

01475



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO

ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y QUÍMICO DE
ESMALTE Y DENTINA CARIADOS

T E S I S

QUE PRESENTA:

CD. GABY ESTHELA TIZNADO OROZCO

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRIA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

EN EL ÁREA DE BIOMATERIALES

DIRECTOR DE TESIS: JOSÉ REYES GASGA

MÉXICO, D.F.

AGOSTO, 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A TI MAMI, POR TU AMOR, PACIENCIA, CONSEJOS, ORACIONES, APOYO INCONDICIONAL EN TODA MI VIDA. MI ADMIRACIÓN, RESPETO Y AMOR POR ESA DOBLE LABOR DE MAMÁ Y DE PAPÁ (DESDE EL DÍA EN QUE ÉL FALLECIÓ).

A TI PAPI, POR TU AMOR Y ENSEÑANZAS, TE FUISTE EN UN MOMENTO CLAVE DE MI VIDA, TIEMPO FALTO PARA PODER SEGUIR APRENDIENDO DE TI Y VALORAR ESAS PLATICAS DE SOBREMESA CONTÁNDONOS TUS PATO AVENTURAS MARAVILLOSAS. NUNCA TE LO DIJE PERO TE AMO.

CHEPY, ERES EL OTRO PILAR DE LA FAMILIA, ADOPTASTE EL PAPEL DE PAPÁ, Y CON ELLO LA RESPONSABILIDAD DE SACAR A FLOTE A LA FAMILIA. TITO, LUNTY, TERE (MI GRAN COMPAÑERA) GRACIAS POR SU AYUDA, CONSEJOS, ENSEÑANZAS Y TAMBIÉN REGAÑOS, TODO MI AMOR. GRACIAS GABRIELA ULLOA, POR TÚ AYUDA DURANTE MI ESTANCIA EN EL DEPA.

DR. JOSÉ REYES, POR ACEPTAR A ESTA EXTRAÑA, POR COMPARTIR CONMIGO UN POCO DE SU GRAN CONOCIMIENTO, SU AMISTAD, PACIENCIA Y POR SUPUESTO REGAÑOS QUE NO PODÍAN FALTAR (PERO ESTOY SEGURA QUE TODAVÍA SE GUARDÓ MUCHOS MÁS).

ENRIQUE MEXÍA (CONOCIDO POR LOS CUATES COMO PEDRO O PETER), POR TU GRAN PACIENCIA AL ENSEÑARME POR HORAS Y HORAS EL MANEJO DEL EQUIPO, PREPARACIÓN DE MIS MUESTRAS, FOTOGRAFÍA, INDUCIRME A LA LECTURA (COMO OLVIDAR A INMACULADA O TLACAELEL), TUS CHARLAS, CONSEJOS, RECOMENDACIONES TURÍSTICAS, GRACIAS.

A MIS CUATES DEL INSTITUTO, AH! NO SE USTEDES PERO YO LOS CONSIDERO MIS CUATES (LOS ESCRIBO CONFORME LOS CONOCÍ) ANIUX (ACELERADA Y SABELOTODO 1), ALEX (PICO), ERICK EL GUAPO (SIEMPRE TOMANDO LAS COSAS CON TODA LA TRANQUILIDAD Y VIENDO LA FORMA DE MOLESTAR A TODO EL MUNDO), IVON (LA FLACA QUE SE CREE GORDA), RAFA (Y SU PAPÁ CABALLO), MANU, (RELAJADO, SIEMPRE RIÉNDOSE CONMIGO... O DE MÍ?), MARINA (LA RESPONSABLE), JOSEFINA (SABELOTODO 2), MARTITA, IVET, A SALVADOR, DR. JESÚS ARENAS, CARLOS FLORES, ROBERTO HERNÁNDEZ (PÍCARO) PEDRO, SAMUEL TEHUACANERO, A TODOS GRACIAS POR SU AMISTAD.

A JAQUELINE CAÑETAS, CARLOS MAGAÑA, CRISTINA ZORRILLA, POR SU AYUDA EN EL MANEJO DE LOS MICROSCOPIOS DE BARRIDO.

A MIS CUATES DE POSGRADO DE ODONTOLOGÍA: MEMÍN, COMPAÑERO EN LA MAESTRÍA, MUCHAS GRACIAS POR TU AMISTAD,

POR TUS BROMAS QUE ME DIVERTÍAN TANTO; A JULIETA ARENAS, JULY...GRACIAS!!! Y POR SUPUESTO A LORENA Y ANITA.

ANTONIO RESIQUES, TEOFILLO TÉCNICO DEL LABORATORIO DE HISTOPATOLOGÍA, POR SU AYUDA EN LA PREPARACIÓN DE LOS CORTES HISTOLÓGICOS.

A ROSY, NAYELI, DR. DANIEL QUEZADA, ING. IGNACIO (MI ÁNGEL DE LAS BECAS).

DR. FELIX ROBLES (POLLITO), OTRO ÁNGEL EN MI VIDA, DOC GRACIAS POR SIEMPRE APOYARME EN MIS LOCAS AVENTURAS. Y SABER QUE SIEMPRE ESTÁ AHÍ DISPUESTO A DARMÉ SU MANO PARA LEVANTARME, POR SU CONFIANZA EN MÍ.

MAK, GRACIAS POR TU PACIENCIA EN ESOS DÍAS DE ESTRÉS, GRACIAS POR TUS ABRAZOS, POR TU COMPAÑÍA, TQM.

LIC. FRANCISCO CASTELLON RECTOR DE LA UNIVERSIDAD AUNÓNOMA DE NAYARIT GRACIAS POR TODO SU APOYO. A LA DRA. ALMA ROSA ROJAS Y DRA. NARDA YADIRA POR SU AMISTAD.

GRACIAS AL APOYO FINANCIERO DE DGAPAUNAM (PROYECTO IN-104902). GRACIAS AL APOYO DE LA UNAM Y UAN POR LAS BECA COMPLEMENTARIAS COMO PARTE DEL PROGRAMA DE INTERCAMBIO ACADÉMICO.

ABREVIATURAS UTILIZADAS

ML	MICROSCOPIA DE LUZ
MEB	MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO
EDS	ESPECTROSCOPIA POR DISPERSIÓN DE ENERGIA
H y E	HEMATOXILINA Y EOSINA
B y B	BRAWN Y BRENN

ÍNDICE

RESUMEN	3
SUMMARY	4
INTRODUCCIÓN	5
Planteamiento del Problema	6
Objetivos	7
Hipótesis	8
Justificación	8
 1. ESMALTE	
1.1 Estructura.....	10
1.2 Composición química	12
2. DENTINA	
2.1 Estructura.....	14
2.2 Composición química	16
 3. CARIES	
3.1 Antecedentes	18
3.2 Proceso de la caries	18
3.3 Caries del esmalte	19
3.4 Caries de la dentina	23
3.5 Saliva	23
3.6 Bacterias asociadas a la caries.....	25
3.6.1 Mecanismo de adhesión de las bacterias.....	27
3.7 Aspectos preventivos de la caries.....	30
 4. TÉCNICAS DE ANÁLISIS	
4.1 Microscopía de Luz	33
4.2 Microscopía Electrónica de Barrido	34
4.2.1 Interacción haz-muestra.....	35
4.3 Rayos X característicos	36
4.4 Técnicas de Microanálisis	37
 5. METODOLOGÍA	
5.1 Preparación de muestras para MEB	39
5.2 Preparación de muestra para tinciones	42
5.3 Cultivos	46
 6. RESULTADOS	
6.1 Microscopía de Luz	49
6.2 Microscopía Electrónica de Barrido	57
6.2.1 Cortes histológicos	57

6.2.2 Diente con caries	58
6.2.2.1 Esmalte	58
6.2.2.2 Dentina	68
6.2.3 Bacterias	72
6.3 EDS	76
6.3.1 Dentina	76
6.3.2 Bacterias	81
6.4 Diente Pulido	84
6.4.1 Microscopía de Luz.....	85
6.4.2 Microscopía Electrónica de Barrido.....	87
6.4.3 EDS	89
6.5 Cultivos	91
6.5.1 Microscopía de luz.....	91
6.5.2 MEB	93
6.5.3 EDS	93
7. DISCUSIÓN	
7.1 Esmalte	97
7.2 Dentina	99
7.3 Bacterias.....	100
7.4 Cultivos	103
8. CONCLUSIONES	105
REFERENCIAS	106

RESÚMEN

En este trabajo de tesis se analizó la estructura y composición química del esmalte y dentina afectados por procesos de caries usando técnicas de análisis de Microscopía de Luz (ML), Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) de alto y bajo vacío, y microanálisis de rayos X (EDS). Las muestras estudiadas fueron dientes con lesiones de caries en diferentes estados de avance. Los resultados nos mostraron los cambios que presentan las estructuras del diente conforme vaya avanzando el proceso de caries. Observar la superficie del esmalte cariado con el MEB, nos reveló la presencia de fositas de diverso tamaño así como la disolución del centro de la estructura de algunos prismas. En el caso de la dentina la caries provoca una dilatación de los túbulos dentinarios con diámetros aumentados hasta los 10- 15 μm , también observamos zonas de dentina terciaria, así como la evidente presencia de bacterias en los sitios de la lesión cariosa. A partir de la morfología de las bacterias (estructuralmente rectangulares) se deduce que éstas deben pertenecer a la familia de los *Lactobacillus*. A las bacterias se les realizaron análisis con EDS encontrando un alto porcentaje de azufre, así como potasio, magnesio, sodio y carbono elementos presentes en material orgánico. La presencia del azufre se asocia a la presencia de las bacterias, pero se desconoce su origen con exactitud. De análisis químicos en esmalte y dentina con caries se encontró una relación Ca/P de 1.93 y 1.54 respectivamente, lo cual indica una mayor concentración de Calcio en estos tejidos cariados.

Palabras claves: Caries, esmalte, dentina, estructura, túbulos dentinarios, bacterias, Microscopio óptico, microscopio electrónico de barrido, bacterias.

SUMMARY

In this work we did the chemistry composition and structure analysis of the enamel and dentin affected with carious. The Specimens were examined with microscopy techniques such as: Light Microscopy (LM), Scanning Electron Microscopy (SEM) high and low vacuum, and X ray microanalysis (EDS). The result showed the advance of carious process and the presence of the bacteria within place of organic and inorganic material destruction. The surface of carious enamel was examined with SEM, showed presence of foveas and the dissolution in the center of some prism. In dentin, the dentinal tubules were expanded until to 10 or 15 μm , also we view places with tertiary dentin and presence of bacteria. We deduced by the morphology of the bacteria (which is likeness to rectangular shape) that this belong to *Lactobacillus* family. At bacteria to do analysis with EDS we founded a high concentration of sulfur, as well as potassium, magnesium, sodium and carbon elements present in organic material. Sulfur is associated to bacteria, but its origin is not clear. Chemistry analysis in dentin and enamel with carious showed to relation Ca/P of 1.93 and 1.54 respectively, which indicate the most concentration of Ca.

INTRODUCCIÓN

La caries dental constituye un problema de salud bucal importante en nuestra Población.⁽¹⁾ A nivel mundial es una de las principales patologías presentes en la población, la Organización Mundial de la Salud indicó que el 80% de la atención profesional de salud bucal se concentraba en el 25% de la población total, lo cual indica lo limitada que se encuentra la atención dental para la mayoría de las personas ⁽²⁾. Estudios realizados en siete estados de México sobre la prevalencia de las enfermedades bucales, en 2 500 pacientes durante 1990 y 1991; se encontró un promedio de 5 dientes con lesiones cariosas por paciente. En investigaciones realizadas en México se encontró que el porcentaje de individuos sin caries fue relativamente bajo (10.7%). A esta alta prevalencia de caries se encuentra aunada una deficiente experiencia restauradora dentro de un nivel primario de tratamiento dental. ⁽³⁾

Se han realizado numerosas investigaciones tratando de explicar la manera en que se lleva el proceso carioso así como de los factores que participan en la iniciación y evolución del proceso. Por lo que en el transcurso de la historia se han venido manejando diferentes definiciones de lo que es la caries.

La caries como una enfermedad bacteriana que afecta el tejido calcificado del diente y se caracteriza por desmineralización de la parte inorgánica y destrucción de la porción orgánica del diente.⁽⁴⁾ Otros autores lo definen como un proceso de disolución del esmalte, dentina o cemento, causado por la acción microbiana sobre la superficie dental, en la que interviene el flujo fisicoquímico de iones disueltos en el medio ambiente bucal.

La patogénesis de la caries incluye tres factores: se presenta cuando la superficie de un diente susceptible es colonizada por bacterias y existe una dieta rica en sacarosa o azúcar refinada. Las bacterias patógenas producen ácido láctico (CH₃.

CHOH, CO₂H), ácido acético (CH₃.CO₂H) y ácido propiónico (CH₃.CH₂.CO₂H), los cuales se forman por la fermentación de carbohidratos; estos ácidos se encargan de disolver los cristales de hidroxiapatita del diente⁽⁵⁾ Cuando en el diente se presentan ya manifestaciones clínicas producto del proceso de caries, los daños son irreversibles, siendo necesaria la rehabilitación del diente, de tal manera que se restituya el tejido dental perdido.

El objetivo de esta investigación fue estudiar el esmalte dental y la dentina con caries, analizando los cambios estructurales y químicos que se presentan en estos tejidos al ser afectados por el proceso de caries. Este trabajo fue realizado en el Instituto de Física de la UNAM, donde se tiene una infraestructura de primer nivel, así como un grupo de técnicos altamente calificados, para el manejo del equipo necesario para la preparación, observación y análisis de las muestras. Así mismo para la preparación, observación y análisis de cortes dentales, se contó con el apoyo de académicos y técnicos en el área de patología bucal, así como de las instalaciones del laboratorio de histopatología de la Facultad de Odontología, División de Estudios de Posgrado, UNAM.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La caries dental es una patología bucal infecciosa compleja, interviniendo una diversidad de factores: pH de la saliva, componentes presentes en saliva y grado de saturación; susceptibilidad del diente al proceso de caries, defectos de formación y mineralización del diente; presencia de bacterias sobre la superficie dental así como los productos del metabolismo de estas (ácidos).

Se ha manejado que la caries tiene como inicio la disolución de los componentes inorgánicos del esmalte y de la dentina. No obstante también existe la posibilidad de que la matriz orgánica del esmalte sea la primera estructura en ser atacada, provocando la degradación de componentes orgánicos causado por enzimas

proteolíticas. En la teoría acidogénica se postula que el esmalte es atacado por ácidos orgánicos que se producen por metabolismo microbiano. Las bacterias proteolíticas (principalmente estreptococos y lactobacilos acidogénicos), invaden las vías orgánicas del esmalte, produciendo agentes ácidos que extienden la lesión hacia la fase inorgánica del esmalte; lo cual se manifiestan como signos de caries dental.

El estudio de los tejidos dentarios como son el esmalte y la dentina desde un punto de vista estructural es interés para la ciencia odontológica; en el desarrollo de un proceso de caries éstos son los primeros en ser afectados. Al tener en claro cuales son las características estructurales del esmalte y dentina con caries, estaremos en la posibilidad de comprender más el desarrollo del proceso carioso.

En este trabajo de Tesis se planteó el estudio de los cambios estructurales y los daños ocasionados por la presencia de una lesión de caries, poniendo énfasis en la observación de los cambios que presentan tanto el esmalte como la dentina, y algunos de los microorganismos implicados en esta patología. Hay diferentes herramientas para el estudio de la estructura dental, siendo las técnicas de microscopía electrónica de barrido (MEB) una de las más importantes para el estudio de las superficie y estructura del diente; así mismo para determinar la, cantidad y distribución de los elementos y compuestos presentes en esmalte y dentina. Las técnicas de microanálisis de dispersión de rayos X (EDS) y mapeos químicos, fueron básicas para la realización de esta tesis.

OBJETIVOS

GENERAL

- Describir las estructuras físicas y químicas del esmalte y dentina en dientes afectados con caries.

ESPECÍFICOS

- Comparación de la razón Ca/P e identificación de los elementos esperados dentro de las estructuras cristalinas tanto del esmalte como de la dentina en dientes con caries.
- Describir la presencia de microorganismos en la lesión de caries.

HIPÓTESIS

H1: A mayor avance en profundidad del proceso carioso mayor degradación de los elementos estructurales del esmalte y dentina.

H2: A mayor avance en profundidad del proceso carioso, mayores diferencias en cuanto a la composición química del esmalte y dentina cariados.

H3: Existencia de microorganismos asociados al proceso de caries.

JUSTIFICACIÓN

Estudios realizados en diversos grupos de población en nuestro país y la información sobre la demanda de atención odontológica en los servicios de salud en México, indican que la caries dental se trata de un padecimiento de alta prevalencia. La Secretaría de Salud (SSA), en el año de 1980, realizó una encuesta de morbilidad bucal en escolares del D. F., cuyos datos indicaron que el nivel de caries dental de los escolares era alto, de acuerdo con la clasificación de la organización Mundial de la Salud (OMS) y de la Federación Dental Internacional (FDI).

Son varios los factores que participan para que se de el inicio y desarrollo de la caries, siendo uno de ellos los microorganismos. Históricamente estos han sido involucrados como causantes de la caries, existiendo una controversia en cuales de ellos son los presentes en caries superficiales y caries profundas. Así mismo, existe la necesidad de reconocer y analizar los rasgos estructurales del esmalte y dentina atacados por ácidos producto de microorganismos presentes en un proceso de caries. Saber en que condiciones queda el tejido cariado, que estructuras se conservan y cuales se degradan es algo importante a tomar en cuenta por el odontólogo en el momento de realizar las restauraciones de las cavidades formadas por el proceso de caries.

