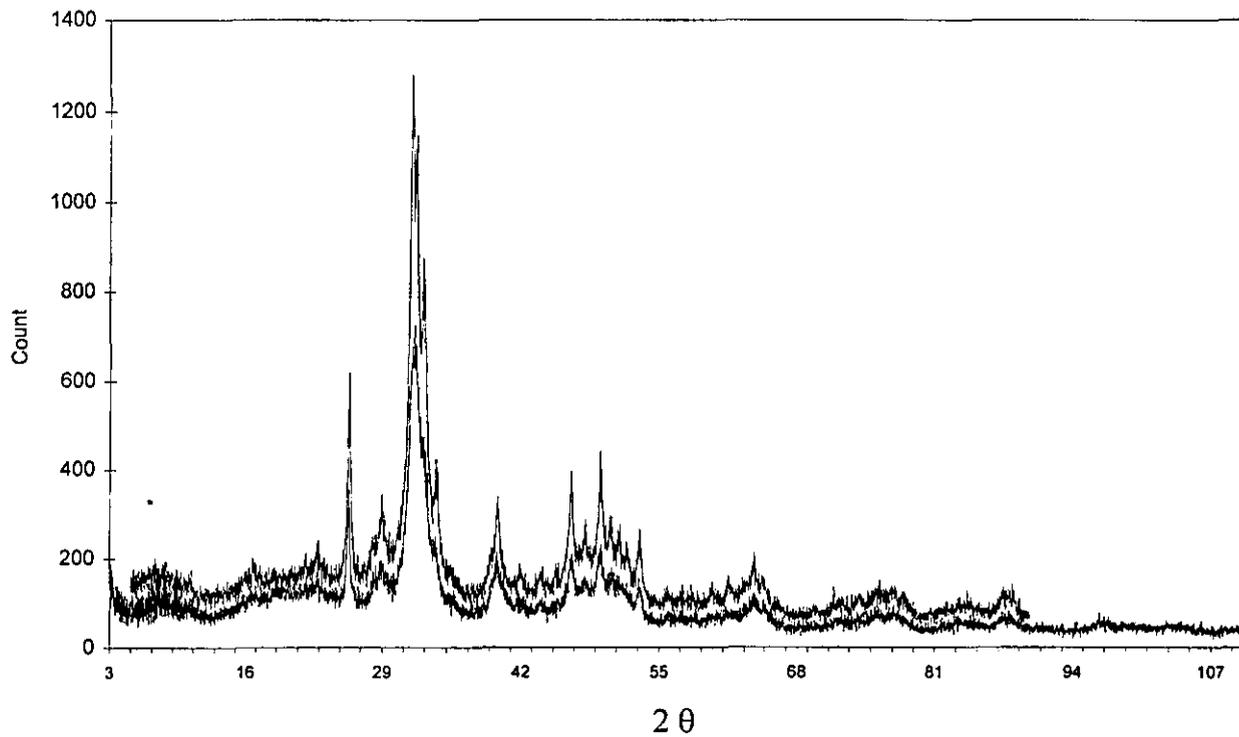


Fig. VI.4 Sobreposición de los difractogramas de Rayos X del hueso y la dentina en la cual se aprecia la diferencia de tamaños.

Una cosa que es de notarse es lo que se observa en la región del espectro de la Fig. VI.4 entre  $45^\circ$  y  $55^\circ$ . En este rango los picos de hidroxiapatita están muy bien definidos en los tres espectros. Lo único que esto corrobora, es que el tamaño del cristal en el caso del hueso es todavía más pequeño que en el caso de la dentina, tal y como se ha comentado. Además nos permite afirmar que el ordenamiento de los cristales, en el caso de la dentina, esmalte y el hueso, varían entre cada uno de los materiales. Por lo tanto el esmalte presenta una cristalinidad mayor en comparación con la dentina y el hueso. Al comparar entre el hueso y la dentina, esta última presenta mayor cristalinidad que el hueso.

## MICROSCOPIA FOTONICA

Hemos mencionado con mayor detalle en la introducción y en la sección I como esta constituida la estructura de la dentina; sabemos que esta formado por túbulos dentinarios que corren de la pulpa hacia la unión dentina-esmalte demarcando una forma recta y vertical incisamente y en forma sinuosa o de "S" en el tercio cervical de corona y raíz. Una forma de verificar esto es la densidad de túbulos dentinarios en cada una de las interfaces, las cuales van de 55,000  $\text{mm}^2$  cerca de la pulpa ha 15,000  $\text{mm}^2$  en la unión dentina-esmalte.<sup>(4)</sup> Observar los túbulos dentinarios por microscopia fotónica es muy sencillo basta preparar la muestra como se indico anteriormente, en la sección V.

En este caso en la Fig. VI.5 observamos las imágenes de microscopía fotónica obtenidas a partir de las preparaciones realizadas para muestras a observarse con Microscopia Electrónica de Transmisión. De acuerdo a como se comento en esa sección, podemos apreciar un pequeño orificio por el cual pasa la luz sin ningún problema y vemos alrededor de este orificios más pequeños, los cuales corresponden a los túbulos dentinarios. Esta es una muestra en la cual hemos tomado los túbulos en sección transversal por lo tanto se ven como si fueran picaduras, las cuales podemos apreciar más claramente en la Fig. VI.5b. En la Fig. VI.5b vemos un acercamiento de la Fig. VI.5 a, en la cual podemos observar los orificios y una gran densidad de túbulos dentinarios.

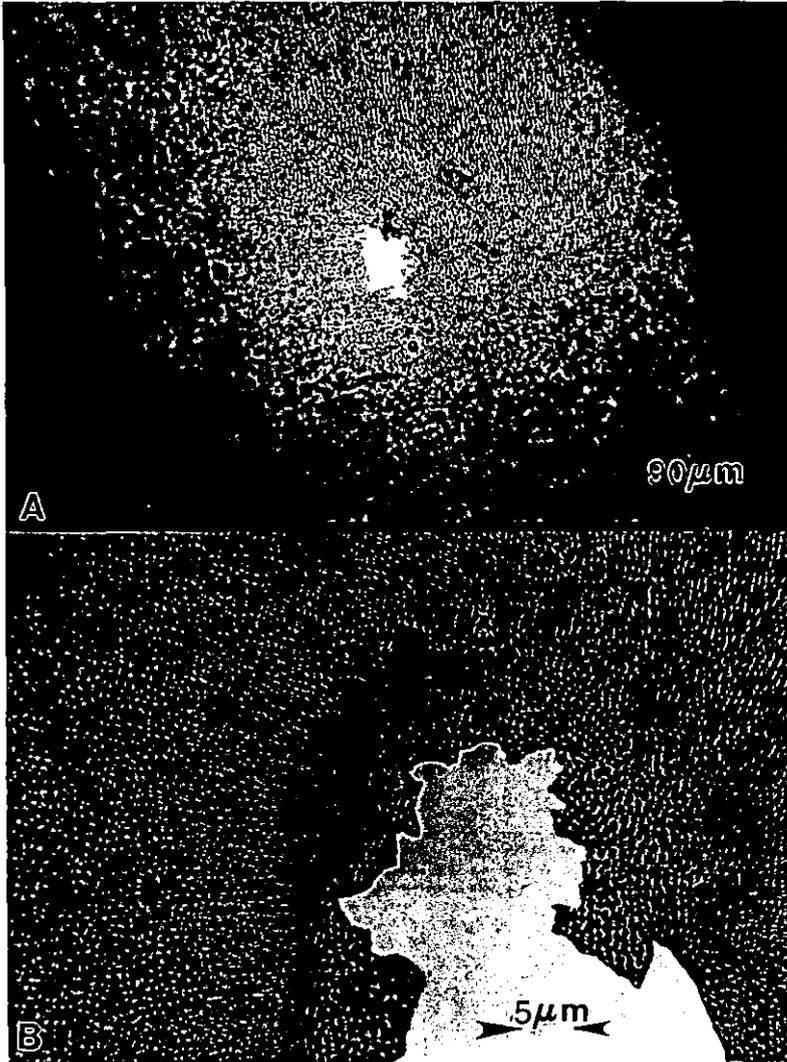


Fig. VI.5 Imagen de Microscopia Fotónica en el modo de transmisión en la cual se observa la preparación realizada para su observación por MET (A), y se aprecia la porosidad que corresponde a los túbulos dentinarios. En (B) se muestra una mayor ampliación.

Haciendo todavía una mayor amplificación, podemos ver los túbulos dentinarios con gran facilidad (Fig. VI.6), inclusive túbulos por los cuales el haz de luz del microscopio fotónico pasa fácilmente, (Fig. 6b). Aquí podemos apreciar el tamaño que tienen estos túbulos dentinarios: son del orden de unas cuantas décimas de micrómetro. Podemos decir, hasta donde es posible observar con las limitaciones del equipo, el orden y tamaño de los túbulos dentinarios, no pueden ser analizados a mayores amplificaciones ya que si queremos detalles a mayores amplificaciones tendríamos problemas de aberraciones. Por lo tanto, tenemos que echar mano de la microscopia electrónica de barrido para poder observar con mayor detalle la estructura de la dentina.