1. ESMALTE DENTAL

1.1 Estructura

El esmalte dental es un tejido altamente mineralizado que se encuentra cubriendo a la dentina en lo que es la corona anatómica, presentado un espesor mayor en lo que es la zona de las cúspides y borde incisal, aproximadamente de 2.5 mm. adelgazándose conforme llega a nivel de cuello. ⁽⁶⁾

La unidad básica del esmalte dental es el prisma, el cual presenta un diámetro promedio de 3 a 6 μm (figura 1.1). A su vez, el prisma está compuesto de millones de cristales de hidroxiapatita. ⁽⁷⁾

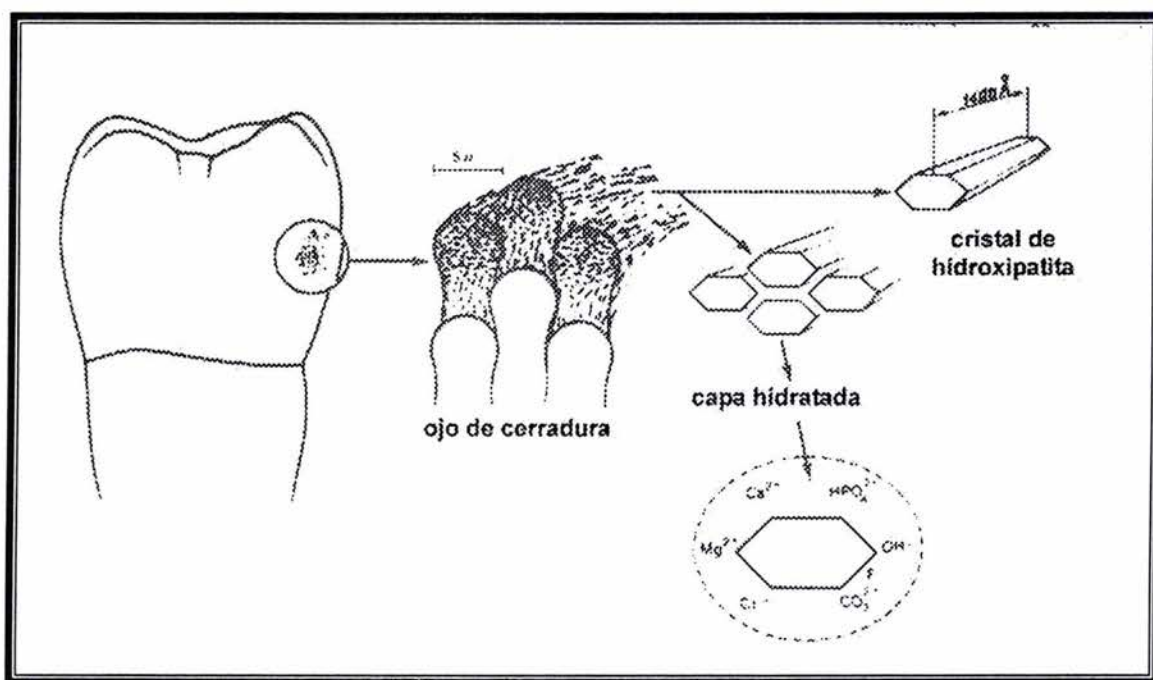


Figura 1.1. Esquema que muestra la microestructura del esmalte dental. Los prismas expuestos en forma de ojo de cerradura, así como la disposición de los cristales de hidroxiapatita dentro de los prismas del esmalte. ⁽²⁹⁾

En algunas zonas los prismas pueden aparecer rodeados de una vaina la cual está constituida por un mayor contenido de proteínas⁽⁸⁾ En la interfase entre un prisma y otro, existe la presencia de poros o espacios, debido a la disposición de los cristales de hidroxiapatita, estos espacios contienen material orgánico y agua.⁽⁹⁾

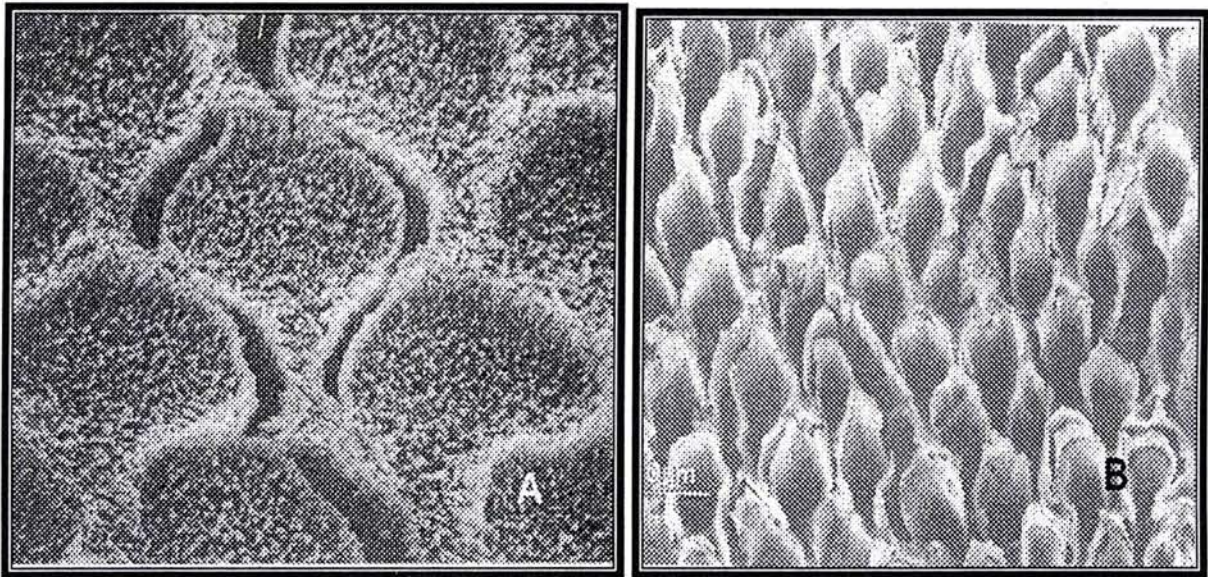


Figura 1.2 Imágenes de MEB del esmalte, corte transversal de los prismas mostrando el característico forma de ojo de cerradura, después de un ataque ácido.^(8, 10)

En cortes transversales los prismas presentan un arreglo característico, conocido como ojo de cerradura. Cada ojo de cerradura corresponde a un prisma y cada prisma corresponde a un ameloblasto (figura 1.2).^(7, 10)

La formación de esmalte se lleva a cabo en periodos alternados de velocidad, reflejándose como bandas oscuras que corren oblicuamente a través del espesor del esmalte.^(6, 7) Estas líneas llamadas estrías de Retzius, representan el crecimiento semanal del esmalte. Las estrías de Retzius se extienden desde la unión amelodentinaria hasta la superficie en la cual terminan dando un aspecto de surcos conocidos como periquimates, los cuales son eliminados rápidamente por el proceso de abrasión que sufre la superficie del esmalte.⁽⁶⁾

Otras estructuras encontradas en el esmalte son los penachos y laminillas del esmalte, considerados como defectos. Los penachos del esmalte se proyectan desde la unión amelodentinaria hasta una distancia corta dentro del esmalte dando una apariencia de ramificaciones, y presentan la mayor concentración de enamulina que cualquier otra zona del esmalte.⁽⁶⁾

Las laminillas del esmalte salen de la unión amelodentinaria extendiéndose considerablemente poco antes de llegar a la superficie del esmalte, en las cuales se acumula material orgánico.⁽⁶⁾ El significado clínico de estas estructuras no es conocido y tampoco parecen estar consideradas como sitios vulnerables al ataque carioso.⁽¹¹⁾

1.2 Composición química

La composición elemental del esmalte maduro está conformado principalmente en un 96% de material inorgánico y 4% de material orgánico y agua. La fase mineral del esmalte está identificada como fosfato de calcio con estructura de hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, ésta no es estequiométrica, y cuenta con una gran cantidad de elementos traza, así como sustituciones iónicas.⁽⁷⁾ La mayoría de las sustituciones de iones da como resultado un incremento en la solubilidad de los cristales de hidroxiapatita en medios ácidos; una excepción es la sustitución del ion fluoruro por el ion hidroxilo, ya que el resultado de esta sustitución es un incremento en la resistencia a la solubilidad del cristal en ambientes ácidos.⁽⁸⁾

Las apatitas biológicas se caracterizan por su relación molar Ca/P; para la hidroxiapatita pura es 1.67, lo mismo para la fluorapatita y cloroapatita ya que estos iones sustituyen a los grupos hidroxilos, por lo que la relación Ca/P no se altera.⁽⁹⁾

La concentración de fluoruro es generalmente alta en regiones externas del esmalte disminuyendo al alejarse de la superficie. La concentración de carbonato sigue un

modelo invertido, es mas baja su concentración en la superficie y aumenta en dirección de la unión amelodentinaria; un aumento en la concentración de carbonato parece facilitar la disolución ácida del esmalte.⁽¹³⁾

El magnesio es un elemento importante para el desarrollo del diente, se ha sugerido que se encuentra principalmente asociado a la matriz orgánica. En análisis químicos se ha visto que la concentración de Mg es baja en la superficie del esmalte, aumentando hacia la unión ED.⁽¹³⁾ *In vitro* el Mg ha mostrado suprimir la cristalización de hidroxiapatita, promover la formación de fosfato dicálcico dihidratado aún en un pH neutro.⁽⁶⁾

Se cree que el contenido menor de carbonato y magnesio en el esmalte cariado podría reflejar la baja concentración de estas sustancias en el sitio de la lesión durante la recristalización ó una pérdida preferencial de las sustancias durante la desmineralización.⁽¹³⁾

Algunos iones, como el estroncio aparecen uniformemente distribuidos en toda la profundidad del esmalte. El contenido de calcio y fósforo en el esmalte es generalmente inferior a los valores encontrados en las apatitas de fosfato cálcico puro, de ahí que se considere deficiente en calcio. El contenido general de fósforo en el esmalte se debe a la presencia del ion fosfato trivalente.⁽⁹⁾

Algunos elementos traza como Sr y Zn parecen estar asociados con el proceso carioso, a los cuales se le atribuye una acción bacteriostática.⁽¹¹⁾ La manera en que elementos traza ayudan a reducir la frecuencia de caries, es por que pueden modificar la forma y tamaño de los cristales de hidroxiapatita, cambiando la morfología dentaria y solubilidad del esmalte.

2. DENTINA

2.1 Estructura

La dentina, el más voluminoso de los tejidos mineralizados del diente. Se compone de una fase mineral en un 70% en peso y una fase de material orgánico que constituye un 20% y el resto constituido por agua.⁽⁷⁾

Los túbulos dentinarios son el aspecto morfológico más notable de la dentina, tienen un diámetro de 1 a 3 μm alojando en su interior a los procesos odontoblásticos (figura 2.1), siendo estos últimos responsables de la formación y del mantenimiento de la dentina.^(14, 16)

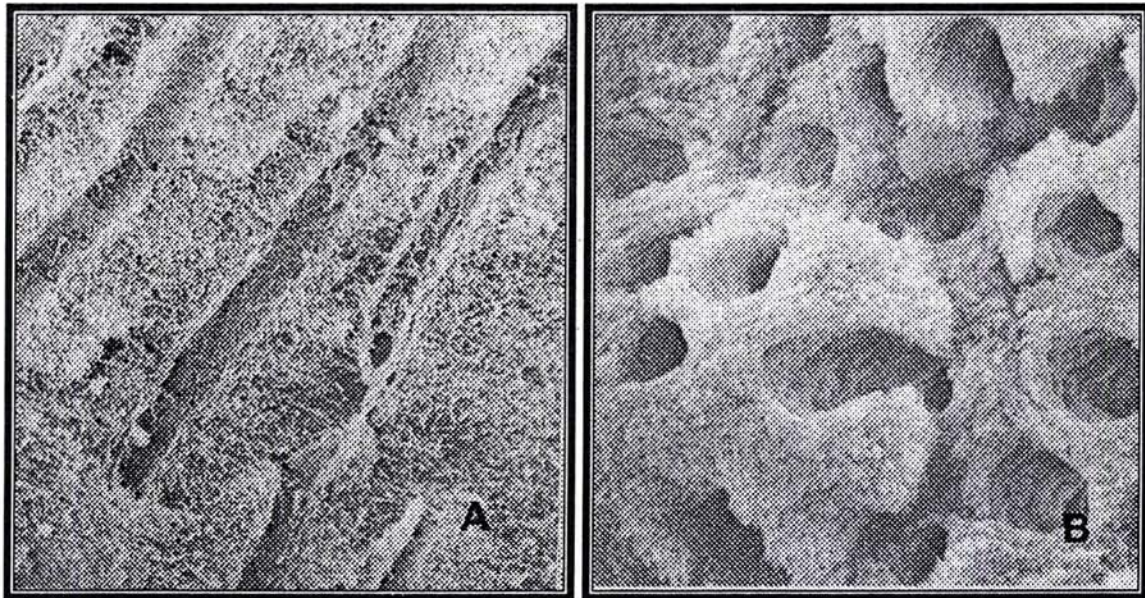


Figura 2.1 Imágenes de MEB de la dentina. A) Túbulos dentinales en sentido longitudinal. B) Vista transversal de los túbulos dentinarios.⁽¹⁹⁾

La dentina está compuesta de una red continua de fibras colágenas tipo I y II, proteínas no colágenas como la fosfoforina y cristales de apatita carbonatada.⁽¹⁷⁾ Las proteínas están involucradas en la nucleación, así como en el crecimiento inicial y orientación de los cristales de hidroxiapatita; estos cristales llegan a tener un tamaño promedio de 36 nm de longitud, 25 nm de anchura y 10 nm de altura orientados en forma paralela a las fibras de colágena.⁽¹⁸⁾

En los primeros pasos de la mineralización, los cristales pueden crecer directamente en una estructura de hidroxiapatita, pero algunos autores (Barry, 1989) han propuesto que la formación de los cristales de hidroxiapatita puede ser precedida por la transitoria formación de fosfato octacálcico (OCP). Desde un punto de vista termodinámico, la formación de OCP a 37 grados es más fácil y rápida que la formación de hidroxiapatita.^(17, 18)

La dentina primaria constituye la mayor parte del tejido dentinario y dentro de ella se encuentra la dentina de manto con un espesor de 5 a 30 μm , correspondiendo a la primera capa de dentina formada.⁽¹⁹⁾ En su fase orgánica la dentina de manto presenta delgadas fibrillas $-\alpha$ de colágena, esto la va a diferenciar de la dentina circumpulpar, en la cual están ausentes.⁽¹⁷⁾ El resto de la dentina primaria es generalmente referida como dentina circumpulpar la cual a su vez se divide en dentina intertubular y dentina peritubular.⁽¹⁹⁾ La dentina intertubular es la principal secreción producto de los odontoblastos constituyendo el mayor volumen de la dentina primaria.⁽¹⁹⁾ Mientras que la dentina peritubular está presente como una vaina poco voluminosa de tejido mineralizado en la periferia del túbulo dentinario; es un tejido hipermineralizado con poca cantidad de colágena, siendo su fase inorgánica la apatita carbonatada. Las diferencias entre el contenido mineral entre estas dos zonas es mínima, siendo la mayor diferencia encontrada de un 9%, ambas presentan una relación Ca/P muy similar, alrededor de 1.49.⁽¹⁸⁾

El arreglo de las fibras de colágena dentro de la matriz dentinal a sido reportado por numerosos investigadores (Rouller et al, 1952; Scott, 1955; Nylen y Scott, 1969).⁽²¹⁾ Observándose una orientación circunferencial en la matriz de la dentina peritubular y en la matriz de la dentina intertubular tienen una orientación similar a un enrejado.⁽²¹⁾

La dentina secundaria, es formada en un menor grado una vez que la raíz del diente se ha completado y el diente inicia su actividad funcional. La dentina terciaria se forma como respuesta a los estímulos externos como procedimientos

restaurativos, atrición, caries, irritantes químicos; en la formación de dentina terciaria la velocidad y cantidad en que se presente se encuentran asociados con la duración e intensidad del estímulo.⁽¹⁵⁾

Algunas de las propiedades físicas de la dentina son dureza, elasticidad y permeabilidad. La permeabilidad de la dentina es una propiedad que varía de acuerdo a la edad del diente, grado de mineralización de los túbulos y cantidad de ramificaciones de los túbulos. En la dentina coronal hay un promedio de 15 mil túbulos, en la parte media de la dentina 36 mil túbulos y en la zona cervical un promedio de 58 mil túbulos dentinario por mm² (Mjor y Nordahl),⁽²⁰⁾ permitiendo el paso a distintos elementos como componentes inorgánicos y microorganismos.⁽¹⁵⁾ La forma más común de ramificación encontrada es en forma de Y aproximadamente de 0.5 a 1.0 µm de diámetro. Otro tipo de ramificación son las micro-ramificaciones, cuyos diámetros son de 50 a 100 nm con posible participación en los cambios fisiológicos dentinales. En la raíz se han llegado a encontrar micro ramificaciones que van de los 300 a 700 nm de diámetro.⁽²⁰⁾

2.2 Composición química

En investigaciones realizadas se reporta la presencia de los siguientes elementos de mayor a menor concentración en dentina sana (peso en seco %) (tabla III.1).