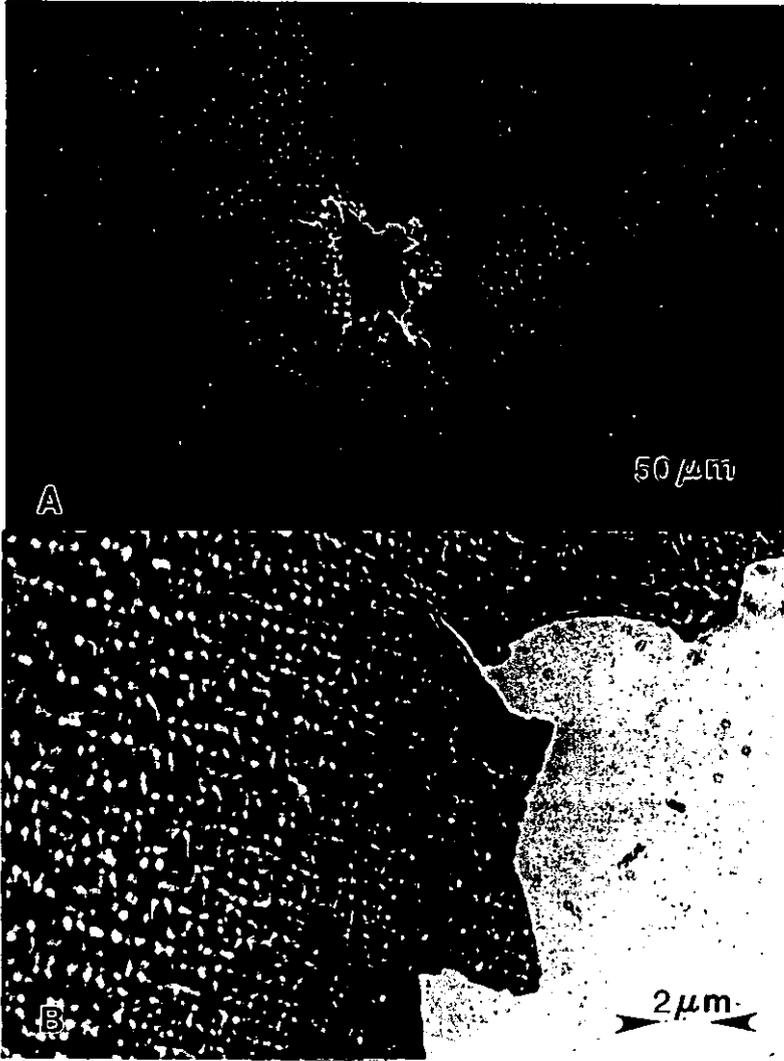


Fig. VI.6 Imágenes de Microscopia Fotónica en modo de transmisión con una mayor ampliación que en el caso de la figura VI.5. Se observan mas claramente a los túbulos dentinarios en sección transversal (6 b).

## MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Como se dice una imagen dice más que mil palabras, en la Fig. VI.7, podemos apreciar los túbulos dentinarios tal y como lo veíamos en la Fig. VI.6 en el caso del microscopio fotónico, pero ahora con el MEB. En este caso podemos observar los túbulos para darnos una idea de las dimensiones que éstos presentan tanto en sección transversal, como longitudinal

En éstas imágenes son observadas características de lo ya reportado en la literatura acerca de la morfología de la dentina, no hay mas que pueda decirse acerca de lo ya conocido.

En la Fig. VI.7b, podemos observar los túbulos dentinarios en sección longitudinal, y el contraste da la impresión de unos tubos que pasan a lo largo de la imagen. También se observan unos orificios que son diferentes a los orificios presentados en la Fig.VI.7 a.

Esto es fácil de explicar, ya que si tomamos una serie de tubos con forma sinoidal, y realizamos un corte al azar en forma longitudinal (a lo largo de su eje mayor), tendríamos orificios de formas diferentes, algunos redondos, otros alargados, u otros de forma elíptica, tal y como se observan en la Fig. VI.7 b.

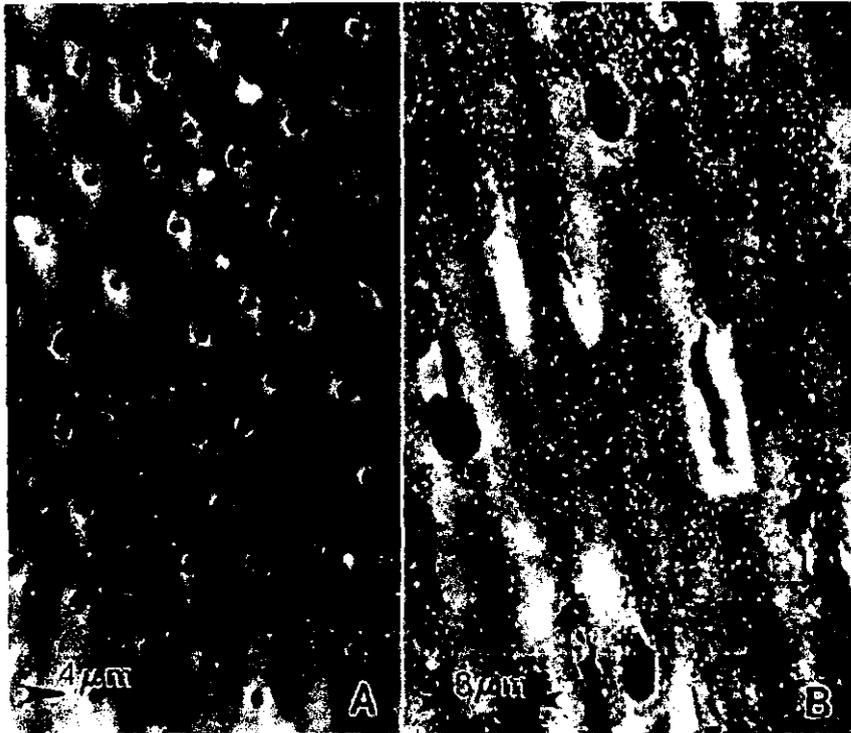


Fig. VI.7 Imágenes de MEB de electrones secundarios de los cortes transversal (A) y longitudinal (B) de la dentina. En ambos casos se observan los túbulos dentinarios.

En la figura 8 podemos ver comparativamente, y en mayor detalle, lo observado en la Fig. VI.7 para ambos casos, el longitudinal y el transversal. En la Fig. VI.8 a, vemos que los túbulos dentinarios casi son de forma circular, no mostrando problemas para su caracterización. Se trata de un tubo cortado perpendicularmente a su eje. En la Fig. VI.8b vemos que el túbulo fue cortado de tal manera que presentan tipos de huecos alargados. De esta manera entendemos mucho mejor el contraste presentado en la Fig.VI.7b en sección longitudinal. La razón de esto es que estos pequeños túbulos no presentan una trayectoria completamente recta, sino que siguen una trayectoria sinoidal (o de "S") al ir de la cámara pulpar a la unión dentina-esmalte.<sup>(5)</sup> Cuando realizamos un corte en forma longitudinal seccionamos a los túbulos dentinarios arbitrariamente y podemos apreciar estos contrastes.

En la Fig.VI.7b, podemos observar prolongaciones odontoblásticas corriendo a lo largo de los túbulos dentinarios, Estas prolongaciones llegan hasta la unión dentina-esmalte partiendo de su origen o de los odontoblastos provenientes de la pulpa. Además podemos apreciar una prolongación por fuera del túbulo y en otras zonas a las prolongaciones corriendo paralelas a lo largo del túbulo dentinal.

La Fig. VI.8b muestra una prolongación odontoblástica afuera de su túbulo dentinario expuesta por el ataque con ácido ortofosfórico al 6%.

Podemos decir de cierta manera que estamos apreciando el interior de los túbulos dentinarios, además de apreciar la periodicidad del arreglo que forman los túbulos dentinarios al formar la dentina. Nótese que estamos hablando de unos cuantos micrómetros en promedio.

Algo que cabe mencionarse sobre los túbulos dentinarios en sección transversal en la Fig. VI.7a, es que aquí vemos que los orificios miden alrededor de un micrómetro mientras que en la figura 7b vemos que los contornos de los cilindros tienen 3 micrómetros de diámetro en sección transversal. Esto nos indica que el orificio presente en la Fig. VI.7 a, no está abierto completamente sino que este se reduce de 3 a 1 micrómetro. Esto lo podemos explicar de la siguiente manera: ya que el ácido ortofosfórico está atacando a la dentina intertubular, dejando expuesta o visible la pared externa del tubo dentinario, zona peritubular más expuesta denotando que la pared externa del tubo mide 3 micrómetros aproximadamente. Al ser atacado con iones de Argón, lo que hace es desbastar de una forma más uniforme la superficie de la dentina, y dejar expuesto solo los orificios de la dentina, ya que el ataque no es selectivo como en el caso del ácido ortofosfórico. (26,27,30)

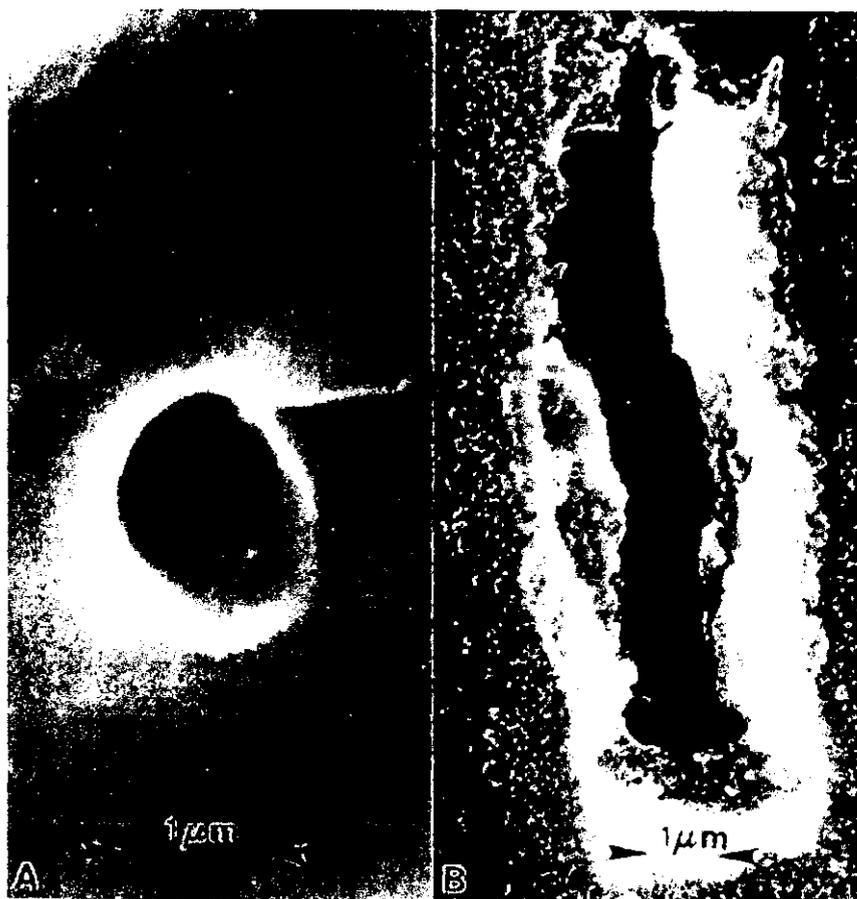


Fig. VI.8 Imagen de MEB de electrones secundarios de un túbulo dentinario a mayor aumento que presentado en la figura VII.7 en sección transversal (A) y longitudinal (B). Aquí se observa material orgánico fuera del túbulo dentinario perteneciente a las prolongaciones odontoblásticas.

Por lo tanto un túbulo esta lleno de material orgánico de tal manera que en su totalidad constituye un cilindro que en su diámetro exterior mide 3 micrómetros y en su diámetro interior mide 1 micrómetro. Esto significa que alrededor del túbulo existe material con un espesor de entre 1 y 2 micrómetros, lo que se conoce como dentina peritubular.

En la Fig. VI.9 se puede observar como se distribuyen los túbulos dentinarios o las paredes de la dentina que se encuentra en contacto con las paredes de la pulpa y en contacto con el esmalte, ya que la densidad de túbulos en ambas superficies de contacto es completamente diferente.

En la figura 9a, se observa la interfase entre la dentina y la pulpa. En este caso la mitad inferior de la figura 9a corresponde a la zona que se encuentra en contacto con la pulpa, mientras que en la figura 9b, en la mitad inferior representa la zona de la dentina que esta en contacto con el esmalte. Como se puede apreciar en esta figura, la densidad de túbulos se modifica considerablemente. Si consideramos que cada zona clara de la fotografía corresponde a restos de las prolongaciones odontoblásticas, y se deduce que la densidad de túbulos cambia, siendo mayor en la unión con la pulpa que en unión con el esmalte, tal y como se había comentado anteriormente.

Hemos delimitado claramente cual es superficie de la dentina que está en contacto con el esmalte y cual es la superficie de la dentina que esta en contacto con la pulpa.

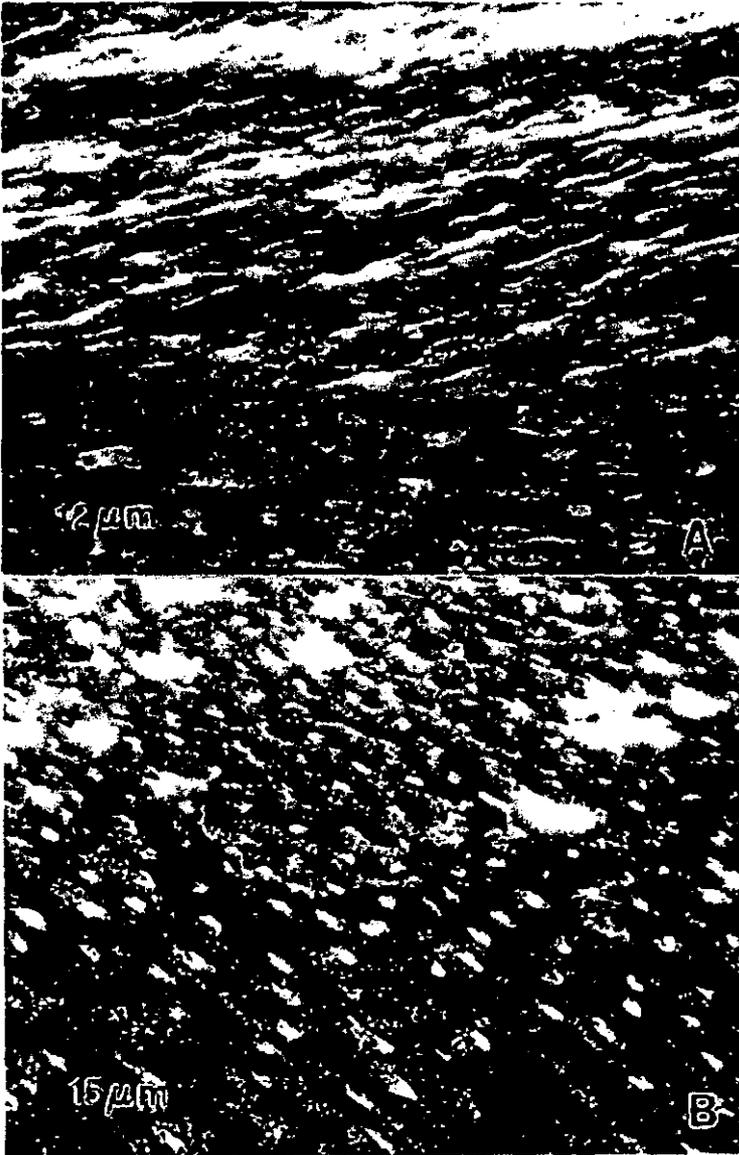


Fig. VI.9 Imágenes de MEB de un corte a 90° de la dentina observando la unión de la dentina con la pulpa (A) y la unión de la dentina con el esmalte (B). En ambos casos se ha indicado las superficies de la dentina en contacto con la pulpa y el esmalte respectivamente.

Para poder observar esta imagen se tubo que realizar un ataque preferencial con ácido ortofosfórico al 6% durante 30 segundo. <sup>(30)</sup>

La Fig. VI.10 tenemos una amplificación de la Fig. VI.9 en la cual vemos la superficie de la dentina que esta en contacto con la pulpa. Como podemos ver aquí, el tipo de ataque y la inclinación, solo permite observar crestas y valles, pero cada valle corresponde a la entrada a un túbulo dentinario el cual tiene un diámetro mayor a los 2 micrómetros.

En la Fig. VI.11 vemos los túbulos dentinarios con residuos en su interior que corresponde a las prolongaciones odontoblásticas saliendo de cada uno de ellos. Esto significa que al momento de preparar la muestra el material no se degrada totalmente con la preparación si no que de cierta manera queda expuestas estas prolongaciones fuera de los túbulos dentinarios. Recordemos que las prolongaciones odontoblásticas están formadas por material orgánico, y de aquí la diferencia que presentan con el material inorgánico al momento del ataque iónico. Además las prolongaciones odontoblásticas no solamente viajan a través del grosor de la dentina, sino que se introducen a través de la unión dentina-esmalte. <sup>(29)</sup> lo cual nos permite concluir que éstas serán visibles también en las muestras del esmalte.

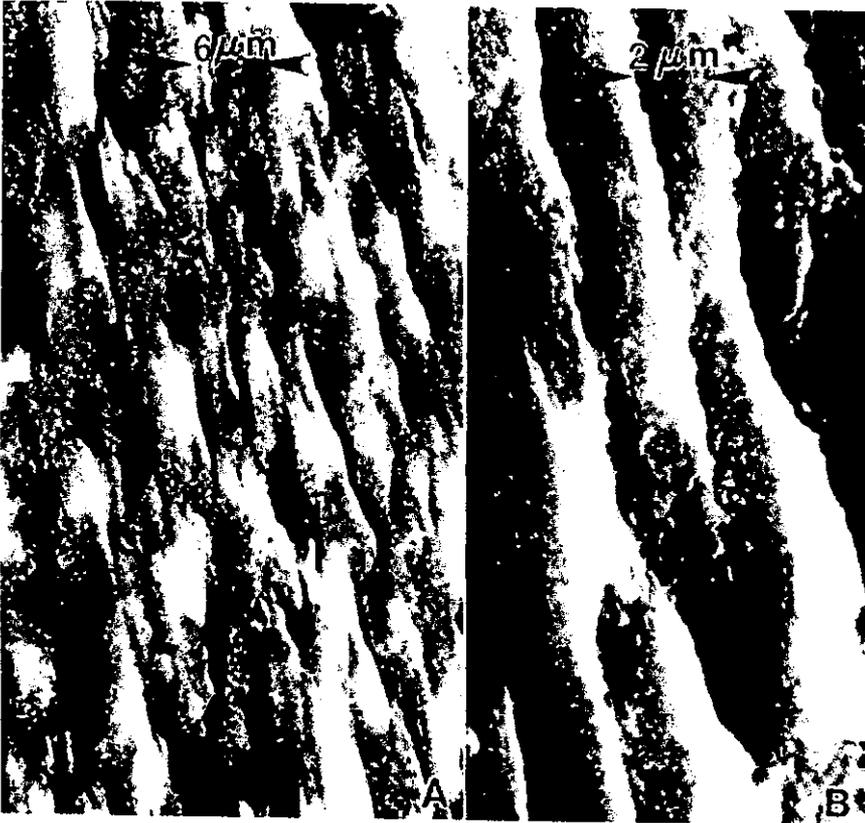


Fig. VI.10 Imágenes de MEB mostrando un acercamiento a la zona de la dentina en contacto con la pulpa (A) y a mayor aumento (B).