Elemento	Concentración promedio
Ca	26.9
P	13.2
CO ₃	4.6
Na	0.6
Mg	0.8
Cl	0.06
K	0.02

Figura II. 5 Tabla con los elementos presentes en mayor concentración en dentina.⁽⁹⁾

La dentina también contiene cerca de un 0.9% por peso de citrato y 0.25% de pirofosfato, los cuales parecen ser absorbidos dentro de los cristales. Otros elementos presentes son los elementos traza, estos se encuentran en cantidades muy pequeñas.⁽⁹⁾

3. CARIES DENTAL

La caries dental es un complejo proceso dinámico, físico y químico una de las enfermedades que más afectan al hombre, de acuerdo con un boletín expedido por el Centro de Prevención y Control de Enfermedades en 1996.⁽²²⁾ La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la caries como un proceso patológico de origen externo, que se inicia después de la erupción y determina un reblandecimiento del tejido duro del diente evolucionando hacia la formación de una cavidad. La prevalencia de caries dental en países en desarrollo va en incremento, lo que explica por que la caries dental es una enfermedad principalmente de niños, si el 80% de los niños del mundo viven en países en desarrollo. La razón de este incremento es una combinación de una mala nutrición, falta de medidas preventivas, comida rica en azúcar y refrescos.⁽⁷⁾ En Estados Unidos más de 40 millones de dólares por año se invierten para el tratamiento de las secuelas de la caries dental.⁽³⁾

La prevalencia de caries dental ha ido disminuyendo en los países industrializados, según expertos se debe a la presencia de fluoruro en el agua. Sin embargo, en países como Japón donde el uso de fluoruros es mínimo también presentan un rápido deceso en el desarrollo de caries. De manera alterna algunos investigadores proponen que este descenso está relacionado con un aumento en el uso de antibióticos. Esta hipótesis es considerada positiva debido a la sensibilidad de los microorganismos orales a ciertos antibióticos, tales como la penicilina.⁽²⁾

La caries dental se considera una enfermedad multifactorial, resultado de la intervención de tres factores principales: el hospedador (individuos de alto y bajo riesgo, saliva), la microbiota y la dieta; siendo necesario la interacción de los tres durante un período de tiempo suficiente para que se desarrolle la caries.⁽²³⁾

3.1 Antecedentes

A través de la historia se han manejado diversas teorías para explicar el origen y mecanismo de la caries. Una de las primeras teorías se estableció en el siglo XVIII, en la cual se tenía la creencia de que la caries dental era el producto de la acción destructiva de un gusano que atacaba y destruía los dientes: el gusano dentífago.

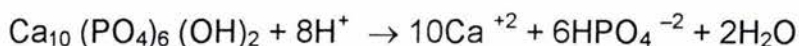
A inicios del siglo XIX esta creencia fue sustituida por el concepto de que los restos alimenticios atrapados entre los dientes eran los causantes de la lesión cariosa. Es en 1890 a partir de investigaciones realizadas por Miller, que se inicia un conocimiento más profundo sobre la caries. La teoría químico-bacteriana, maneja un origen infeccioso de la caries estableciendo que es la acción acidogénica de las bacterias existentes en la boca, las que actuando sobre los azúcares de los alimentos producen los ácidos que atacan el tejido dentario

Klinger en 1916, señala que el agente etiológico de la caries debía ser un microorganismo acidogénico y al mismo tiempo acidúrico, asociando al *Lactobacillus* a lesiones cariosas de dentina. En 1924, Clarke logra identificar al *Streptococcus mutans*, entre los microorganismo presentes en lesiones cariosas incipientes.⁽³⁴⁾

3.2 Proceso de la caries

El proceso de la caries debe incluir la difusión de los reactantes (ácidos), hacia el sitio de la reacción (tejidos mineralizados), seguida por la reacción (disolución) y por la difusión de los productos de la reacción lejos del sitio en que se formaron. La reacción entre una solución y un sólido es heterogénea y depende de la velocidad de difusión de los reactantes hacia la superficie del sólidos. En la reacción química, la interacción más lenta en el proceso determina la velocidad de disolución.⁽³⁰⁾ La disolución del esmalte se puede describir por medio de fórmulas

termodinámicas y cinéticas convencionales. Un factor que determina la disolución del esmalte es la solubilidad de la hidroxiapatita, otro factor es la velocidad de disolución.⁽³⁰⁾ Puesto que este material es hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, su disolución es:



Se liberan iones de calcio, fosfato y agua. Por lo tanto la disolución del esmalte proporciona calcio y fosfato que pueden reaccionar con la solución y la superficie del esmalte para formar otras fases. Por ejemplo con el calcio la fase superficial del esmalte podría ser fosfato dicálcico dihidratado ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Otros cationes formarán sales insolubles de fósforo. La forma del ión fosfato está determinada por el pH del sistema. Hay que tomar en cuenta que la disolución del esmalte es afectada por la placa bacteriana, la saliva y las fases minerales de la superficie.⁽¹³⁾

Los cambios químicos que se presentan durante el proceso de destrucción del esmalte por caries son complejos debido a un número de factores: primero, la hidroxiapatita substituida (esta se comporta de manera compleja durante la disolución, debido a la habilidad de aceptar iones sustitutos) y al amplio rango de especies de fosfato cálcico, que se pueden formar seguida la disolución. La composición, la extensión de la sustitución y los cambios que se dan en el esmalte en la dirección del ataque carioso de la superficie al interior, nos dan una idea de que la destrucción por caries no es simple.⁽⁹⁾ El papel que juega el material orgánico requiere de mayor investigación, pero está la posibilidad de que participe inhibiendo la "reparación" y facilita la redeposición.⁽²⁸⁾

3.3 Caries de esmalte

Los cambios tempranos visibles son manifestados usualmente por una pérdida de transparencia, resultando una región opaca,⁽²⁴⁾ llamada "mancha blanca". Esta mancha representa varios niveles de desmineralización de la superficie y

subsuperficie del esmalte,⁽²⁵⁾ registrándose una pérdida de minerales en un 8% en la superficie, mientras que en una lesión localizada por debajo de la superficie se encuentran áreas con pérdida de mineral de un 20 a 90%. Los periquimatos pueden estar más acentuados.⁽²⁶⁾

El esmalte dental es susceptible a la desmineralización por la acción de los ácidos, siendo muy reactivo, proceso que realiza a partir de un constante intercambio iónico con el medio externo.⁽³¹⁾ La evidencia más temprana de desmineralización del esmalte en la zona superficial se presenta en las líneas de Retzius. A partir de estas líneas, la desmineralización se extiende a las partes interprismáticas y de éstas a la parte orgánica intercrystalina.⁽³²⁾

Algunos investigadores sugieren que la desmineralización sigue dos caminos: uno interno, siguiendo los prismas (figura 3.1), pero envolviendo la sustancia interprismática primero; y un segundo camino oclusogingival, siguiendo a lo largo de las estrías de Retzius. Por lo que considera estas estructuras como un probable punto de entrada de agentes cariogénicos.^(26, 27)

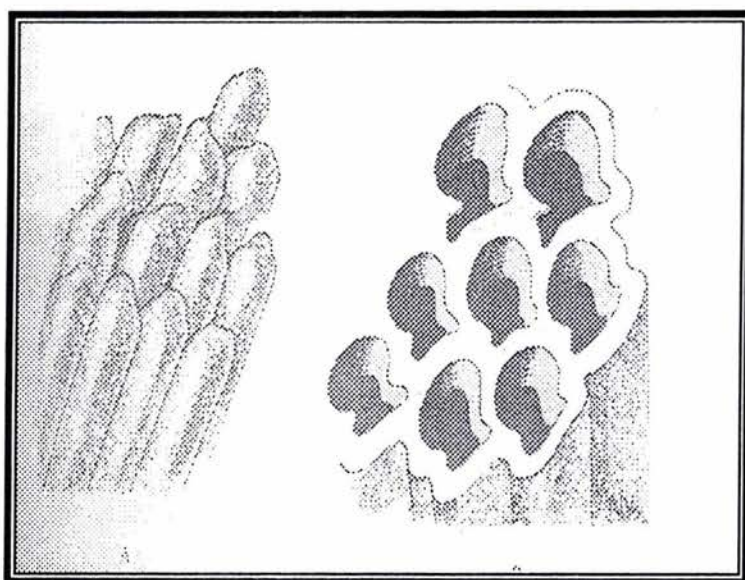


Figura 3.1 Esquema de los prismas del esmalte en el que se muestran los dos patrones en el proceso de disolución.⁽⁹⁾

Moreno y Zahradnik así como Silverstone et al. sugieren que algunos grados de remineralización pueden ocurrir en la superficie del esmalte durante la formación de una lesión cariosa incrementando el contenido mineral de la zona superficial. Sin embargo Gray y Francis, Peace y Bibby, Zahradnik et al. atribuyen la relativa escasez de solubilidad ácida de la superficie del esmalte durante la formación de la caries a ciertas macromoléculas tales como proteínas, que pueden disminuir y hacer más lento el proceso de descalcificación.⁽²⁶⁾ De acuerdo con Takuma, la superficie del esmalte contiene más fluoruro y calcio, los cuales juegan un papel en la producción de la zona superficial. En estudios realizados por Yagi se encontró que la apatita en la superficie del esmalte es más dura que la apatita del esmalte adyacente.⁽²⁸⁾

La remineralización es acelerada en presencia de fluoruros en concentraciones de 1ppm. El fluoruro promueve nucleación de fosfato cálcico y reduce el poder disolvente de la fase líquida. En situaciones normales el proceso de desmineralización remineralización se encuentra en equilibrio. Cuando este se rompe, la desmineralización aumenta con respecto a la remineralización y sobreviene la lesión del esmalte.

La desmineralización dentro del esmalte puede observarse en cortes, con ayuda de microscopio óptico. Encontrando cuatro zonas distinguibles. Iniciando de adentro hacia fuera:

1) *zona traslúcida* representa un cambio temprano del esmalte en el avance de la lesión;⁽²⁵⁾ según algunos autores está más mineralizada y puede ser especie de barrera defensiva.⁽³¹⁾

2) *la zona oscura*. corresponde a la zona de desmineralización y parece ser el frente de avance de la lesión.⁽³³⁾

3) *cuerpo de la lesión*, es la zona de mayor desmineralización, las estrías de Retzius están muy marcadas así como la estructura de los prismas, mostrando un patrón de estriaciones. Análisis microquímicos indican una reducción de 24% en

mineral por unidad de volumen comparado con esmalte sano. Hay un aumento en el contenido de agua y material orgánico debido al ingreso de bacterias y saliva.⁽²⁴⁾

4) la *capa superficial*, pueden distinguirse pequeños poros entre los periquimates. Esta zona se considera de mayor resistencia por estar más mineralizada o contener más flúor.⁽³³⁾ Sin embargo en estudios de microscopia electrónica de barrido se han observado cavidades en forma de embudo en algunos sitios de la capa superficial.⁽²⁴⁾

Utilizando la microscopía electrónica de alta resolución claramente se muestra que la disolución por caries inicia en el centro de uno de los extremos del cristal y evoluciona anisotrópicamente a lo largo del eje (figura 3.2). La disolución central es paralela a la superficie lateral externa del cristal, resultando una cavidad en forma hexagonal o rectangular. Después de la formación de la cavidad central, la disolución se extiende lateralmente hacia la superficie externa.

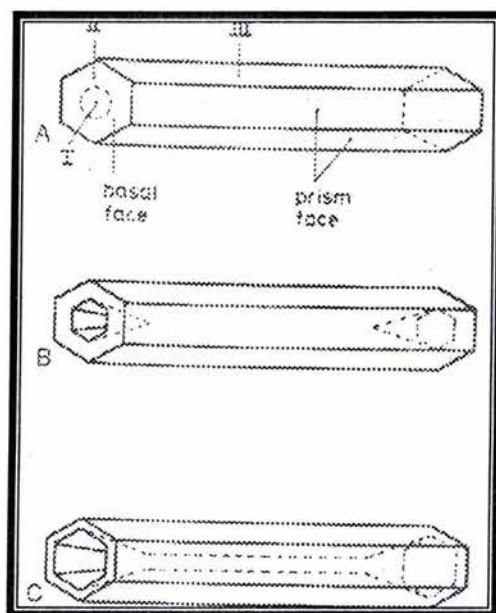


Figura 3.2 Esquema que representación de los sitios de inicio de la disolución de los cristales de hidroxiapatita causado por ácidos.⁽⁹⁾

3.4 Caries de dentina

La dentina afectada presenta diferentes grados de decoloración desde marrón a marrón oscuro, casi negro. El frente de invasión bacteriana está precedido de una zona de desmineralización, como consecuencia de diversos productos microbianos tales como enzimas o ácidos orgánicos. Estas sustancias son producidas por las bacterias presentes en la dentina con caries.⁽²³⁾ La lesión se extiende a lo largo de la unión amelodentinaria, resultando una lesión en forma de cono, en la cuál el vértice está hacia la pulpa y la base hacia la unión amelodentinaria.⁽²⁴⁾

Los cambios de la caries se dividen en 5 zonas, las cuales son más notorias cuando es de avance lento.

- 1) zona de dentina descompuesta
- 2) zona de invasión bacterial
- 3) zona de desmineralización
- 4) zona de dentina esclerótica
- 5) zona de degeneración

Cuando las bacterias invaden los túbulos dentinarios, el pH es menor debido a una mayor concentración de ácidos favoreciendo el desarrollo de bacterias anaerobias, y la mayor cantidad de material orgánico en la dentina hace que favorezca el crecimiento de bacterias proteolíticas. En las muestra de dentina cariada obtenidas, los bacilos gram + son los que predominan en el frente de avance de la lesión, especialmente *Lactobacillus sp.*⁽²³⁾

3.5 Saliva

La saliva juega un papel importante en la interacción entre superficie dental y bacteria. Las interacción de los microorganismos bucales con las proteínas salivales tales como la Ig A -secretora, lisozima, lactoferrin, peroxidasa salival

aglutinina se piensa que son benéficas para el huésped. Esto se atribuye a su acción bacteriostática y bactericida.

La saliva producto de las glándulas submandibular y sublingual contiene diversas proteínas promotoras de adhesión (APPs) que facilitan específicamente la adhesión del *S. mutans* JBP serotipo-c a la hidroxiapatita "in vitro"; estas proteínas fueron identificadas por cromatografía. En ensayos realizados de adhesión, mostraron dos regiones que promueven la adhesión del *S. mutans* a la hidroxiapatita.⁽⁴¹⁾

En base a estudios de saliva y sus componentes tienen cuatro importantes funciones: (1) habilidad amortiguadora, (2) efecto de limpieza, (3) acción antibacterial y (4) mantener una supersaturación de fosfato cálcico.⁽⁴⁵⁾

El fosfato y el calcio se encuentran entre los más significativos componentes inorgánicos de la saliva. Aproximadamente un 80 % del fosfato salival se encuentra ionizado y sus variaciones iónicas dependen del pH. Para un pH normal de 6 o superior, la saliva se supersatura con respecto al hidroxiapatita que forma el esmalte dentario. El apatita empieza a disolverse por debajo de un pH crítico de 5, cuando un número suficiente de iones de PO_4^{3-} de la saliva se convierte en HPO_4^{2-} y el fosfato abandona la superficie del esmalte para mantener el equilibrio químico.⁽⁹⁾

De un 30 a 50% del calcio presente en la saliva está enlazado a proteínas, y se libera cuando disminuye el pH. En teoría se alcanza el pH crítico cuando la saliva cesa de estar supersaturada, y el apatita se disuelve subsecuentemente en ella. Sin embargo, los iones de bicarbonato en la saliva aumentan en relación directa con la tasa de flujo, y generalmente actúan contra una caída crítica del pH.

Algunas macromoléculas recientemente aisladas de la saliva inhiben de modo específico la precipitación de las sales de fosfato de calcio. El inhibidor más activo es un fosfato péptido llamado estaterina o estabilizador, debido a su función principal de mantener la saliva en un estado de supersaturación estable e impedir la disolución de la apatita.⁽⁴⁵⁾ También las proteínas acidicas ricas en prolina, son de las más potentes inhibidoras. Las mucinas, histatinas y cistatinas tienen poca participación. La compleja interacción entre proteínas es otro factor importante dentro de las funciones de la saliva.

La unión de la mucina unida a otras proteínas de la saliva, incluidas proteínas ricas en prolina, histatinas, cistatinas y estaterinas está bien documentado. Este complejo al ser adsorbido en la superficie del diente, tiene grandes implicaciones en la agregación selectiva bacteriana sobre la superficie del diente y el control de la desmineralización mineralización.⁽⁴⁵⁾ Algunas proteínas de la saliva que se les ha encontrado que participan en la interacción entre bacteria y superficie dental como mecanismo de defensa se encuentran: la Ig-A secretora, lisosima, lactoferrina, peroxidasa salivaria y aglutinina atribuyéndoles acciones bacteriostáticas y bactericidas contra microorganismos del medio oral.⁽⁴⁷⁾

3.6 Bacterias

Muchos microorganismos parecen estar involucrados en el proceso de caries, siendo algunas bacterias mucho más activas que otras.⁽³⁵⁾ Hasta ahora el grupo de especies bucales *mitis* son los colonizadores predominantes de las superficies dentales; también están implicados en la endocarditis y meningitis, además de su papel en la caries. De esta manera la acertada identificación de las especies y cadenas del grupo bucal *mitis* podría ser valioso para estudios de la ecología de la placa y la caries dental así como para el diagnóstico en pacientes con sepsis o endocarditis.⁽³⁶⁾

La inducción química de la caries dental por ácidos orgánicos es uno de las principales aportaciones para entender el mecanismo que involucra la desmineralización y remineralización del esmalte y dentina.⁽³⁷⁾ Las biopelículas que colonizan los tejidos de la boca son constantemente sujetas a cambios por las condiciones del medio ambiente, el pH, así como la presencia y disponibilidad de nutriente, se ha mostrado que tienen una mayor influencia en la composición y actividades bioquímicas de las biopelículas bucales. Estos factores son críticos en el desarrollo de la caries dental.⁽³⁸⁾

Probablemente sean los mismos microorganismos los que causen un proceso de caries tanto en esmalte como en dentina. Bacterias altamente acidogénicas y acidouricas tales como el *Streptococcus mutans* y *Lactobacilli* son los principales patógenos involucrados en la iniciación y progreso de la caries. La participación que tiene en este proceso el *Actinomyces sp.* o el *Streptococcus mitis* no es muy clara. Algunas cadenas de *Streptococcus mutans* han sido implicadas en la formación de placa dental y del proceso de caries.⁽³⁷⁾

El *Enterococcus faecalis* es otro coco gram positivo, anaerobio facultativo, habitante normal del tracto intestinal humano. Recientemente el *E. faecalis* tiene la atención de investigadores ya que se le a relacionado con infecciones dentales, involucrándose su presencia en el desarrollo de la caries dental (figura 3.3). Esta bacteria tiene la característica de poder sobrevivir en un medio ambiente que para otros microorganismos podría ser tóxico; temperaturas extremas de 15 a 60°C, sobrevive en medio ambiente alcalino de $\text{Ca}(\text{OH})_2$.⁽⁵⁸⁾

Los *Lactobacillus* son bacterias gram positivas, altamente acidogénicos, relacionados en la caries temprana. No obstante en investigaciones recientes se ha encontrado asociación mayor de estos microorganismos en caries dentina avanzada, que en etapas iniciales de la lesión.⁽³⁸⁾ Las especies más comunes de acuerdo con Marsh y Martín (Oral Microbiology, Chapman & Hall 1996) son *L. casei*, *L. fermentum*, *L. acidophilus*, *L. salivarius*, *L. plantarum* y *L. brevis*. Se

considera en particular que los lactobacilos juegan un papel muy importante en el desarrollo de la caries dental, pero no son menos importante en la iniciación de la caries. Un alto contenido de lactobacilos frecuentemente indicaría un consumo de azúcar y, por lo tanto, un alto índice de incremento en el riesgo de presentar caries.⁽³⁹⁾

El *Streptococcus mutans* es el microorganismo bucal que más frecuentemente ha sido relacionado en el desarrollo de caries. Evidencia clínica junto con estudios en animales y humanos ha sido encontrada una relación positiva entre *Streptococcus mutans* en la placa y el desarrollo de caries. Se ha encontrado una asociación en particular entre el *Streptococcus mutans* y la presencia de una desmineralización temprana en la cual el lactobacilo está más implicado con el progreso de la lesión y en la excavación.⁽⁴⁰⁾

Para Tanzer, el *Streptococcus mutans* es el principal organismo participante en las lesiones cariosas primarias (figura 3.4), así mismo está asociado con las lesiones cariosas secundarias.⁽⁴⁰⁾ Algunas cadenas de *Streptococcus mutans* has sido implicadas en la formación de placa dental y del proceso carioso, mucha información se ha ido obteniendo sobre el metabolismo de esta bacteria así como de agentes antibacteriales, especialmente el fluoruro, como inhibidores de su metabolismo. Productos naturales a base de plantas se ha mostrado que actúan contra el *S. mutans*.⁽⁴²⁾

3.6.1 Mecanismo de adhesión de las bacterias

Las bacterias pueden fijarse tenazmente, y a menudo con exquisita especificidad, a distintas superficies. Esta adherencia se consigue mediante una masa de fibras enmarañadas constituidas por polisacáridos de molécula ramificada que se extiende desde la superficie bacteriana y forman un compacto glicocalix. El glicocalix, es un determinante específico para la iniciación y progresión de varias enfermedades producidas por las bacterias, como la caries dental.

La bacteria se adhiere a otra célula o bacteria, por yuxtaposición de su propio glicocalix. El nexo de unión es suministrado únicamente por unas proteínas denominadas lectinas, que se unen específicamente a polisacáridos de una

estructura. Los primeros estudios sobre la formación de glicocalix, fue en *Streptococcus mutans*. Tres enzimas localizadas en la superficie de la bacteria interactuaban muy particularmente con el azúcar común: la sacarosa compuesta por una molécula de glucosa y otra de fructosa.

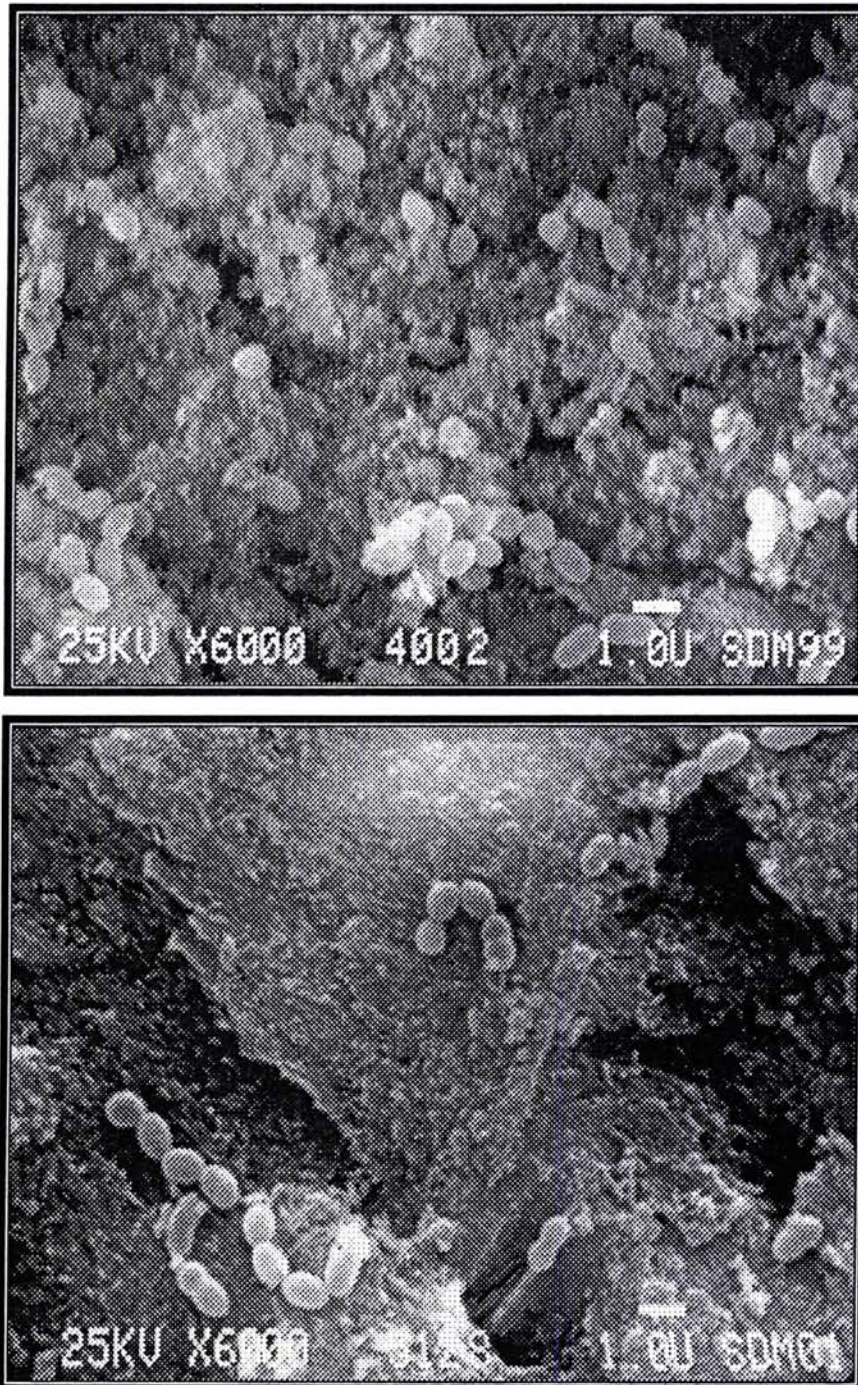


Figura 3. 3 Imágenes de MEB de *Enterococcus faecalis*, sobre tejido dentinario⁽⁶¹⁾

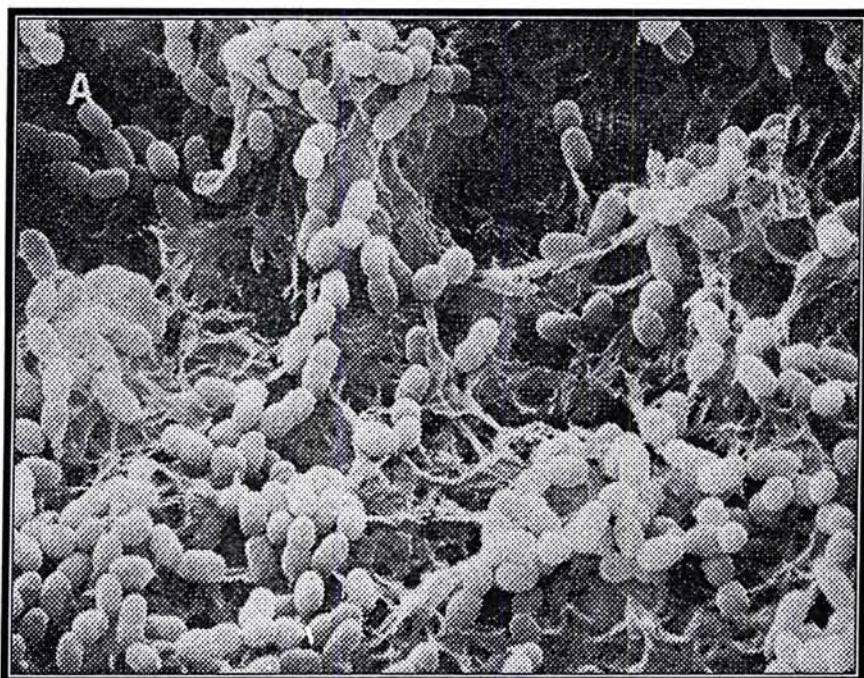


Figura 3.4 Imágenes de MEB de *Streptococcus mutans*, notándose los surcos de división en las bacterias .⁽⁶⁵⁾

El glucano puede adherirse a la superficie del esmalte dental fijando así la célula bacteriana en la pieza dental (figura 3.5). El glucocalix aumenta de grosor englobando células bacterianas de la misma o de distinta especie, originando la película amarillenta conocida como sarro dental. Las fibras del glicocalix no solo fijan a las bacterias, también concentran las enzimas líticas excretadas por las mismas, de este modo ejercen una acción más directa contra la célula huésped. Un glicocalix puede funcionar también como un reservorio de alimentos para las bacterias, las fibras de polisacárido están cargadas negativamente, y pueden fijar iones y moléculas de importancia metabólica que circulen en su entorno o que sean producidas por las enzimas líticas bacterianas, haciéndolos así más accesibles para las células. Sin embargo la adhesión bacteriana específica a superficies bucales no es por si misma causa de enfermedades. El *S. mutans* lleva a cabo la glicólisis con valores de pH por debajo de los 4.^(37, 40)

Debido a los resultados obtenidos de estudios realizados *in vitro* en los que se observa que la interacción de APP con *S. mutans* es altamente específica, es que el *S. mutans* es considerado el principal agente en la etiología de la caries dental.

En lo que corresponde a estudios sobre la composición química de microorganismos bucales, los cuales constituyen cerca del 70% de los organismos contenidos en la placa dental bacteriana, está un estudio realizado por Sharma y Newbrun, en el cual determinaron la composición química de la pared celular del *Streptococcus mutans* (B-14) y *sanguis* (804), encontrando un alto contenido de calcio (Ca), magnesio (Mg) y sílice (Si), así como un bajo contenido en sodio (Na).⁽⁴⁴⁾

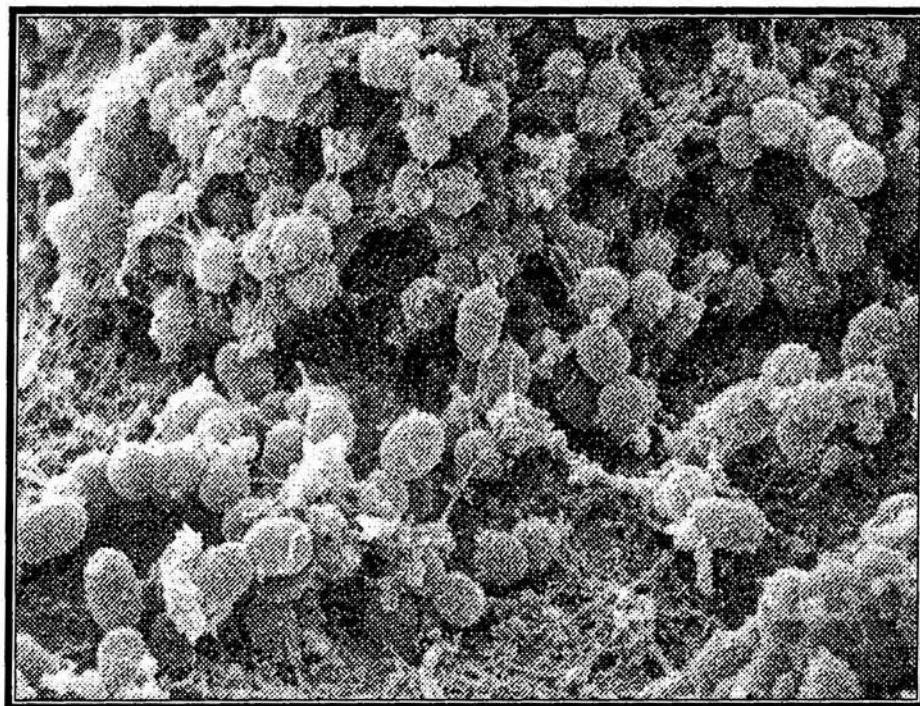


Figura 3.5 Adherencia de *Streptococcus mutans* al esmalte dental.⁽⁶⁶⁾

3.7 Aspectos preventivos de la caries

Al ser una enfermedad multifactorial, la prevención de la caries está basada en diferentes aspectos, que van desde el aumento en la resistencia de el huésped, a

base de administración de flúor, selladores de fosetas y fisuras, control de la placa bacteriana, y limitación en el consumo de substratos fermentables.

Hay numerosas investigaciones en base al efecto del flúor contra la caries. El flúor es un miembro de la familia de los halógenos, es el más electronegativo de los elementos, haciéndolo esto muy reactivo. Se combina con la mayoría de los elementos, reacciona con radicales orgánicos, y es muy raro encontrarlo en forma libre en la naturaleza. En los tejidos mineralizados como hueso y diente, se encuentra como una mezcla de sal de apatita, no como fluorapatita pura $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$ sino como hidroxiapatita fluoratada $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2\text{F}$. Solo algunos de los hidroxilos de la red de la apatita son sustituidos por iones de flúor. ⁽⁹⁾

Se ha reportado que los iones de cobre (Cu^{2+}) actúan como agente cariostático en ratas, los iones reducen la formación de placa en humanos e inhibe su capacidad de generar ácidos. Afseth et al. reportan que 5.0 mmol/l Cu^{2+} aplicado tópicamente, o 1.0 mmol/l Cu^{2+} en agua de beber, inhibe significativamente la formación de caries en ratas inoculadas con *S. mutans*. ⁽³⁴⁾

Afseth también reporta que Cu^{2+} es retenido en la placa y sugiere que los cationes metálicos están unidos electrostáticamente a varios grupos acídicos en la placa. A pesar de que se ha visto que el Cu^{2+} tiene efecto directo disminuyendo la disolución del esmalte por ácidos, no es del todo claro el mecanismo de protección del Cu^{2+} . ⁽³⁴⁾

Se ha señalado al *Streptococcus mutans* como el microorganismo cariogénico más importante y se ha demostrado que la inmunización de éste, en monos y ratas, puede prevenir la caries. Este germen actúa en gran parte por las enzimas que elabora, siendo glucosiltransferasas las más importantes y con las cuales pueden sintetizar gran cantidad de polisacáridos extracelulares a partir de la sacarosa. ⁽³³⁾

Las posibles vías de inmunización serían :

- Subcutánea o submucosa, con buenos resultados en monos. El grado de protección consiste en aumentar la IgG sérica, específica contra *S. mutans*.
- Mucosa Oral, aplicación tópica de gérmenes en la superficie de la mucosa, para estimular la producción de IgA específica. Ha dado buenos resultados en ratas pero no así en monos.
- Glándula Salival. La inyección a las glándulas salivales mayores ha dado también buenos resultados en ratas pero no en monos.
- Tracto Gastrointestinal. Mediante cápsulas digeridas de *S. mutans* se logró aumentar la IgA secretoria. ⁽⁴⁸⁾

Varios antígenos de superficie celular de *S. mutans* y sus fragmentos recombinantes han sido estudiados como posibles candidatos para vacunas contra la caries dental. ⁽⁴⁸⁾

La inmunización pasiva usando anticuerpos monoclonales de ratón, anticuerpos de plantas transgénicas, anticuerpos de yema de huevo o anticuerpos de leche bovina como antígenos de *S. mutans* han sido recientemente desarrollados como posibles vacunas. ⁽³⁹⁾

Muchas son las investigaciones cuyo objetivo es encontrar elementos que ayuden en el control del proceso de caries. Ooshima, Osaka, Sasaki junto con otros investigadores, estudian la actividad cariostática del extracto de cacao, principal componente del chocolate. Esto fue en un estudio "*in vitro*" y en animales, encontrando que el extracto de cacao inhibió la síntesis de glucano por la glucosiltransferasa del *S. mutans* (MT8148R) y *S. sobrinus* (6715) fue inhibida, aunque no de manera muy significativa. ⁽⁵⁰⁾

4. TÉCNICAS DE ANÁLISIS

Las técnicas de análisis usadas en este trabajo de tesis fueron la microscopía de luz o microscopía óptica, y la microscopía electrónica de barrido. Por tal, vamos a describirlas en forma breve.

4.1 Microscopía de Luz (ML)

El Microscopio de Luz es una herramienta en el área de la investigación que permite ver objetos con una distancia de separación entre si menor de 0.1 mm (resolución del ojo humano). Se basa en un sistema de lentes que está cerca del objeto (objetivo) y otro que se coloca cerca del ojo del observador (ocular) (figura 4.1). El objetivo forma una imagen real, invertida y aumentada del objeto, la cual reside en el espacio sobre el plano focal de la lente ocular. El ocular aumenta la imagen intermedia aún más, esta imagen es captada por el ojo, el cristalino actúa como una lente convergente para formar la imagen en la retina.