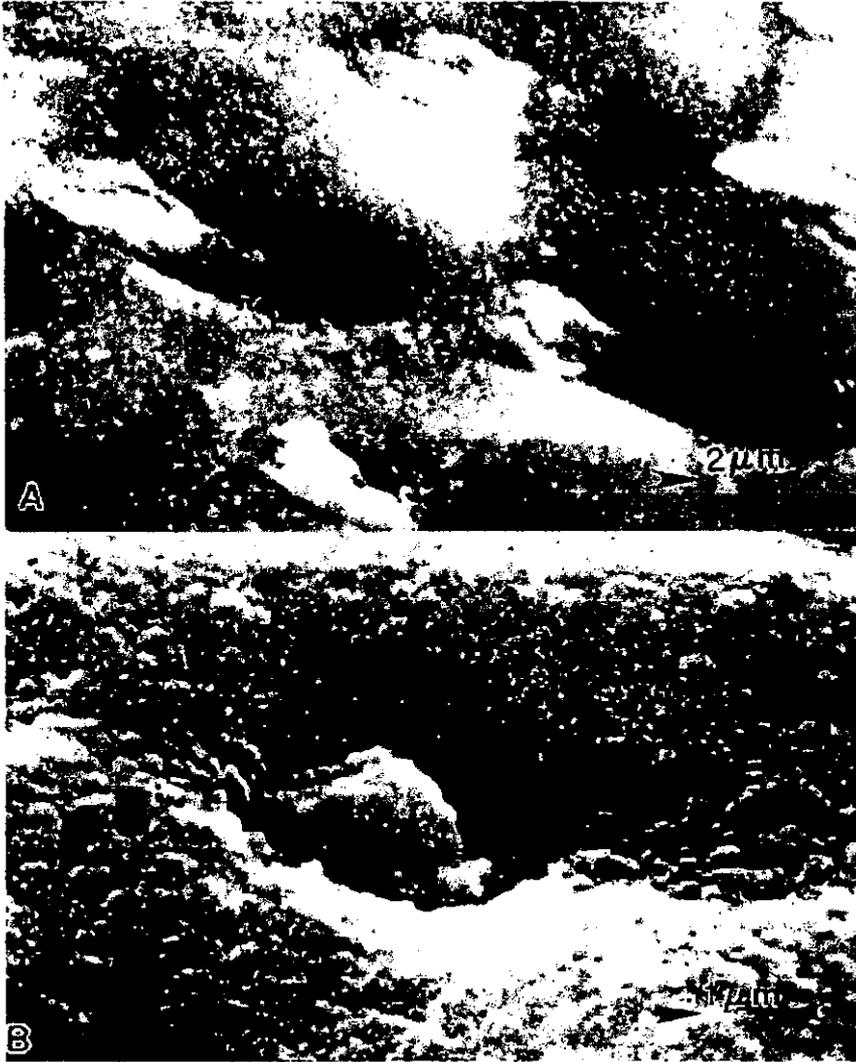


Fig. VI.11 imagen de MEB en la cual se aprecia a los túbulos dentinarios y prolongaciones odontoblasticas presentes en su interior. En (B) se presenta el túbulo dentinario y su correspondiente prolongación odontoblastica a mayor amplificación.p

Este caso se puede apreciar en la Fig. VI.12 en la cual estamos viendo la unión dentina-esmalte. En esta figura vemos como esta unión tiene un cierto espesor. En este caso particular, al momento de preparar la muestra, la unión se separó y nos permite apreciar en ella una prolongación odontoblástica que cruza de la dentina hacia el esmalte, tal y como lo muestra la Fig. VI.12 b a mayor amplificación. Recordemos que las prolongaciones odontoblásticas no son más que prolongaciones citoplasmáticas de los odontoblastos que quedan en el interior del túbulo durante la dentinogénesis. <sup>(29)</sup>

Residuos del material orgánico que forman la prolongación odontoblástica también puede apreciarse en la Fig. VI.13. Aquí se muestra la pared del túbulo en la cual se aprecia restos de este material, incluso se aprecia material en el interior del túbulo de forma esférica de una dimensión de aproximadamente 100nm, residuos de material orgánico posiblemente. Vemos también que la pared interna del túbulo dentinario presenta cierta rugosidad la cual corresponde a los cristales de hidroxiapatita de la zona peritubular.

Con la idea de conocer algo más sobre la composición química del material de la dentina que se encuentra alrededor de los túbulos dentinarios, se hicieron observaciones con el Microscopio Electrónico de Barrido pero usando imágenes de electrones retrodispersados tal como se muestra en la Fig. VI.14.

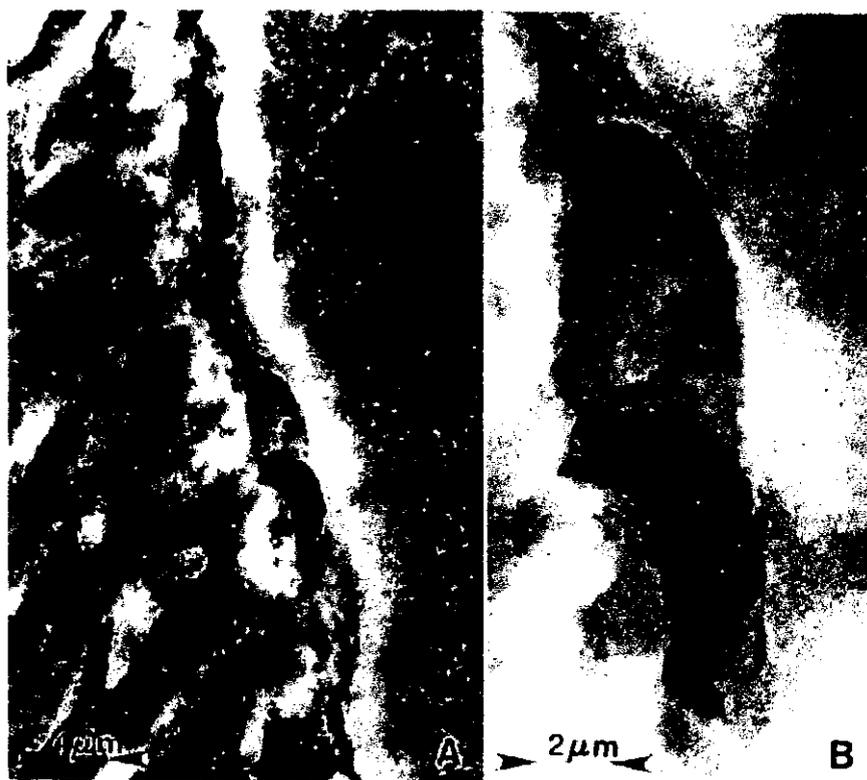


Fig. VI.12 Imagen de MEB en la cual se aprecia la unión dentina-esmalte (A). A mayor amplificación (B) se puede apreciar en ella una prolongación odontoblastica cruzando de la dentina hacia el esmalte.



Fig. VI.13 Imagen de MEB en la que se observa el interior de un túbulo dentinario, donde se aprecia la rugosidad de su pared. Se observa también lo que se cree que es material orgánico en forma de esferas.

Aquí podemos observar al mismo tiempo imágenes de MEB con electrones secundarios e imágenes de MEB con electrones retrodispersados. Recordemos que las imágenes de MEB de electrones retrodispersados dependen de la interacción del haz con la muestra, y en el caso que hubiese un cambio de composición en la muestra, se observaría una diferencia en el contraste de la imagen. En la Fig. VI.14 este caso no es apreciable.

De esta manera, por ejemplo, vemos en la Fig. VI.14 a una imagen de un túbulo dentinario con restos de material orgánico en su pared interna de prolongaciones odontoblásticas, la cual, al hacer el análisis de electrones retrodispersados, no muestra un cambio de contraste. Es decir la composición química de este material es muy similar a la composición de la dentina. Lo mismo se observa en la Fig. VI.14c, en la cual difícilmente se aprecia un cambio de contraste al hacer imagen con electrones retrodispersados. Por lo tanto el material de hidroxiapatita conforma a la dentina de una manera muy uniforme.

Sin embargo, sabemos por los resultados obtenidos por difracción de rayos X, acerca de la composición de la dentina, el esmalte, y el hueso que éstos están formados por cristales de hidroxiapatita, como ya hemos comentado; estos cristales deben estar organizados de tal forma que la dentina, presenta características físicas diferentes con respecto al hueso y al esmalte, como lo son por ejemplo, su dureza y arreglo cristalino.

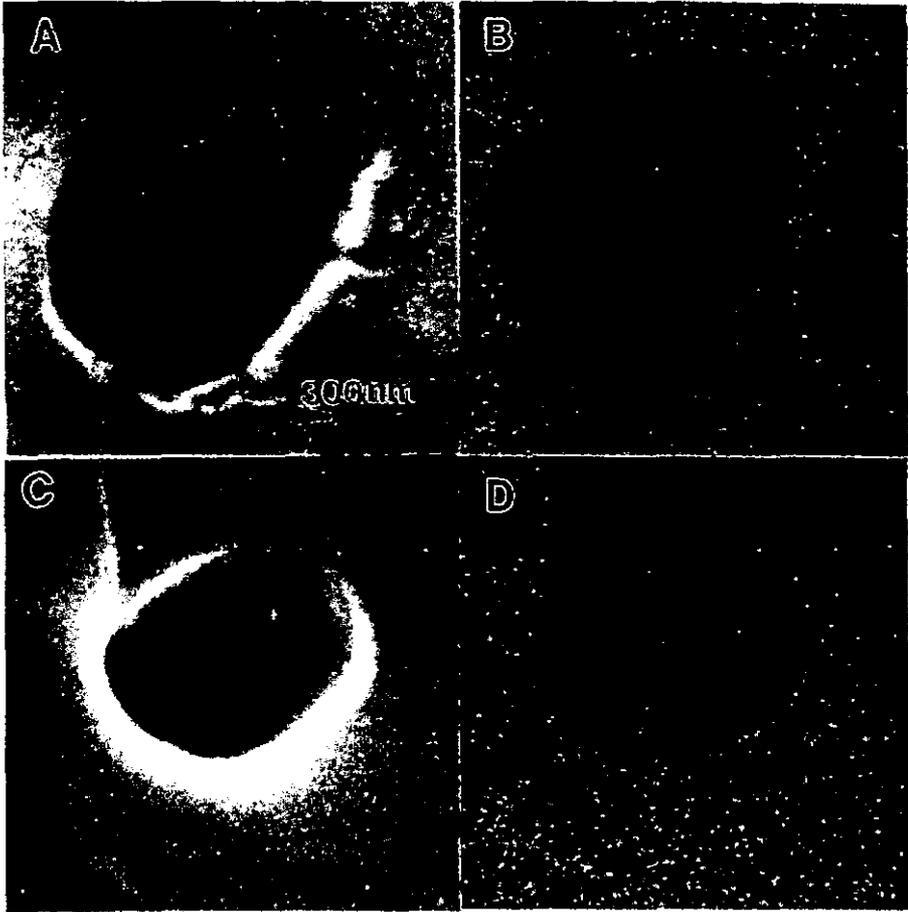


Fig. VI.14 Imagen de MEB donde se observa a los túbulos dentinarios con electrones secundarios (A y C) y electrones retrodispersados (B y D). Nótese que no existe un cambio apreciable en la composición de la dentina.