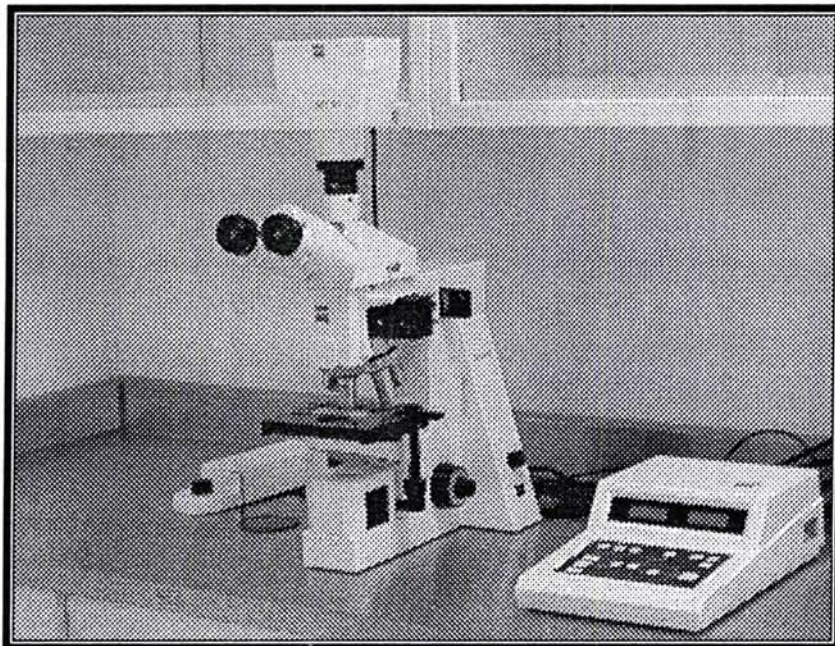


Figura 4. 1 Microscopio de Luz Zeiss campo claro, campo oscuro y luz polarizada.

4.2 Microscopio Electrónico de Barrido (MEB)

Una vez inventado el microscopio electrónico se vio la similitud que había con el microscopio óptico en cuanto a la formación de la imagen. Con este microscopio se pueden formar la imagen de la superficie de la muestra, gracias a su profundidad de foco, dando una imagen con aspecto tridimensional.

El MEB utiliza diferentes señales que provienen de la interacción de los electrones con los sólidos y que nos permiten obtener información sobre la composición química, estructura magnética, orientación cristalina o el potencial eléctrico del material en observación. Su mecanismo se basa en "barrer" la muestra con un haz electrónico de sección transversal pequeña y de alta energía, generando una imagen punto a punto de ella (figura 4. 2).^(50, 52)

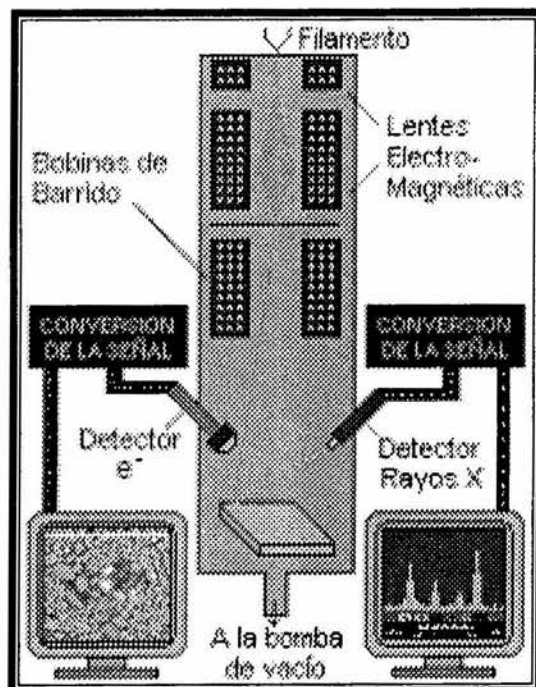


Figura 4.2 Esquema del interior de un microscopio electrónico de barrido indicando el análisis químico al que se somete la muestra.

4.2.1 Interacción haz electrónico - muestra

El haz electrónico experimenta varias colisiones dentro del material, antes de perder completamente su energía. Algunas de estas señales son los electrones retrodispersados, los cuales provienen de una región que se encuentra a 0.5 μm por debajo de la superficie; los electrones secundarios sólo logran penetrar de 5 a 10 nm por debajo de la superficie de la muestra. Si lo que se desea estudiar es la superficie de la muestra, estos son los electrones que se utilizan para generar la imagen.

Una interacción inelástica de mayor importancia en el MEB es la producción de electrones retrodispersados, estos electrones tienen una energía alta. Los electrones retrodispersados no son fuertemente absorbidos por la muestra debido a su alta energía, y un alto porcentaje de electrones escapa de la muestra, debido a esto la resolución de una imagen con electrones retrodispersados es menor (15 nm) a la obtenida por electrones secundario (4 nm), esto produce una menor sensibilidad a las diferencias en la topografía de la superficie (figura 4.3). Una imagen con electrones retrodispersados es una imagen composicional, y una imagen de electrones secundarios es una imagen de la superficie. ⁽⁵³⁾

La obtención de un análisis químico es a partir de la emisión de rayos X que se genera de una muestra que es bombardeada con electrones. La colisión puede resultar en algunos casos en la emisión de un electrón de los átomos de la muestra. Cuando un electrón de una capa interna del átomo es sacado por un electrón de alta energía del haz, el átomo puede regresar a su estado base, a algún otro estado de baja energía, por dos caminos distintos: un electrón de las capas superiores puede ocupar el hueco en la capa interna emitiendo un fotón, o emitiendo otro electrón de la capa superior.

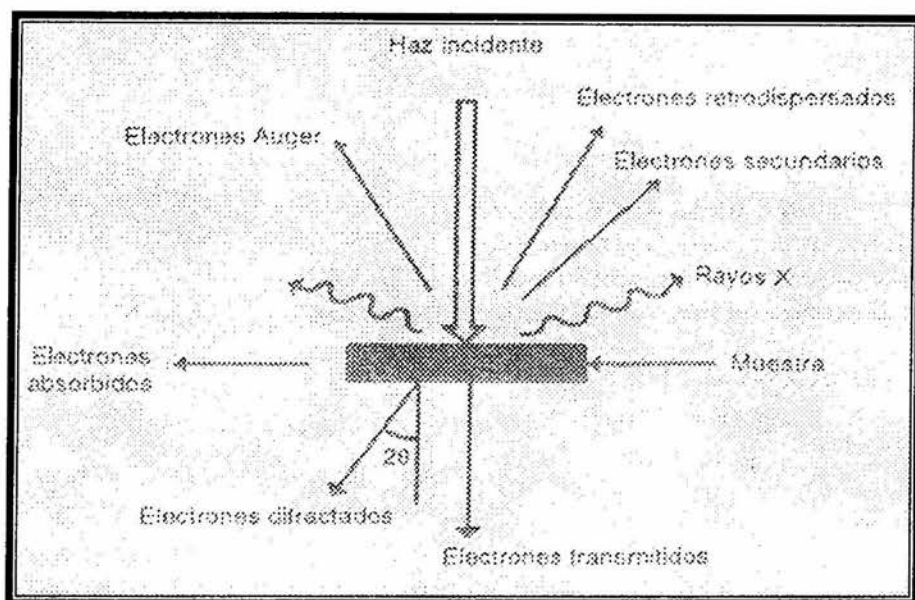


Figura 4.3 Tipos de señales que se producen durante la interacción del haz electrónico con la muestra.

La emisión de fotones produce un espectro característico de rayos X, mientras que los electrones emitidos son conocidos como electrones Auger. Ambos son importantes en el análisis microestructural, ya que sus energías son características de los elementos que emitieron. Por lo tanto, la medida de estas energías permiten el análisis químico de la muestra, y la medida de la intensidad de la emisión nos da un análisis químico cuantitativo. ⁽⁵⁰⁾

4.3 Rayos X característicos

Los rayos X son un tipo de radiación electromagnética, cuya región en el espectro electromagnético está entre 0.05 y 125 KeV produciéndose por la interacción de los electrones con la muestra.

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 inferiores o sacados del átomo, dejando un hueco en un nivel inferior, se dice que el átomo está "excitado". Para lograr esto es necesario tener una energía más alta que la

energía crítica (nivel de absorción) para sacar un electrón de un nivel. Si el haz electrónico tiene la energía suficiente para excitar los electrones k de un átomo es también capaz de excitar los electrones L y M, clasificando de esta manera las energías de los rayos X característicos de acuerdo con el tipo de transición que las provoca. Los rayos X "K" resultan de una transición de un electrón de otro nivel hacia el nivel K, y así sucesivamente.

Existen subniveles de energía dentro de los niveles K, L, M, etc. Por éste motivo, los rayos X relacionados con electrones de estos subniveles varían ligeramente la energía y se subclasifican en $K\alpha$, $K\beta$, $K\gamma$; los rayos X "L" se dividen en $L\alpha$, $L\beta$, $L\gamma$, $L\delta$ sucesivamente.

4.4 Técnica de microanálisis

La microsonda electrónica es una de las diferentes técnicas para realizar análisis químico en el rango de micras (microanálisis) midiendo la intensidad y la longitud de onda de la radiación característica de un elemento al ser producido por un haz de electrones.

La microsonda electrónica se usa dos tipos de espectrómetros: el espectrómetro de dispersión de energía (EDS) y el espectrómetro de dispersión de longitud de onda (WDS). En el presente trabajo se utilizó el EDS, el cual está instalado en el microscopio electrónico de barrido 5600 Jeol de alto y bajo vacío, (figura 4.4) permitiéndonos detectar cualquier elemento presente en la muestra y su localización a partir del Na ($Z= 11$).

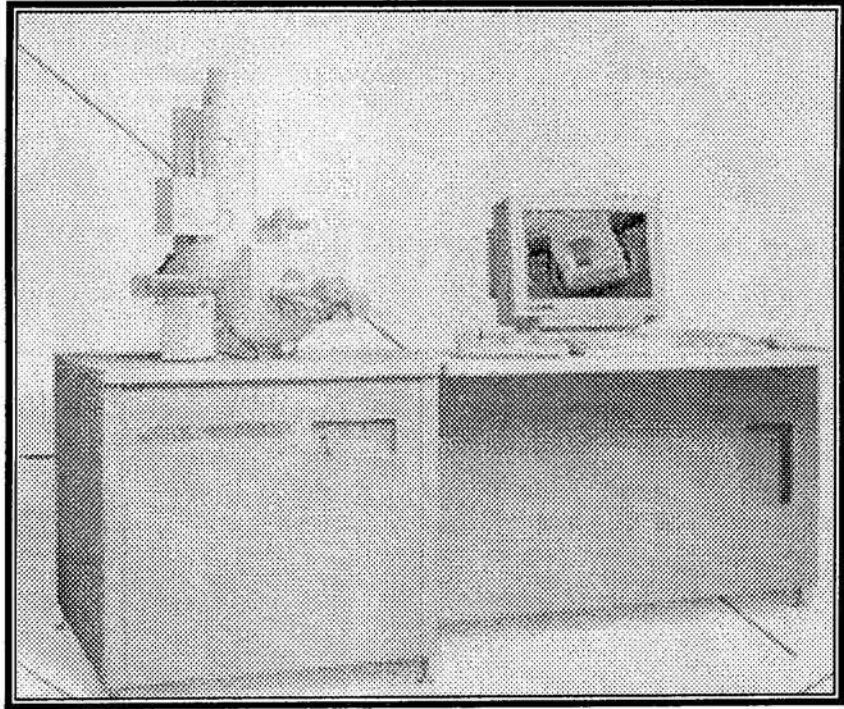


Figura 4.4 Microscopio Electrónico de Barrido JEOL 5600 de alto y bajo vacío.

5. METODOLOGÍA

METODO

Para este trabajo se utilizaron 8 órganos dentales con diferentes grados de destrucción de tejido causado por un proceso carioso, extraídos por motivos de rehabilitación dental. Las muestras se obtuvieron de la clínica de especialidad de Cirugía Bucal de la Facultad de Odontología (UNAM) y de un consultorio particular. El rango de edad de los pacientes fue de 6 años, de 27 a 33 años.

5.1 Preparación de muestras para MEB

Posterior a la extracción los dientes todos los dientes se colocaron una solución fijadora a base de glutaraldehído al 5% durante 2 días evitando así que las estructuras de los tejidos no se alteraran. Pasado este tiempo se retiraban de la solución se dejaban secar y posteriormente fueron embebidos en resina acrílica de uso odontológico, para poder montarlo en la cortadora. Para todos los cortes se utilizó una cortadora de la marca Jean Wirtz, la cual requiere un disco de diamante (figura .1), el corte es de tipo abrasivo, debido a las características del tejido dental la cortadora se programó para que el corte se hiciera a una velocidad entre 1000 y 1100 rpm, utilizando como sistema de enfriamiento agua recirculada.



Figura 5.1 Muestra montada en la cortadora para hacer el corte en sentido longitudinal, con un disco abrasivo de diamante

Los cortes se realizaron en sentido transversal y sentido longitudinal, con el fin de separar la corona anatómica de la raíz hasta obtener los bloques de la zona deseada. Posteriormente el bloque se montó en un porta muestras de aluminio utilizando una resina termoplástica, iniciándose el proceso de pulido a espejo utilizado es un pulidor orbital "Buehler", modelo Minimer, para esto se utilizaron dos lijas con diferente grosor de grano (figura 5. 2). Primero se utilizó una lija de 1200, para dar una superficie pareja, después se utilizó una lija 4000 la cual es de grano más fino, por lo que elimina las rayas y por último se utilizó un paño más alúmina para un pulido a espejo.

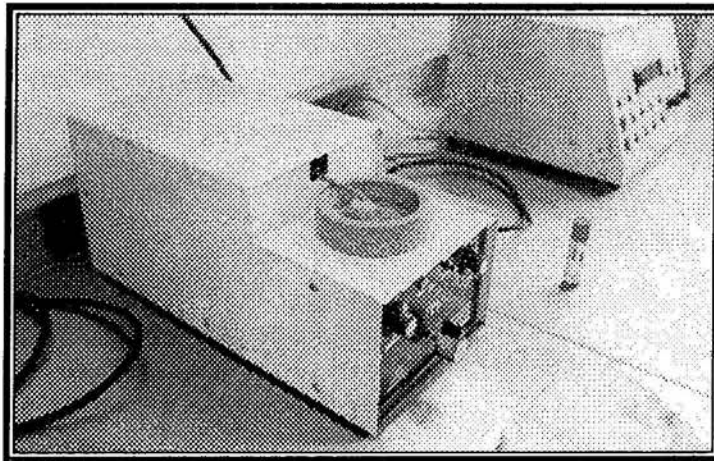


Figura 5.2 Pulido de la muestra, usando una lija de 1200.

De las ocho muestras solo dos de ellas se sometieron al procedimiento de pulido a espejo (figura 5.3), el resto de las muestras no se pulieron para evitar alterar la estructura del tejido cariado.

Por último las muestras se colocaron dentro de una evaporadora para ser cubiertas con una película de material conductor, este proceso es necesario en muestras que no son conductoras y que van a ser analizadas con un microscopio electrónico de barrido de alto vacío, de esta manera hay una buena interacción entre el haz de electrones y la muestra.

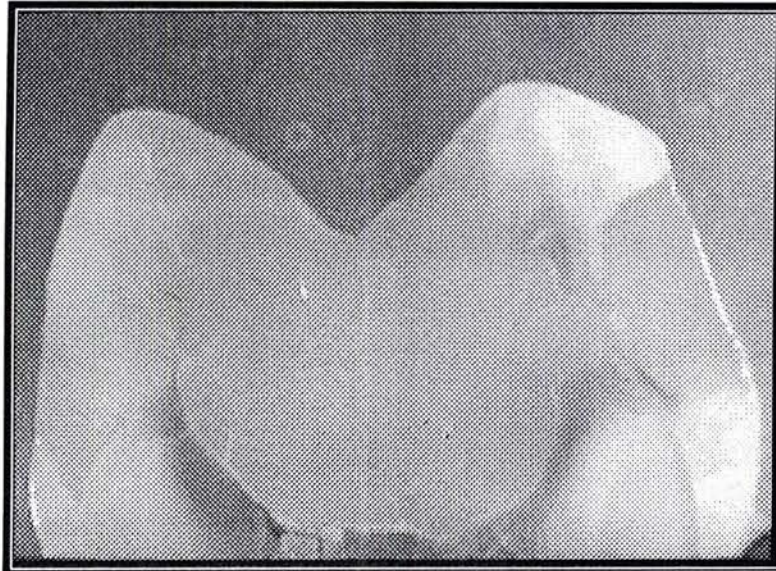


Figura 5. 3 Imagen de microscopio óptico en la cual se muestra una muestra pulida a espejo.

Los materiales que se utilizan en el proceso de evaporación principalmente son el oro, carbón, aluminio (figura 5.4). En este trabajo se utilizaron el carbón y el oro para las muestras que se sometieron a este proceso.

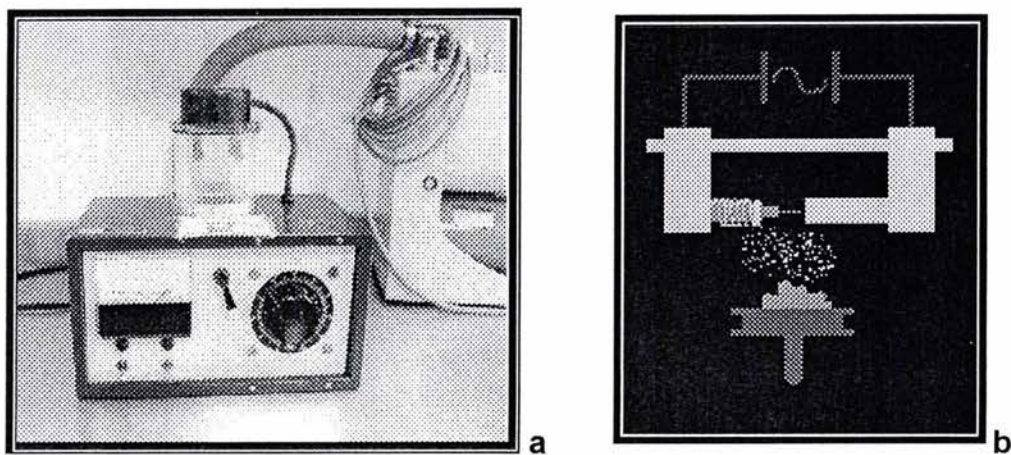


Figura 5.4 Proceso de recubrir la muestra con carbón. a) evaporadora de carbón. b) esquema que muestra la manera en que es calentado el filamento de carbón.