Con una idea de observar los cristales que forman a la dentina se amplificó la imagen de un túbulo dentinario, y observamos éste con una inclinación de 20 grados con respecto a su superficie, de tal forma que nos da una idea de cuáles son los tamaños de los cristales de hidroxiapatita tal y como se muestra en la Fig. VI.15, en la cual en la figura 15b vemos un túbulo dentinario un contraste que nos permite reconocer cierta topografía que presenta la superficie de la dentina. Amplificando esta zona, observamos que este contraste está compuesto por pequeñas protuberancias que miden unos cuantos nm. De hecho, estas estructuras miden alrededor de los 10 nm aproximadamente; consideramos que estos son los cristales de hidroxiapatita que conforman a la dentina.

Por medio de esta técnica es difícil apreciar la forma y estructura del cristal ya que la resolución de un MEB anda alrededor de los 30 Å, es decir 3 nm. Pero a medida que nosotros aumentemos la amplificación, la imagen comienza a presentar ruido y no es posible identificar la forma y tamaño de los cristales de hidroxiapatita que conforman a la dentina.

Por esta razón recurrimos a la técnica de MET, el cual, sin ningún problema, nos permite observar los cristales de la dentina con mucho mayor detalle.

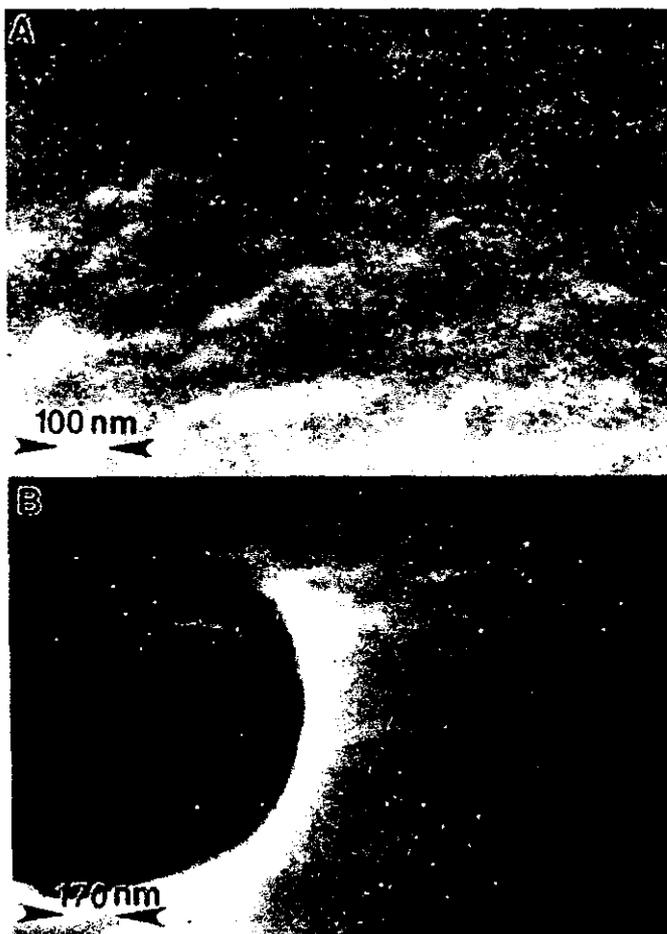


Fig. VI.15 Imagen de MEB, a alta amplificación, donde se observa cierta rugosidad que corresponde a los cristales de hidroxiapatita (A). En (B) se muestra la localización de el área mostrada en A, a menor amplificación junto a un túbulo dentinario.

## MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION

Después de hacer la preparación adecuada como se describió en la sección de preparación de muestras para microscopia electrónica de transmisión, podemos observar claramente los túbulos dentinarios y los cristales de hidroxiapatita alrededor que conforman la dentina, eso se observa en la Fig. VI.16 b. En la Fig. VI.16a se presenta la imagen de MEB de la muestra que fue analizada por microscopia electrónica de transmisión en la Fig. VI.16b. En esta imagen se observa un túbulo dentinario y alrededor de éste, se ven varias partículas que son los cristales que andábamos buscando. Podemos inmediatamente tratar de observar la distribución que presentan. Alrededor de los túbulos dentinarios presentan un tamaño una distribución dados, pero en la zona que corresponde a la dentina intertubular presentan una menor densidad de cristalitos.

Una mejor observación de los cristales que conforman a la dentina, se puede apreciar en la Fig. VI.17 a, en la cual vemos una imagen de MET en campo claro y en donde observamos los pequeños cristalitos alrededor de un túbulo dentinario. En la Fig. VI.17 se presenta su correspondiente patrón de difracción electrónica de área selecta (SADP). Este patrón comprueba lo que ya habíamos analizado por difracción de rayos x ya que el patrón de difracción que se forma corresponde a hidroxiapatita. Este patrón de difracción, como se puede observar en la fotografía, está formado por anillos concéntricos, la cual es la huella digital de un material compuesto por muchos cristalitos, es decir, se trata de un material

policristalino. Inmediatamente se puede observar que, el anillo más intenso corresponde al plano [211] de la estructura de la hidroxiapatita. Además que esto

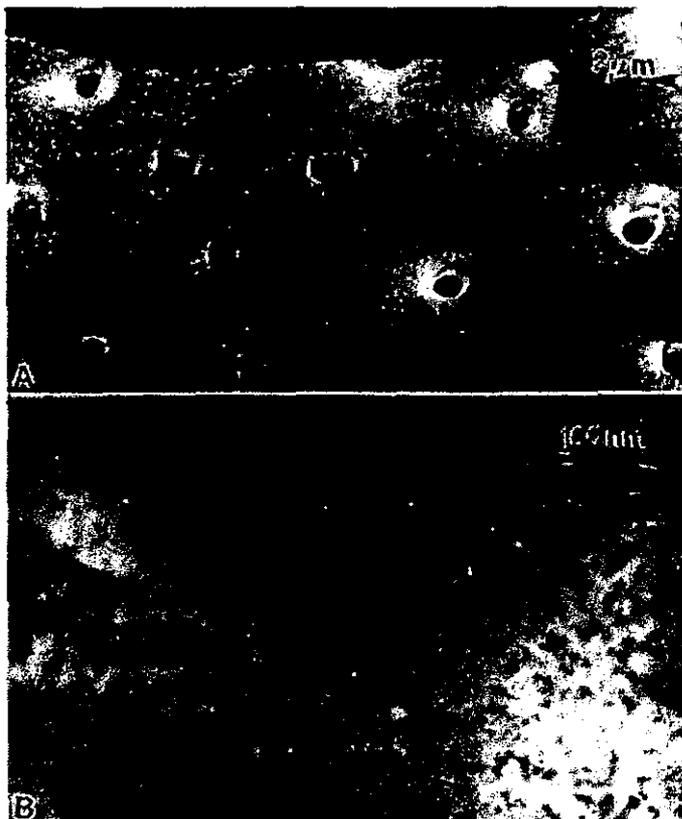


Fig. VI.16 (A) imagen de MEB de la muestra preparada para MET. (B) Imagen de MET de campo oscuro, en la cual se observa a los cristales de hidroxiapatita en contraste brillante.

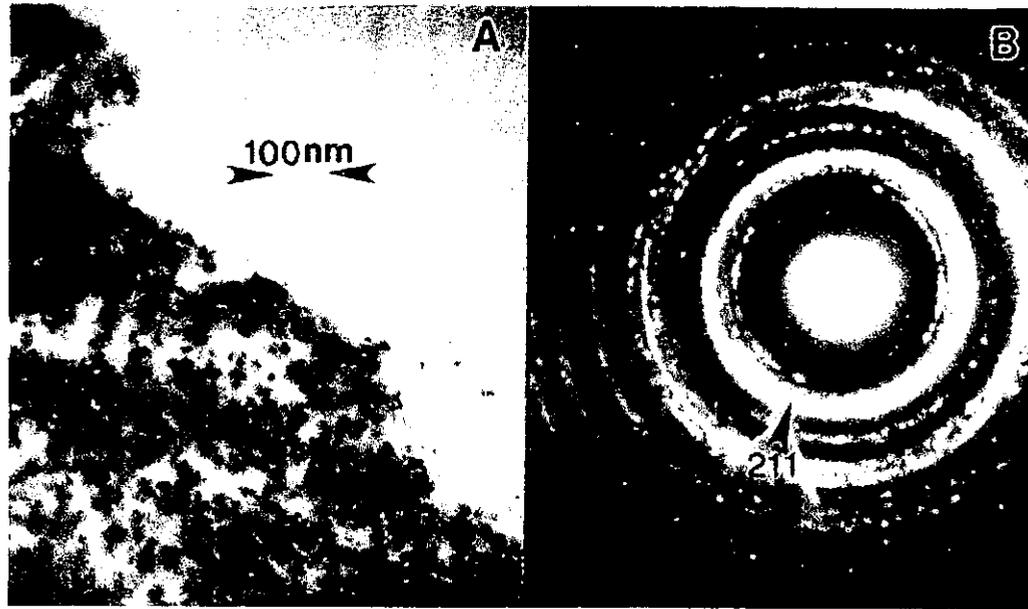


Fig. VI.17 (A) Imagen de MET en campo claro en la cual se pueden apreciar a los cristales de hidroxiapatita.(B) el patrón de difracción electrónica de área selecta de esa imagen. Nótese el anillo más intenso corresponde al plano [ 211] de la celda unitaria hexagonal de la hidroxiapatita.

indica que las imágenes que estamos observando en la Fig. VI.17 a , son cristales de hidroxiapatita, distribuidos en un patrón o forma irregular. Si los comparamos con los que hemos observado en el caso del esmalte dental, <sup>(33)</sup> se observa que el esmalte presenta un distribución de los cristales de hidroxiapatita más compacta que el que presenta la dentina.

En este caso también nos interesa saber el tamaño de los cristales de hidroxiapatita que conforman la dentina, puesto que ese es uno de los datos necesarios para conocer la estructura de la dentina y poder compararla con el esmalte. El esmalte por ejemplo, presenta cristalitas ordenados de hidroxiapatita que conforman al prisma y que miden alrededor de 200nm. en sección transversal y llegan a medir hasta 800nm. en sección longitudinal. En el caso de la dentina, no se observan cristales alargados, todos presentan diferentes formas, por lo que podemos decir que los cristales de hidroxiapatita que conforman a la dentina presentan una gran diversidad de formas (estructuras poliformes), y su tamaño está en el orden de unas décimas de nanómetro, tal y como lo muestra la Fig. VI.17.y el histograma de la Fig. VI.18

Haciendo un análisis de tamaño del grano que presentaron varias imágenes de microscopia electrónica de transmisión, podemos hacer un histograma y observamos inmediatamente que miden entre 20 y 30 nm. de diámetro, esto se muestra en la Fig. VI.19. Cabe mencionar que para obtener este histograma se usa el programa Program Grain de Soft Imaging System (SIS) de una PC

personal, para medir los tamaños de los granos que aparecen en las fotografías de MET que se obtuvieron.

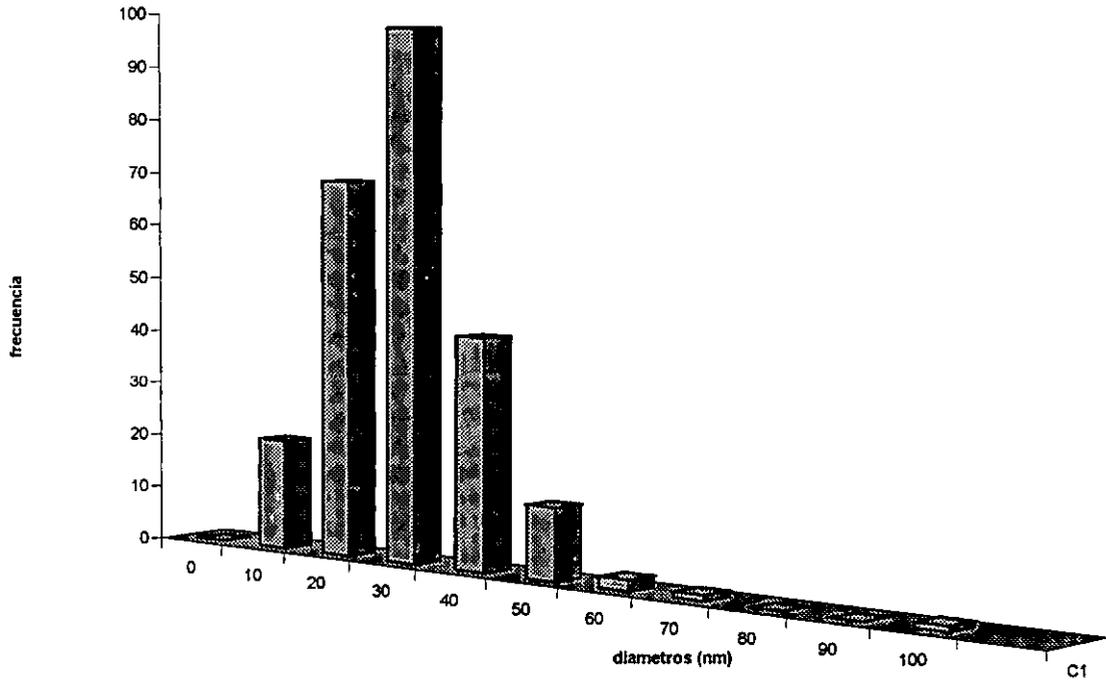


Fig. VI.18 Histograma de dentina en la cual se muestra que el diametro de los cristales que se presentan en las figuras VI.6 y VI.7 oscilan entre los 20 y 30 nm.

En la Fig. VI.19, vemos, la dentina en polvo que se uso para el estudio por difracción de rayos X y el cual se observó por MET. La Fig. VI.19 muestra estas imágenes en campo claro y en campo oscuro; el recuadro muestra una vez mas, el patrón de difracción característico de la hidroxiapatita. El campo claro se obtiene haciendo la imagen con el punto central, él más intenso, y lo que observamos en la Fig. VI.19 a, son los pequeños cristalitas que conforman la imagen. El campo oscuro se obtuvo seleccionando el anillo más intenso del patrón de difracción (Fig. VI.19b) y se observan los cristalitas en contraste brillante, ya que el anillo más intenso que corresponde al plano [211] de la estructura hexagonal de la hidroxiapatita, esta imagen cambia a una imagen en la cual, las zonas que difractan fuertemente se van a mostrar como zonas brillantes. Entonces, como vemos en la Fig. VI.19b, los pequeños cúmulos que se ven en campo claro en realidad están compuestos por cristales mucho muy pequeños, como lo muestra la imagen de campo oscuro. Estos cristalitas son del orden de los 20 y 30 nm.

En la Fig. VI.19 b, vemos cristalitas que conforman el polvo de la dentina. Esta Fig. VI.19 puede apreciarse este polvo en campo claro y campo oscuro. Otra forma de comprobar que estos cristales corresponden a cristales de hidroxiapatita, es analizando el patrón de difracción del cristal. Como muestra la Fig. VI.17b y la Fig. VI.19, los patrones de difracción están constituidos por anillos, que es la característica de materiales policristalinos. Esto significa que los cristales se encuentran ordenados al azar, es decir, que son cristales de hidroxiapatita, pero que cada uno esta ordenado de tal manera que vemos todas las orientaciones posibles dentro de la imagen que se observa en la Fig. VI.17 a. Para demostrar

que estos cristalitas presentan la estructura cristalina de la hidroxiapatita, hemos recurrido a la técnica de la Microscopía Electrónica de Alta Resolución.

### **Microscopía Electrónica de Transmisión de Alta Resolución**

La microscopía electrónica de alta resolución, gracias a la resolución que tiene el instrumento, las cuales son resoluciones atómicas (en este caso el microscopio JEOL 4000 EX, tiene una resolución de 1.7 Å, es decir estamos hablando de arreglos atómicos). Utilizando esta técnica hemos hecho la imagen de los cristales que se observan en la Fig. VI.17 y la Fig. VI.19, e inmediatamente vemos que el cristallito es hidroxiapatita, esto se presenta en la Fig. VI.20. Podemos ver inmediatamente en esta figura que los cristales son alargados, pero aunque esta alargado, no presenta un ordenamiento dentro de la estructura de la dentina como lo presentan en el caso del esmalte. En la figura 20 vemos un cristal de dentina de mas o menos 20 a 30 nm y lo vemos en la dirección [001] tal y como lo muestra el recuadro de la figura. En la figura cada una de estas líneas son la traza o la huella de los átomos que conforman a la hidroxiapatita, además vemos el contraste característico de este material en la dirección indicada.

Esto nos lleva, por lo tanto, a concluir que la dentina esta formado por cristales de hidroxiapatita, no ordenados y que estos miden entre 20 y 30 nm, y están embebidos en una matriz amorfa, muy posiblemente material orgánico.

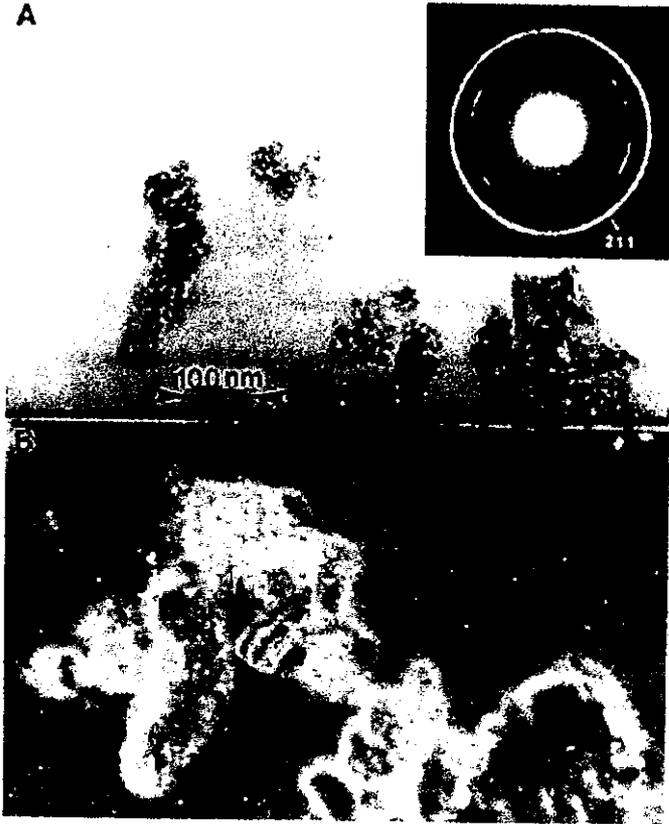


Fig. VI.19 (A) Imagen de MET de campo claro en donde se aprecia el poivo de dentina que se utilizó para el estudio de Rayos X. (B) Imagen de MET de campo oscuro, en donde se pueden observar a los cristales de hidroxiapatita. El recuadro muestra el patrón de difracción de la hidroxiapatita con las características de un material policristalino.