5.2 Preparación de muestras para cortes con microtomo y tinciones

El corte realizado en estas muestras fue en sentido longitudinal, con el cual se obtuvieron dos secciones del diente, mismas que fueron colocadas de nuevo en solución fijadora por otras 24 horas. Pasado este tiempo las muestras se lavaron con agua corriente. Una sección se preparó en el laboratorio de histopatología para hacer cortes y tinciones de los mismos. La otra sección se preparó para ser analizada por medio de técnicas de Microscopía.

La sección del diente que fue para tinciones requirió un tratamiento especial. Durante 3 horas se mantuvo en agua con el objeto de eliminar la solución fijadora así como de hidratar el diente. Una vez hidratada la muestra se colocó en ácido nítrico al 5% durante un promedio de 60-62 horas con el objeto de desmineralizar el diente (figura 5.5), de manera que se conservara el tejido orgánico. Para eliminar el ácido se sometió la muestra a otro lavado de 3 horas.

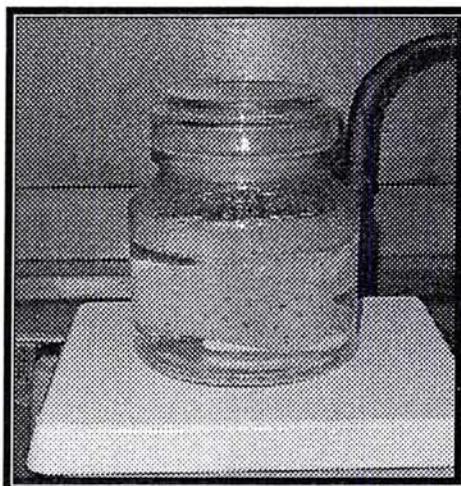


Figura 5. 5 Muestra en proceso de desmineralización, por medio de una solución de ácido nítrico al 5%.

Ya desmineralizado el diente se colocan en el Histokinet (Jung Histokinette 2000) para la deshidratación y posterior infiltración de la parafina en la muestra; éste aparato tiene 12 depósitos de los cuales 7 contienen alcohol en diferentes concentraciones, un depósito contiene alcohol y glycol en un 50% cada uno, dos contienen glycol y dos más parafina (figura 5.6).

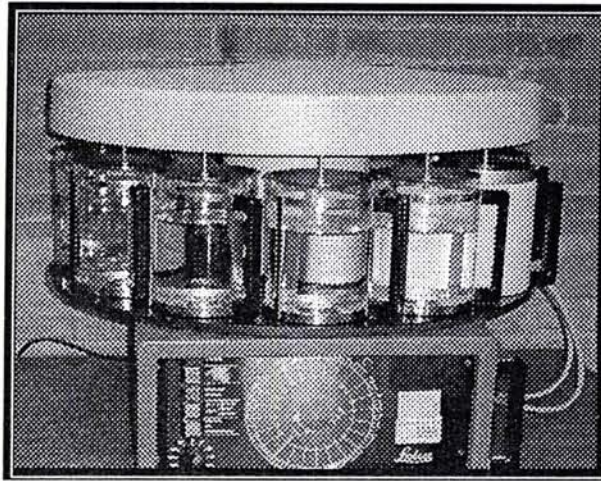


Figura 5.6 Histokinette, en el cual se coloca la muestra para deshidratar e impregnar de parafina.

Se inició colocando la muestra en el depósito que contiene alcohol de 60° dejando la muestra durante una hora con quince minutos, pasado este tiempo la muestra entra en el deposito con alcohol de 70°, y así sucesivamente en los depósitos con alcohol de 80° , 96° , 96° , 100° , 100° alcohol (esto es para que la muestra pierda agua). Después se introdujo en el deposito con alcohol y glycol en un 50% cada uno aquí la muestra se dejó durante 1 hora 15 minutos. Los dos siguientes depósitos contienen glycol, en los cuales la muestra estuvo por 1 hora 15 minutos respectivamente. La función del glycol es diafanizar la muestra para que penetre la parafina.

Finalmente los dos últimos pasos en el histokinette se realizaron en los depósitos cuyo contenido fue parafina. La muestra se colocó en unos moldes de los cuales se obtuvieron posteriormente los bloques de parafina ya con la muestra incluida (figura 5.7).

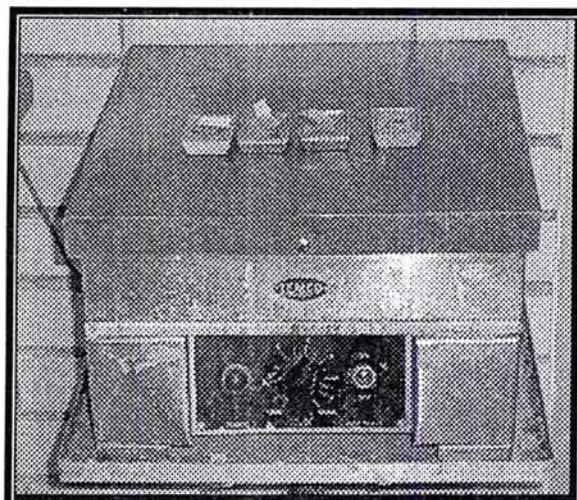
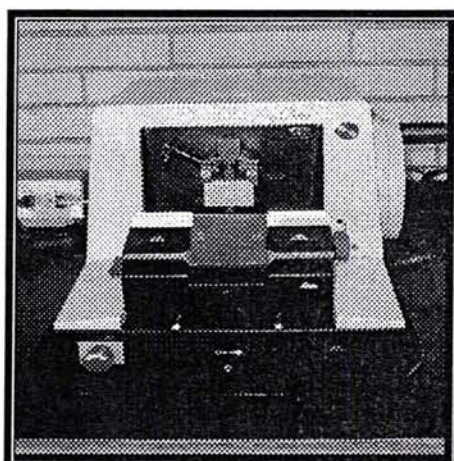
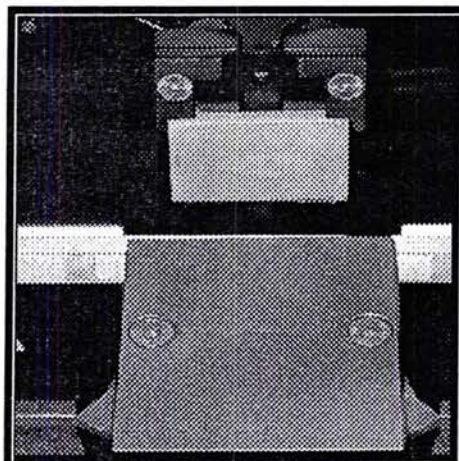


Figura 5.7 Colocación de la muestra en parafina para formar los cubos que se colocan en el microtomo.

El cubo se montó en el microtomo (Microtomo Leica Jung RM 2055) (figura 5.8). Los cortes de la muestra fueron de un espesor de $5\mu\text{m}$.



a



b

Figura 5. 8 Microtomo. a) colocación del bloque de parafina en el microtomo. b) imagen ampliada de la zona de corte.

Obtenidos los cortes se colocaban y extendían en una tina de flotación (Tina de Flotación, Grant Instruments-Cambridge), se introdujo un portaobjetos con cubierta silanizada lo que permitió que al retirar el portaobjetos del agua el corte quedó adherido (figura 5.9). Los portamuestras tienen una superficie silanizada, esto ayuda en la adherencia del corte al portaobjetos.

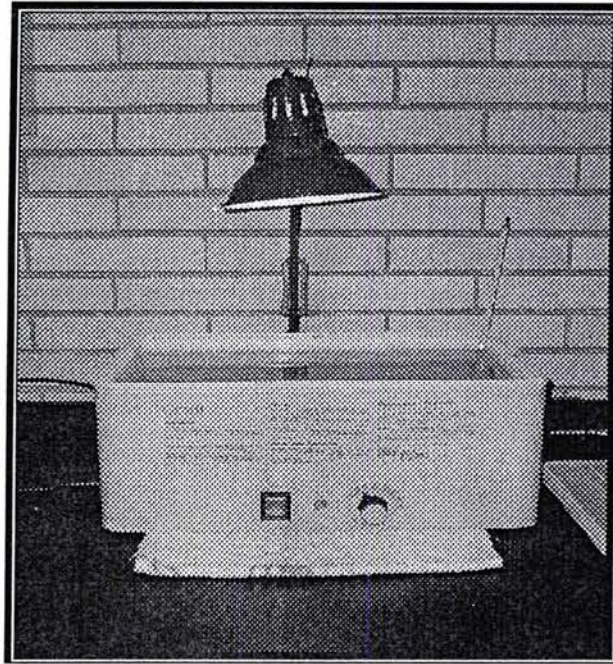


Figura 5.9 Tina de flotación en la cual se extienden los cortes para montarlos en una laminilla.

Fijado el corte, se introdujeron en un depósito con gilol comenzando el proceso de desparafinar y deshidratación. El paso siguiente fue preparar las soluciones para las dos tinciones utilizadas: Hematoxilina y eosina y la técnica de Brown y Brenn

- *Tinción de Hematoxilina y Eosina (procedimiento de Harris')*

Para esta tinción se requirieron las siguientes soluciones: 1% de alcohol ácido, agua de amonia, carbonato de litio saturado, solución de eosina-floxina; para la preparación de hematoxilina de Harris' fueron necesarios 5.0 gm de hematoxilina, 50.0 ml de alcohol etílico al 100%, 1000.0 mg alum de potasio, 1000.0 ml de agua destilada, 2.5 mg de óxido de mercurio.

Procedimiento: Desparafinados los cortes con gilol, colocar la laminilla en un frasco con hematoxilina durante 10 minutos, posteriormente lavar con agua corriente durante 4 minutos, introducir en alcohol ácido al 1% una o dos veces, lavar en agua agitando la laminilla, colocar en agua amonia hasta que se observen

secciones de color azul, lavar en agua corriente durante 10 minutos posteriormente colocar en alcohol etílico al 80% por 1 a 2 minutos.

- *Tinción de Brown y Brenn*

Para esta técnica se requirieron las siguientes soluciones: cristal violeta al 1%, bicarbonato de sodio al 5%, fushina básica al 0.25% 810.0 ml de fushina básica y 90.0 ml de agua destilada, acetona, solución acetona-ácido pícrico (0.1 gm de ácido pícrico y 1000.0 ml de acetona), solución acetona-xileno (50.0 ml de acetona más 50.0 ml de xileno).

Se desparafinan los cortes y se hidratan en agua destilada, se colocan en una solución de cristal violeta y bicarbonato de sodio por un minuto, agitando vigorosamente, pasar por agua, poner en solución de iodine gram's durante un minuto, pasar por agua, decolorar con acetona, lavar con agua, colocar en fushina básica por un minuto, colocar los cortes en un recipiente con agua, introducir en acetona para iniciar la reacción, colocar inmediatamente en solución acetona - ácido pícrico hasta que se torne de un color amarillo y rosa.

Todo este procedimiento se llevó a cabo en la Facultad de Odontología división de Estudios de Posgrado, en el Laboratorio de Histopatología. Todo el equipo y material utilizado en esta fase de la investigación fue otorgado por este Laboratorio así como la asesoría del técnico encargado de la preparación de muestras.

5.3 Cultivos

De cuatro pacientes se tomaron muestras de un órgano dentario afectado con proceso carioso, involucrando tejido dentinario. Las muestras se obtuvieron utilizando puntas de papel estériles introduciéndolas dentro de la cavidad formada por el proceso carioso colocándola inmediatamente tanto en el medio de cultivo de orientación como en el medio específico para estafilococos.

Posteriormente se colocaron los medios de cultivos en una estufa bacteriológica a 37 grados centígrados. A los 3 días existía crecimiento bacteriano. Al cuarto día se decidió hacer la identificación macroscópica de las colonias presentes en los cultivos. Dependiendo de las características morfológicas y color de las colonias se hizo la diferenciación de las mismas como colonias de estreptococos, hongos, pseudomonas y estafilococos (figura 5.10). La característica del medio de cultivo de orientación es que dependiendo del tipo de microorganismo es el color que adquirirá la colonia en el mismo medio.

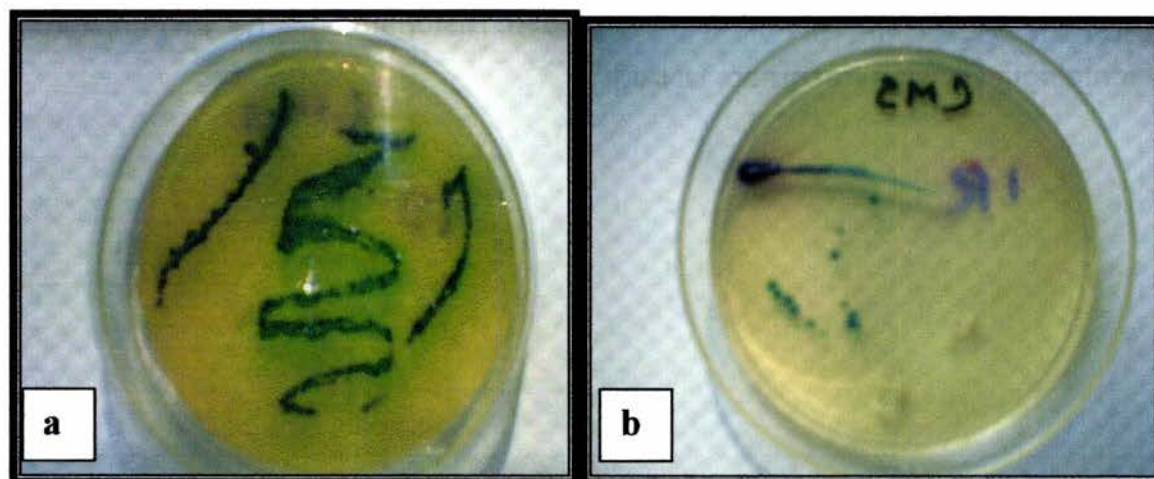


Figura 5.10 Medios de cultivo. a) medios de cultivo de orientación, con crecimiento de colonias de *Streptococcus*. b) medio de cultivo para *Staphylococcus aureus*.

Para tratar de identificar si eran bacterias gram positivas o negativas se realizaron frotis que fueron teñidos con técnica de gram. La tinción de Gram es uno de los métodos de tinción más importantes en el laboratorio bacteriológico, Las bacterias gram-positivas y gram-negativas tiñen de forma distinta debido a las diferencias constitutivas en la estructura de sus paredes celulares. Después de la coloración de contraste las células gram negativas son rojas, mientras que las gram positivas permanecen azules.

Una vez fijado el frotis con calor, se tiñó 1 minuto con cristal violeta, se lavó con agua corriente, se cubrió con solución yodada durante 1 minuto y se lavó de nuevo con agua corriente. Posteriormente se decoloró con mezcla alcohol / acetona. Se eliminó el excedente de agua y se cubrió con safranina (color de contraste) durante 20 segundos, se lavó y secó.

Todo el equipo y material utilizados para esta investigación forman parte y fueron aportados por el Laboratorio de Microscopía Electrónica del Instituto de física de la UNAM. La preparación de los medios de cultivo, frotis y tinción de Gram, se realizaron en el Laboratorio de Patología e Histopatología de la Facultad de Odontología División Posgrado, UNAM.

6. RESULTADOS

En esta sección se presentan los resultados obtenidos con las técnicas de Microscopia de Luz (ML), Microscopia Electrónica de Barrido (MEB), tanto imágenes de electrones secundarios como análisis químicos por dispersión de rayos X característicos EDS, principalmente. Al final se comentará el análisis de cultivos con la finalidad de obtener, y discutir las bacterias que se encuentran dentro de un diente cariado.

6.1 Microscopia de Luz

Se analizó un tercer molar obtenido en un consultorio dental que presenta un proceso de caries el cual llega hasta un cuerno pulpar, como se aprecia en la figura 6. 1. Con el fin de que no se dieran cambios en la estructura dental posterior a la extracción el diente, se colocó éste en una solución de glutaraldehído al 5%.

En la figura 6. 1 A, se ve que el diente fue cortado en sentido sagital, de esta manera se aprecia el grado de extensión del proceso de caries. Seccionada la muestra se colocó una vez más en glutaraldehído para evitar cambios en la estructura durante el tiempo que transcurriese a partir de que se seccionó hasta que fuera llevada al laboratorio de histopatología para hacer los cortes.

Las características anatómicas del diente, la disposición de los prismas del esmalte y los túbulos dentinarios son factores importantes para el desarrollo del proceso de caries. Como se observa en la figura 6.1B, proceso de caries se inició en una fosa de la cara oclusal, extendiéndose a través del esmalte y al hacerlo da un aspecto de forma de pirámide, esto por la disposición de los prismas en esta zona. Al llegar a la unión amelodentinaria, el proceso de caries se extiende a lo largo de ella. Para proseguir a través de la dentina, formando un frente de desmineralización en forma de pirámide o cono, con la base en lo que es la unión amelodentinaria.