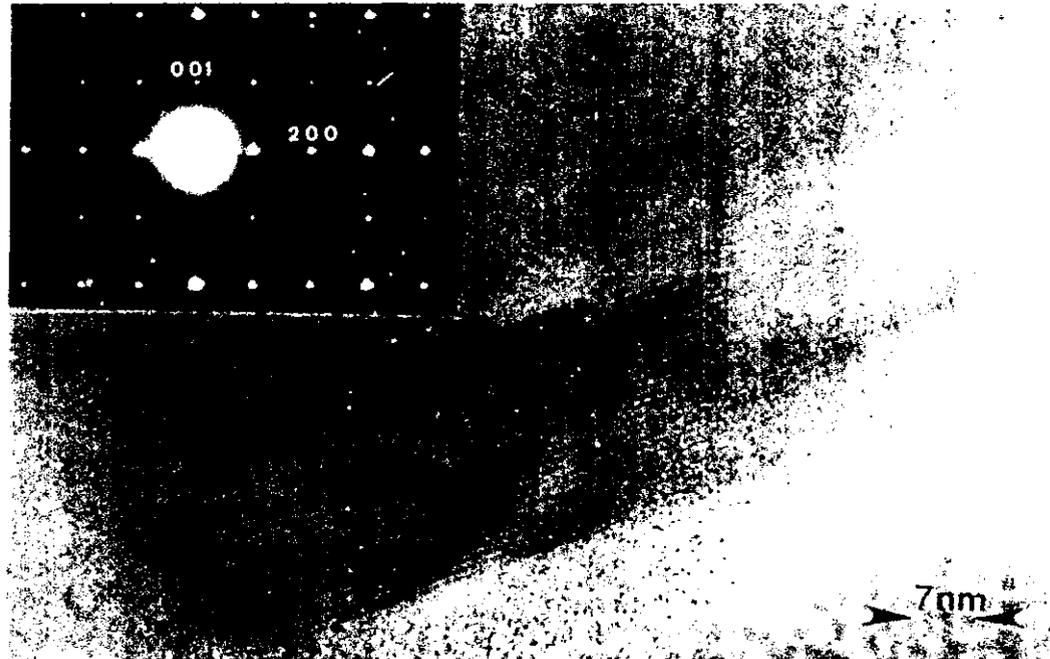


Fig. VI.20 Imagen de MET de Alta Resolución, la cual muestra a los cristales vistos en la dirección  $\{001\}$  y el patrón de difracción correspondiente. Nótese que los cristales están rodeados (embebidos) en una matriz amorfa.

## VII. DISCUSIÓN

Los resultados mostrados en el capítulo anterior nos muestran las características estructurales y químicas de la dentina, y de los cristales de la hidroxiapatita en la dentina. Estos han sido estudiados por diferentes técnicas. Hemos utilizado microscopia fotónica, microscopia electrónica de transmisión, microscopía electrónica de barrido y, aunado a esto hemos analizado la dentina por medio de difracción de rayos x. Todo esto nos ha llevado a observar que la superficie de la dentina esta densamente poblada de túbulos dentinarios, que en sección transversal se observan claramente hoyos circulares mientras que en sección longitudinal se pueden observar con formas que van desde circulares, elípticas, o canales, resultado de la trayectoria en "S" que presentan. Además se pueden apreciar el interior y el contenido de los túbulos. Estos resultados demuestran que estos túbulos van de la pulpa a la unión con el esmalte describiendo trayectorias sinoidal y que en su interior del túbulo contiene material orgánico, llamados prolongaciones odontoblásticas. (Fig. VII.1)

Los túbulos dentinarios están rodeados por pequeños cristales de hidroxiapatita, los cuales presentan dimensiones del orden de 20 a 30 nm. y que se encuentran distribuidos de forma azarosa, ya que no presentan la compactación que se observa en el caso del los prismas del esmalte. En el caso del esmalte se sabe muy bien, que los cristales de hidroxiapatita son alargados en dirección longitudinal, y que la cabeza del prisma contiene un ordenamiento diferente a lo que es la base del prisma; estos cristales se ven en la cabeza del

prisma en sección transversal, mientras que en la base del prisma se ven en sección longitudinal. Pero a final de cuentas en el esmalte son cristales muy bien orientados y definidos, alargados como si fuesen pequeñas tablillas.

En la dentina no es el mismo caso ya que se encuentran en formas azarosa. Esto lo veníamos comentando desde que observamos el espectro de rayos x en el cual se ve que existe un ordenamiento mas al azar en el caso de la dentina con respecto al esmalte. Podemos decir aquí que la estructura que presentan los cristales de hidroxiapatita en la dentina, son completamente característicos de un ordenamiento policristalino, mientras que en el caso del esmalte dental, muestran un ordenamiento que se conoce con el nombre de texturizado, i.e. con una dirección preferencial. Por lo tanto consideramos que se cumplió con el objetivo del presente trabajo de tesis, de tal forma que si observamos una imagen de esmalte y una de dentina, podemos fácilmente identificar cual corresponde a cual. Aquí en esta sección, queremos hacer una comparación de lo que dicen nuestros resultados, y lo que dice la literatura con respecto a lo estudiado.

Nuestros resultados indican que puede identificarse el tamaño de los cristales de hidroxiapatita y dos formas de distribución dentro de la misma zona, la cual se diferencia por su cercanía a los túbulos dentinarios. La densidad de cristalitos es mayor cerca de los túbulos que en la región intertubular. Con esto tratamos de dar una idea de cómo se encuentran organizados los átomos de hidroxiapatita en la dentina, sabemos que forman un cristal, y este a su vez, esta

en íntima relación con las fibras colágenas que dan nutrición y soporte a esta matriz.

Además de que se entendió de una manera convincente, como se encuentran organizados los cristales de hidroxiapatita, así como su estructura dimensional. Y saber en donde se encuentran cada átomo formando a esta estructura. Ahora, la imagen de la estructura de dentina se ha completado gracias a lo realizado en este trabajo de tesis; esta se muestra en la Fig. VII.1.

Es importante mencionar que con respecto a los resultados obtenidos de dentina y los conocimientos anteriores que sobre ella se tienen que han abierto el panorama de estudio de cómo esta conformada la dentina. Saber, por ejemplo, donde se encuentran los cristales de hidroxiapatita, y conocer el tamaño tridimensional del cristal, que aunque es la misma celda unitaria, para el esmalte, y el hueso, tiene propiedades, y características particulares para cada uno de ellos, dependiendo de la zona en la que se realice el estudio. Comprobamos que las prolongaciones odontoblásticas se extienden hasta la unión con el esmalte, aunque no se tiene idea en donde terminan dentro de éste. Además de que podemos decir a ciencia cierta, como se encuentran organizados los átomos que forman a la dentina, cual es su estructura y sus características dimensionales. Pero aún necesitamos conocer las propiedades de la matriz amorfa en la que se encuentran sumergidos estos cristales. En definitiva, el panorama de estudio se ha abierto, y ofrece cambios en el estudio del diente.

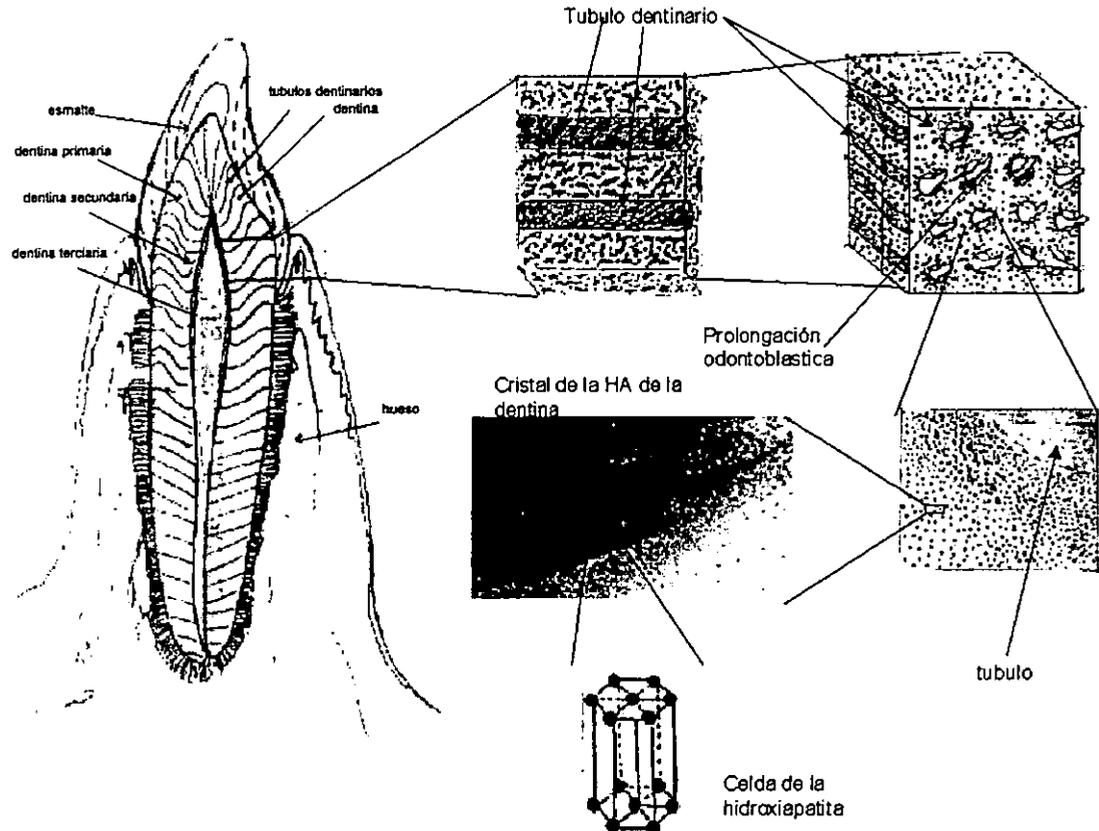


Fig. VII. 1 Esquema del diente donde se muestra la dentina, su estructura y prolongaciones odontoblásticas, tanto en sección transversal como longitudinal, así como la distribución de los cristales de hidroxiapatita y su celda unitaria.