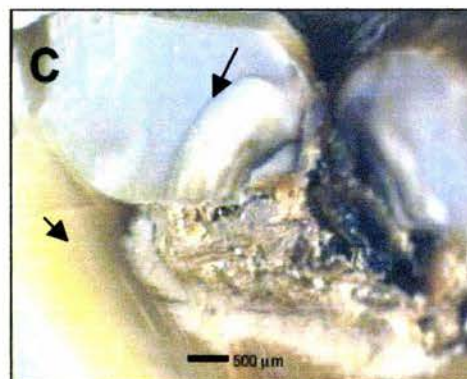
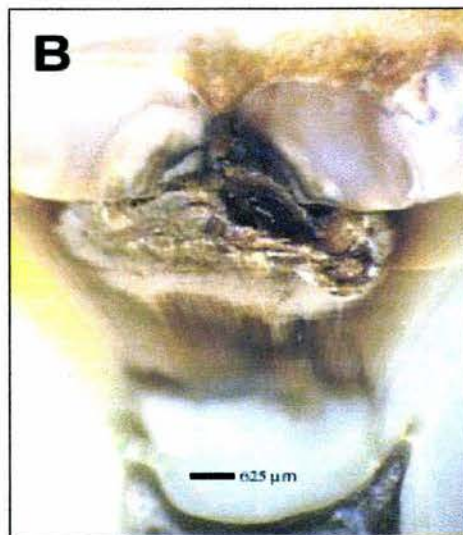
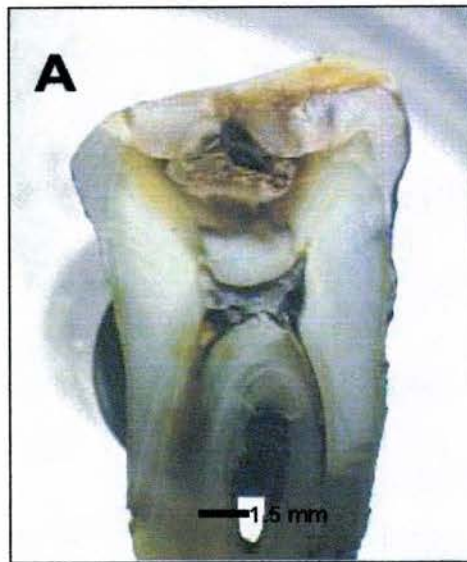


Figura 6.1 Imágenes de ML. A) Efectos del proceso carioso en un molar. B) Nótese la dirección que toma el proceso carioso en esmalte (forma de cono) como en dentina (pirámide con el vértice hacia la pulpa). C) Zona de desmineralización bien delimitada tanto en esmalte como en dentina (indicado con flecha).

En la figura 6.1 C la zona de desmineralización es más evidente así como la pérdida de material inorgánico, degradación y acumulación de restos de material orgánico.

Con la idea de analizar el proceso de caries por ML, se sometió la muestra a un tratamiento de desmineralización e inhibición de la muestra en parafina. Éste procedimiento ya se describió con detalle anteriormente en la sección de preparación de muestras. En la figura 6.2 se observa el proceso que se le dio a la muestra con técnicas de ML de luz transmitida. En este caso se trata de un molar inferior. En este molar se ve con detalle el avance que tuvo el proceso de caries (figura 6.2 A). La muestra tuvo que ser desmineralizada, por lo que el diente se colocó en una solución a base de ácido nítrico al 5% durante 3 días con el fin de deshidratarla y posteriormente embeberla en parafina, tal y como se ve en la figura 6.2 B, obteniendo cortes con un espesor de 5 μm .

Una manera de evidenciar la presencia de bacterias en el tejido cariado es por medio de tinciones con las cuales los componentes de la pared celular de las bacterias son sensibles, la tinción de Brawn y Brenn una alternativa. De esta manera en la figura 6.2 C se nota una dualidad de color en el corte, indicando las zonas teñidas de rosa. Éstas zonas son positivas a la presencia de bacterias. En la figura 6.3 C la tinción de las bacterias es más notoria. Incluso se puede notar la profundidad de implantación de las bacterias dentro de la dentina indicado por las zonas teñidas de rojo. Es conveniente aclarar aquí que con la tinción de Brawn y Brenn se define la presencia de bacterias, más no es posible saber el tipo bacterias presentes.

Además de indicarnos la presencia de bacterias, con la tinción también se puede tener conocimiento del grado de extensión o invasión de los microorganismos dentro de la dentina. En esta muestra la localización de las bacterias se llegó a la zona de la pulpa dental. Otras áreas dentro de este mismo diente se encuentran teñidas de

rosa, pero no son positivas a microorganismos. Esto se debe a defectos en el momento de realizar las tinciones. El reconocimiento de las estructuras de los tejidos dentales se puede lograr con la tinción de H y E, correspondiente a la figura 6.2 D.

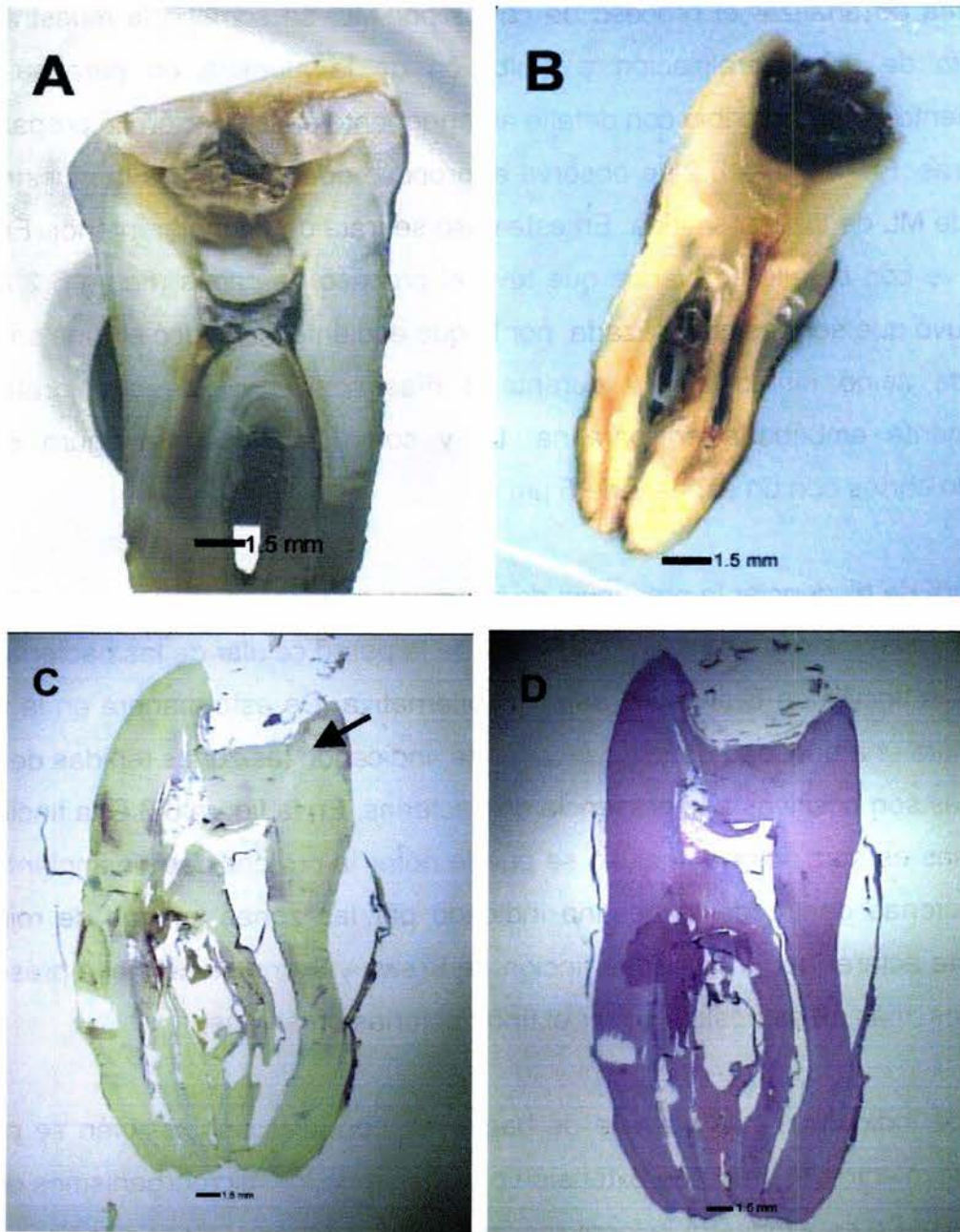


Figura 6.2 Imágenes de ML de algunas etapas en la preparación de muestras para microtomo. A) Diente no desmineralizado. B) Diente desmineralizado e incluido en parafina. C) Observación de tubulos dentinales teñidos en rosa indicando la presencia de bacterias dentro de ellos (señalado con flecha). D) Tinción con hematoxilina y eosina.

La figura 6.3 corresponde a una ampliación de la zona indicada de la figura 6.2 C. Se ven con mayor detalle las estructuras y la extensión de la cavidad del proceso de caries llega hasta el tercio medio de la dentina coronal. Sin embargo la tinción de túbulos dentinarios de color rosa nos localiza el frente de penetración de las bacterias.

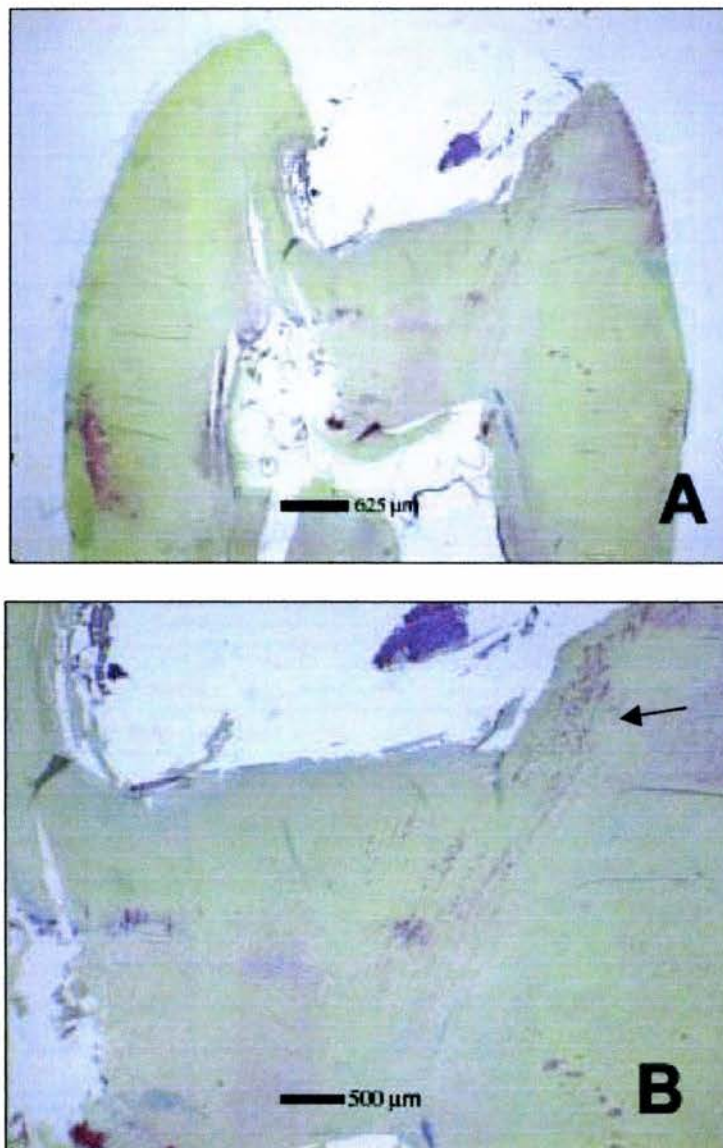


Figura 6. 3 Imágenes de ML. A) Corte teñido con técnica de Brawn y Brenn indicando los tubulos que presentan bacterias en su interior (teñidas de color rosa). B) Se aprecian con más detalle las áreas que son positivas a microorganismos (señalado con flecha).

En la figura 6.3 B se observa la zona de invasión bacteriana en dentina casi llegando a la cámara pulpar. Por lo tanto se puede hacer un análisis más definido de estas zonas. Esto se muestra en la figura 6.4, donde se tiene imágenes de ML de los cortes realizados anteriormente.

En la figura 6.4 A se muestra parte del frente de desmineralización y se observa la degradación de la estructura dentinaria. Al irse degradando, la dentina intertubular permite la acumulación de material orgánico, desechos y bacterias. Siguiendo el trayecto de los túbulos se ve una separación en algunas porciones de la dentina, debido a la acción de ácidos provocando pérdida de material de soporte. En la figura 6.4 B, la cual es un aumento de la figura 6.4 A, los túbulos se observan dilatados anidando bacterias en su interior y restos de material orgánico. Algunos autores describen esta zona como una "zona de licuefacción". Los túbulos dentinarios pierden totalmente su armonía, y se ensanchan llegando a adquirir diámetros de hasta 5 μm . Esto todavía es más notorio en la figura 6.4 D. El proceso de disolución se extiende siguiendo el trayecto de las líneas de incremento de Owen, como se muestra en la figura 6.4 D.

Se revisaron los túbulos dentinarios con el objeto de observar como se introducen bacterias hacia el interior del diente. Esto se muestra en la figura 6.5. Aquí la presencia de microorganismos es evidente, indicando la zona de invasión bacteriana. Es importante especificar que el tipo de bacterias asociadas al proceso carioso no son microorganismo que presenten órganos externos como lo flagelos, que les permitiera introducirse hasta estos niveles dentro del tejido dental. Se puede observar como los túbulos dentinarios que se veían limpios en la figura 6.5 A , en la figura 6.5 B se ven bacterias en su interior. La figura 6.5 D presenta un corte transversal de los túbulos dentinarios, mostrando en color rosa las zonas positivas a los microorganismos. En esta misma imagen se pueden apreciar otros túbulos que no están teñidos, lo que nos indica que no hay presencia de bacterias en su interior.

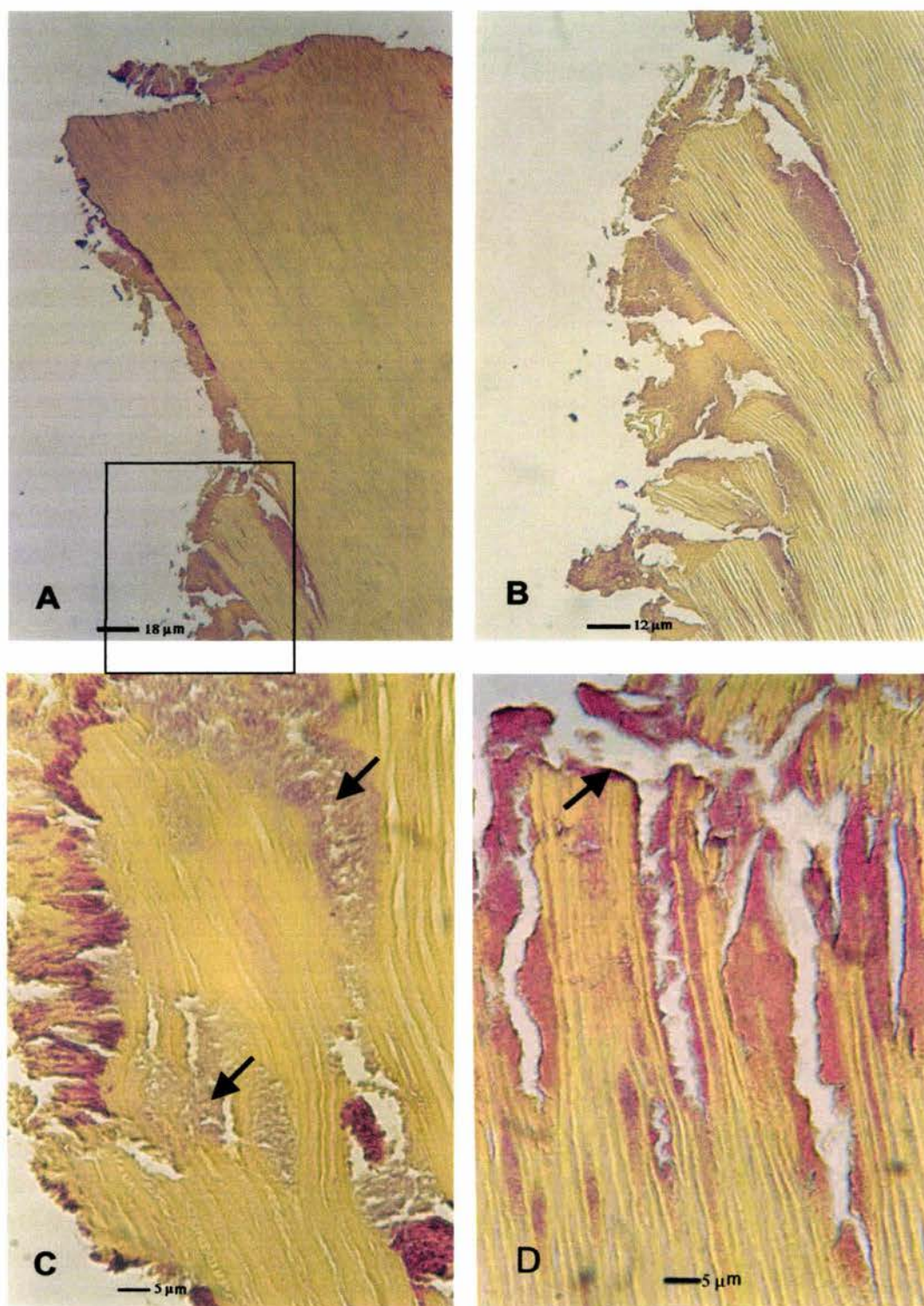


Figura 6.4 Imágenes de ML. A) Frente de desmineralización. B) Imagen correspondiente al recuadro en A. C) Presencia de bacterias en la zona de caries, en el interior de los túbulos dentinales (señalado con flecha). D) Túbulos dentinales ensanchados indicando la invasión bacteriana.