Algo muy importante que cabe mencionar, es el tratamiento diario con el paciente, con esto queremos enfatizar lo importante de esta estructura, ya que de ello depende el fracaso o éxito de una rehabilitación. Ya que no consideramos muchas cosas al momento de realizar trabajo biomecánico sobre esta estructura, no tomamos en cuenta que entre más profunda sea una cavidad, aumenta el número de túbulos dentinarios, y por lo tanto las características de los materiales para la restauración deben de cumplir con ciertas condiciones, como por ejemplo un tamaño de partícula, así como la interfase diente-obturación la cual es de por sí muy difícil de controlar, ya que a mayor profundidad de la cavidad, mayor es el número de túbulos y por lo tanto, la cercanía a la pulpa se traduce en sensibilidad ó la posibilidad de dañar a la pulpa dental.

Algo que quedó muy claro para mí, fue el hecho de que ahora ya sé como son los cristales de hidroxiapatita, como se encuentran dentro de la dentina, para proporcionarle características específicas, como amortiguación de las fuerzas masticatorias hacia la pulpa dental, y soporte al esmalte.

Cabe mencionar que el poder ver el ordenamiento atómico crea un nuevo panorama y de una manera gráfica se explica cómo se encuentra formando a la dentina. Con esto queda esclarecida toda duda de la ubicación de la hidroxiapatita en una matriz de material orgánico.

Esperamos crear conciencia acerca de que el túbulo dentinario es un camino abierto o directo hacia lo que es la cámara pulpar, y que si no tomamos en cuenta esto, podemos causar un gran daño a la hora de realizar tratamientos.

Además pudimos observar que el grabado con ácido que realizamos en la dentina, debilita nuestras paredes, provocando por lo tanto el aumento del diámetro del túbulo, lo cual permite con mayor facilidad el paso de bacterias y agentes nocivos hacia la pulpa dental. Debemos recordar que el ataque ácido deja mas expuestos a las prolongaciones odontoblásticas, lo cual se reporta como sensibilidad o muerte pulpar, por no tomar en consideración estos factores.

## VIII. CONCLUSIONES

1. La dentina está constituida por túbulos que tienen de 1 a 2 micrómetros de diámetro y que van de la interfase pulpa-dentina a la interfase dentina esmalte. La trayectoria que siguen es recta o en forma sinoidal, o de "S" alargada.
2. La densidad de túbulos (mínimo de túbulos por unidad de área) es mayor en la interfase pulpa-dentina que en la interfase dentina-esmalte.
3. La parte inorgánica de la dentina está constituida por cristales de hidroxiapatita, los cuales presentan un arreglo azaroso o menos "compacto" que el que se presenta en el caso del esmalte. El tamaño de estos cristales es del orden de 20 a 30 nm, y se encuentran embebidos en una matriz amorfa (posiblemente de origen orgánico).
4. La dentina se puede, por lo tanto, clasificar como una estructura nanoestructurada que presenta cristales nanométricos embebidos en una matriz amorfa. Este tipo de arreglo le da las características físicas que se le conocen.
5. Los resultados obtenidos nos permiten clasificar al diente, por otra parte, dentro de los materiales compuestos, donde cada una de las interfases que

## PROPUESTAS

Al estudiar un poco mas a fondo la dentina, entendí su importancia y la necesidad de estudiarla a mayor detalle. Considero que el tema es muy amplio y que todavía pueden resolverse varias cuestiones con respecto a ésta y su estructura ultramicroscópica.

Un ejemplo de ello es la distribución de tamaños de partículas de hidroxiapatita con respecto a cada una de los tipos de dentina.

Otro podría ser, el numero de túbulos dentinarios en diferentes pacientes tomando como variable la edad.

Otro más sería el estudio de la penetración del ácido grabador por unidad de tiempo, para dar a conocer si los tiempos utilizados actualmente en la restauración, están siendo bien empleados.

## REFERENCIAS

1. Goracci G., Mori G., Extent of the odontoblastic process. Minerva Stomatology 1999; 48: 1-8
2. Houllé P., Voegel J.C. High Resolution Electron Microscopy Structure and Growth mechanisms of human Dentin Crystals. Journal Dental Research 1997 76(3): 895-904, April.
3. Schroeder L and Frank R.M. High Resolution Transmission Electron Microscopy of Adult Human Peritubular Dentine. Cell and Tissue Research, 1985; 242: 449-451.
4. Linde Anders and Goldberg Michel, Dentinogenesis. Critical Reviews in Oral Biology and Medicine, 1193 4 (5): 679-728.
5. Schoeder Hubert E. Oral structure Biology. Thiern Media! Publisher, New York, 1991.
6. Davis W.L. Histología y Embriología Bucal. edit Interamericana Mc. Graw Hill, México 1986 P.p 127-137.
7. Ten Cate, Arnold Richard Histología Oral , desarrollo de la estructura y función. Médica Panamericana, 1986 México.

8. Miguel José Yacamán, José Reyes Gasga, Microscopia Electrónica (Una visión del microscopio). Consejo Nacional de ciencia y tecnología F.C.E., México 1995.
9. Zeiss, Manual de Microscopia Óptica, México.
10. Donald E. Sands, (traductor G. Martín Guzmán), Introducción a la cristalografía. Editorial reverté, España, 1993
11. Barrio Paredes Ángel Rafael, Formación de Imágenes en el Microscopio Electrónico. UNAM Cuadernos del Instituto de Investigación en materiales, 1992.
12. Le Geros R.Z., Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine, Howard M Myers, san Francisco California (1991).
13. Eanes F.D. Journal Dental Research, 58B (1979) 829.
14. Bres E.F. Cherns D., Vincent R and Morinorili J.P., Acta Cryst. B49 (1993a) 56
15. Young R.A and Elliott V., Archs. Oral Biology., 11(1996) 699.
16. Young R. A., Journal Dental Research., 53 (1974) 193.
17. Kay M.I., Young R. A and Posner A.S., Nature, 204 (1964) 1050.

18. Aragón vera J.L. Notas; Fundamentos de cristalografía, Sociedad Mexicana de Cristalografía, A. C. México, 1999.
19. Moss S., Dental and Oral Tissues, Philadelphia, London, (1990) 234-258.
20. Gross J.K., Mehemel M.J., Zeits Krizt, 75 (1930) 323.
21. Reyes R. Marisol, Estudio Cristalográfico del Esmalte Dental Humano por Microscopía Electrónica, Difracción Electrónica y de Haz Convergente. Tesis, Junio del 2000.
22. Rodríguez Lara Jaime, Fundamentos de Cristalografía Física. Washington D.C. 1986, P 22.
23. Gross J.K., Mehemel M. J.: Über die Structur des Apatits. Zeits Krizt, 1930; 75:323.
24. América Ayuso Arce, Esmalte Dental Humano: Caracterización por Técnicas de Microscopía Electrónica. Tesis de Maestría, 1999.
25. Roso Michael H. Reigth Edward J. Romrell Lynn J. Histología Texto y Atlas a color Edit Panamericana. México D.F. 1992.
26. Marshal G.W. Jr. Et al, Atomic force microscopy of acid effects on dentin. Dent Mater 9:265-268, July, 1993.

27. Marshal Grayson W. Jr et al, Dentin demineralization: Effects of dentin depth, pH and different acids. Dent Mater 13:338-343, Nov, 1997.
28. Weiner Steve, Arthur Veiss, et al, Peritubular dentin formation: Crystal Organisation and macromolecular Constituents in Human Teeth. Journal Structural Biology 126, 27-41 (1999).
29. Goracci, G Mori, F. Marci, M Baldi, Extent of the odontoblastic process. Minerva Stomatology, 1999; 48:1-8
30. Reyes Gasga José, et al, La Microscopía Electrónica y el Esmalte Dental Humano. Ciencia y Desarrollo 125, noviembre/ diciembre, 1995, 30-43.
31. Kitamura Hinori Masatoyo Ode, et al. Color Atlas of Human Oral Histology. grafica Europam, LDA, Portugal 1992.
32. Brucker AXS GMBH Analytical X-RAY SYSTEMS (Manual). Federal Republic of Germany, 1997.
33. Berkovitz B.K. B. Et al, Color Atlas and Textbook of Oral Anatomy Histology and Embriology. Second Edition. Mosby, Year Book, London, 1992.
34. Powder Diffraction File, Sets 6-10 (revised) Inorganic Volume, Published by the Joint Committee on powder diffraction standards 1601, Park Lane, Swarthmore, Pennsylvania, Second Printing, October 1980.
35. Smith William F, Fundamentos de la ciencia e ingenieria de materiales. Segunda Edición, McGraw\_Hill, México, 1992.

36. Morales Sánchez Israel, Estudio de la Union Amelodentinaria. Tesis de Licenciatura. 2000.
37. Folleto de Zeiss. Microscopio de luz reflejada Axiolab A, óptimo para materiales.
38. Folleto de Zeiss, Microscopio de luz reflejada Axiotech, diseño de calidad superior para la Microscopia Técnica.
39. Folleto de Zeiss Axiovert 25 Microscopio Invertido, Microscopio utilizado para cultivo de tejidos.