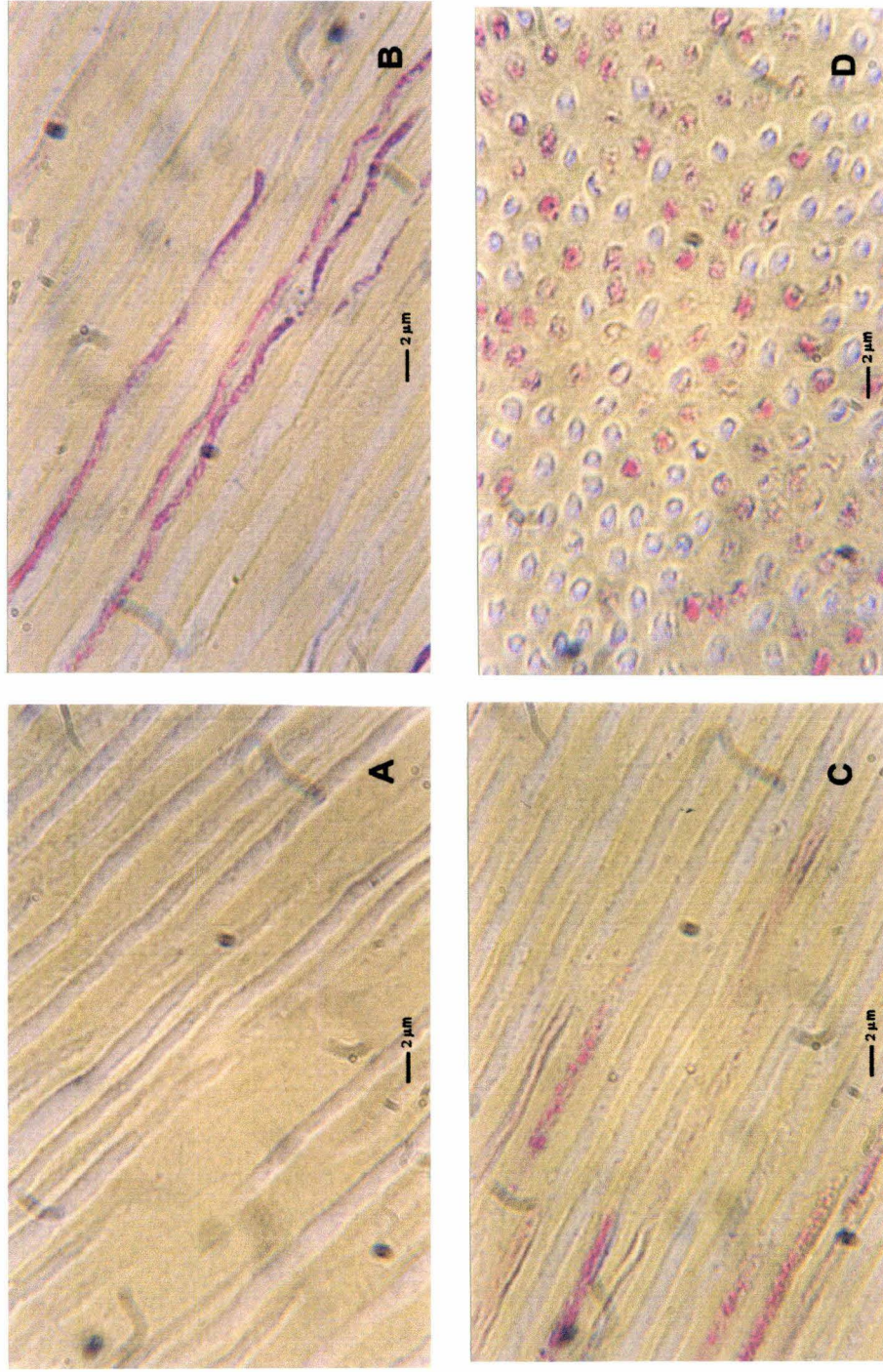


Figura 6. 5 Imágenes de microscopio óptico de cortes con microtomo y tefidos con técnica de Brawn y Brenn. A) Tubulos dentinales libres de bacterias. B) Tubulos dentinales tefidos de rosa indicando la presencia de bacterias. C) Tubulos dentinales en sentido longitudinal con presencia de bacterias en algunos de ellos. D) tubulos dentinales en corte transversal.

6.2 Microscopía Electrónica de Barrido

6.2.1 Corte Histológico

Una vez localizados la existencia de bacterias y el lugar donde encuentran, la mejor forma de observarlas es con una mayor amplificación, pero el ML está limitado en el mejor de los casos a 4 000 X. Por lo tanto se recurrió a la microscopía electrónica de barrido. En la figura 6.6 se muestra parte de una muestra preparada histológicamente siguiendo los mismos procesos que se muestran en la figura VI.4. Para estudiar los cortes del diente por MEB la muestra se sometió a un recubrimiento con una película de carbón.

El inicio del proceso de desmineralización, así como el avance del mismo el cual llega a afectar a pulpa lo observamos en la imagen 6.6 A, la cual se compara con la imagen de ML mostrada en 6.6 B. Aquí se tiene de nuevo zonas positivas a la presencia de bacterias. La zona observada en la figura 6.6 C corresponde a una amplificación del área del recuadro mostrado en la figura 6. 6 A. Aquí algunos túbulos se presentan dilatados, además del desprendimiento de material orgánico que se aprecia en las paredes así como la presencia de algunas prolongaciones odontoblásticas en proceso de degeneración como respuesta al ataque de la enfermedad (figura 6. 6 D).

En la figura 6.7 se tiene una amplificación todavía mayor de la figura 6.6. Es posible ver los túbulos dentinarios en imágenes de electrones secundarios. Se observa con mayor detalle la anatomía de los túbulos, y se nota que el diámetro promedio de éstos es de 1 a 3 μm condiciones sanas, pero ante un proceso de caries este diámetro llega a aumentar hasta alcanzar el diámetro de 10 μm , facilitando el avance de las bacterias y la acumulación de desechos de material circundante. El material degradado se aprecia en la figura 6.7C. Aquí el trayecto de los túbulos se vuelve muy irregular y sinuoso, y en sus paredes se encuentran restos de material orgánico desprendido y expuesto.

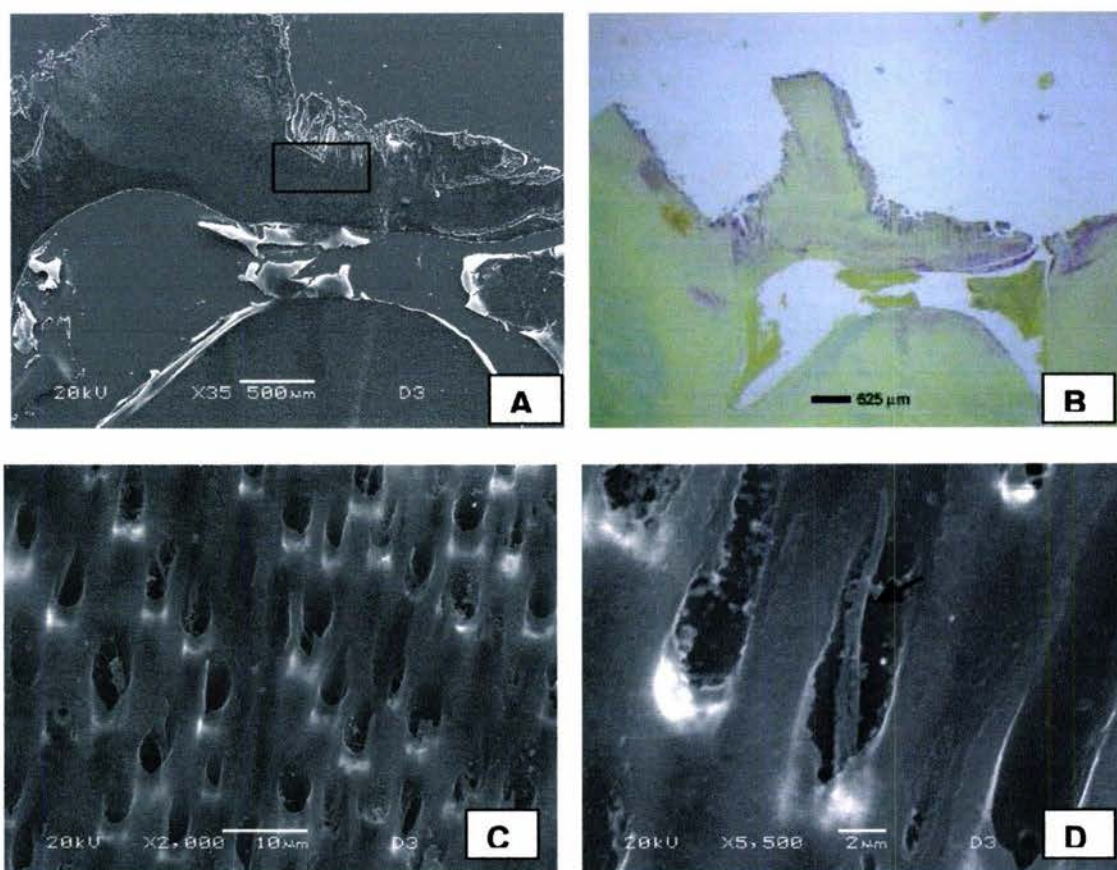


Figura 6.6 Imágenes de MEB. A) Corte dental con microtomo, notándose el frente de desmineralización así como la cámara pulpar. B) Imagen de ML, correspondiente a A. C) Tubulos dentinales por debajo del frente de desmineralización (recuadro en A). D) Presencia de algunas prolongaciones odontoblásticas (indicada con flecha).

6.2.2 Diente Cariado

6.2.2.1 Esmalte

Una vez observado el corte histológico por técnicas de MEB, se procedió a hacer el estudio en el diente en forma volumétrica. En la figura 6.8 se tiene un tercer molar con destrucción parcial de la corona. Para el análisis de la zona a estudiar, se procedió a seccionar el molar con el fin de separar la zona de interés. Primero se realizó un corte en sentido sagital (figura 6.8 A). Posteriormente, para poder separar el resto de corona dental de la raíz, se procedió a colocar de nuevo en la cortadora para realizar un corte en sentido transversal. Esta técnica se describió con detalle en

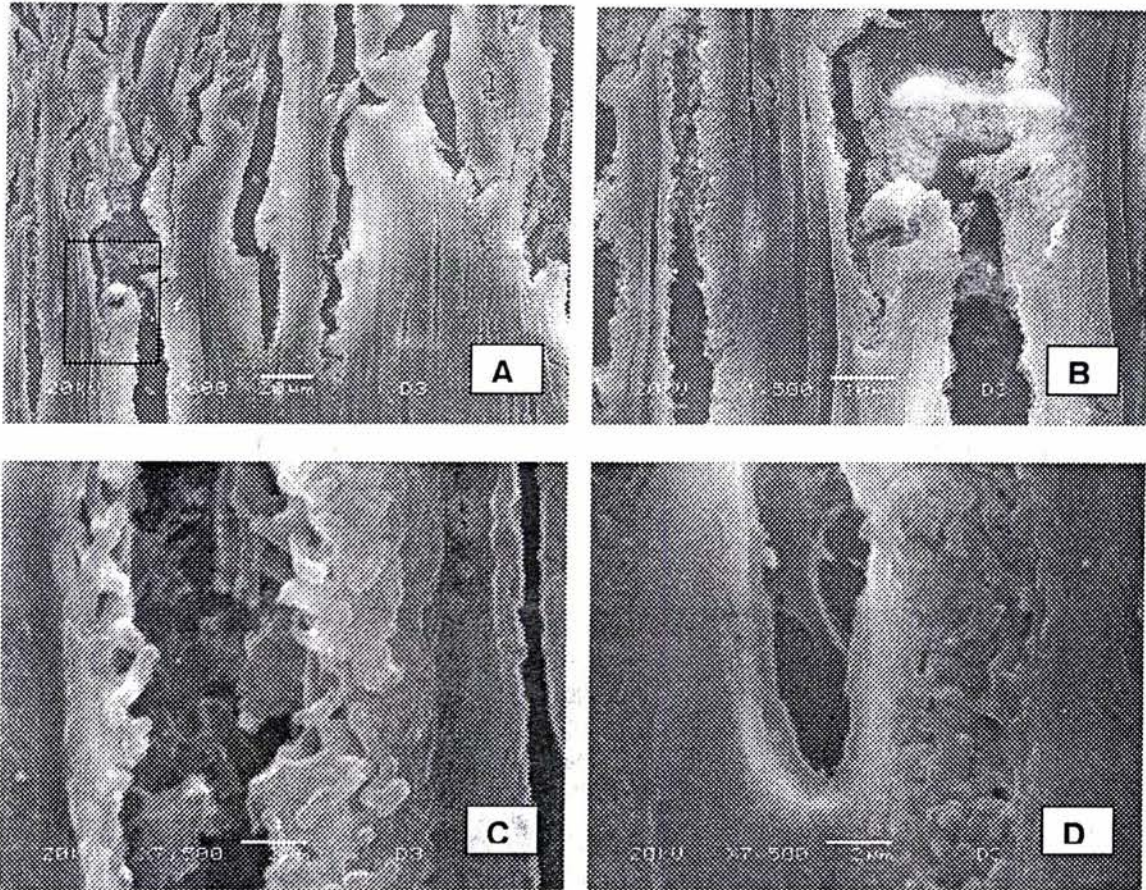


Figura 6.7 Imágenes de MEB. A) Zona del frente de desmineralización. B) Ensanchamiento de los tubulos dentinales, (aumento de A). C y D) Nótese el diámetro de los tubulos.

la sección de preparación de muestras, obteniendo finalmente el segmento que se representa en la figura 6.8 C.

Una imagen de ML de una zona cercana a la pulpa es la que se presenta en la figura 6.8 D. Debido a la presión ejercida durante el proceso de extracción y a que el tejido del molar es poco resistente después de presentar esta destrucción, se dan fracturas tanto en la dentina como en el esmalte por lo que es posible encontrar restos de dentina reblandecida, así como fragmentos óseos y coágulos sanguíneos, al momento de observar este diente por MEB.

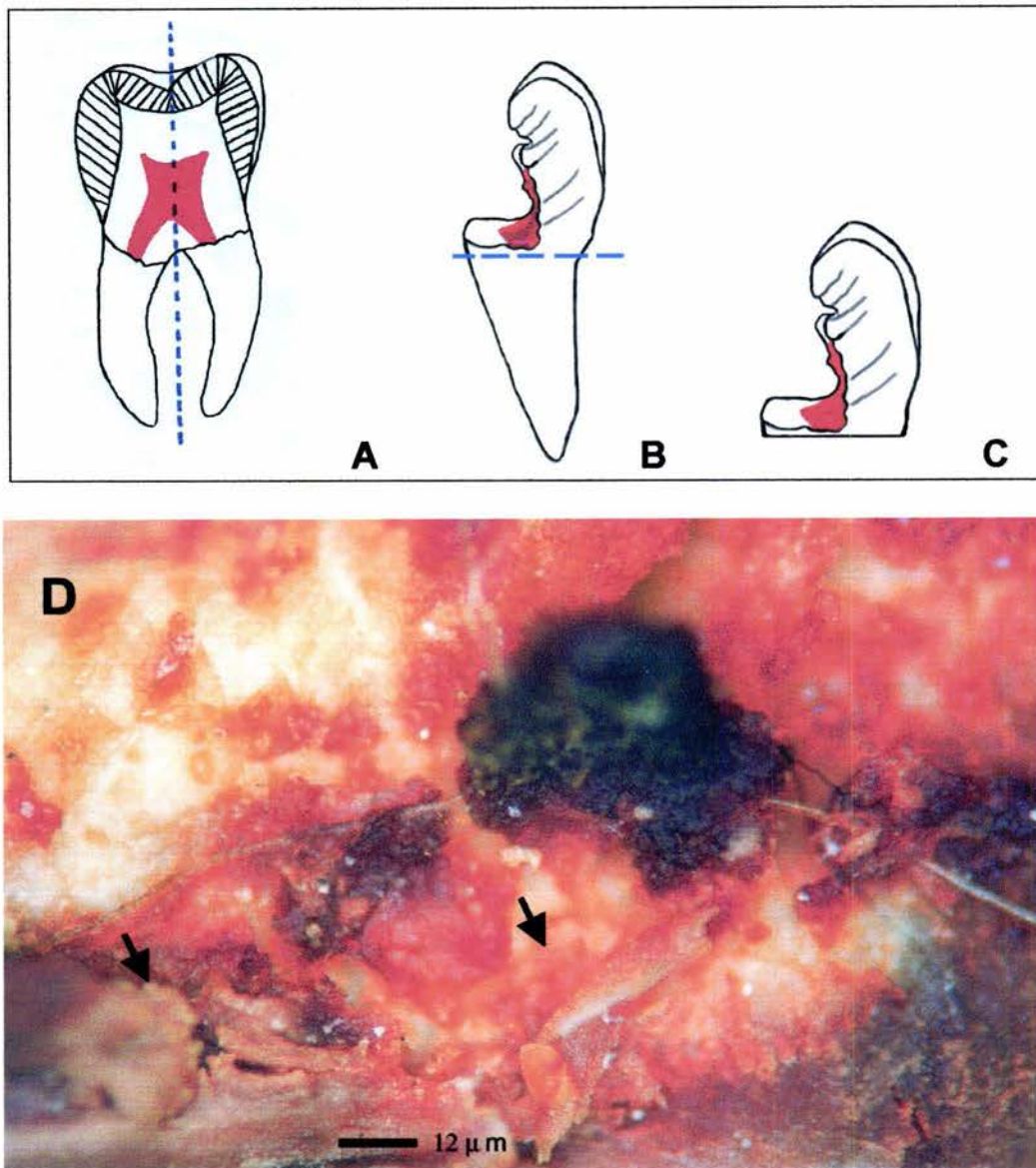


Figura VI.8 A) Molar seccionado sagitalmente. B) Corte transversal, separando la corona anatómica de la raíz. C) Muestra final. D) Imagen de ML de una zona cercana a la pulpa, notándose fragmentos de dentina (indicado con flechas).

En el proceso de la caries la primera zona a ser atacada es el esmalte. Aquí se producen unas cavidades en las cuales se van alojando bacterias, residuos bacterianos y el detritus, participantes en el desarrollo del proceso carioso (figura 6.9 A). En la superficie del esmalte (figura 6.9 B) se observan unos surcos, formados posiblemente por el proceso de masticación al que se someten los dientes

diariamente. También se observan a unas fosas, las cuales están dentro de la zona de una "mancha blanca" (ésta es considerada como el inicio del proceso de desmineralización). Las fosas encontradas tienen un borde irregular, notando la presencia de pequeños granulitos en la periferia de las fosas. Es importante recordar que esta muestra no fue sometida a ningún proceso de desmineralización, sino que inmediatamente de ser extraída se preparó.

Para un mejor análisis de la forma de estas fosas y para percatarnos de su tamaño se hace una amplificación de uno de estas fosas encontrando en su interior lo que pudieran ser algunos cristalitos del esmalte. El tamaño de estas fosas es variado pudiendo llegar a tener en su parte más ancha un diámetro de 12 μm (figura 6.9 D).

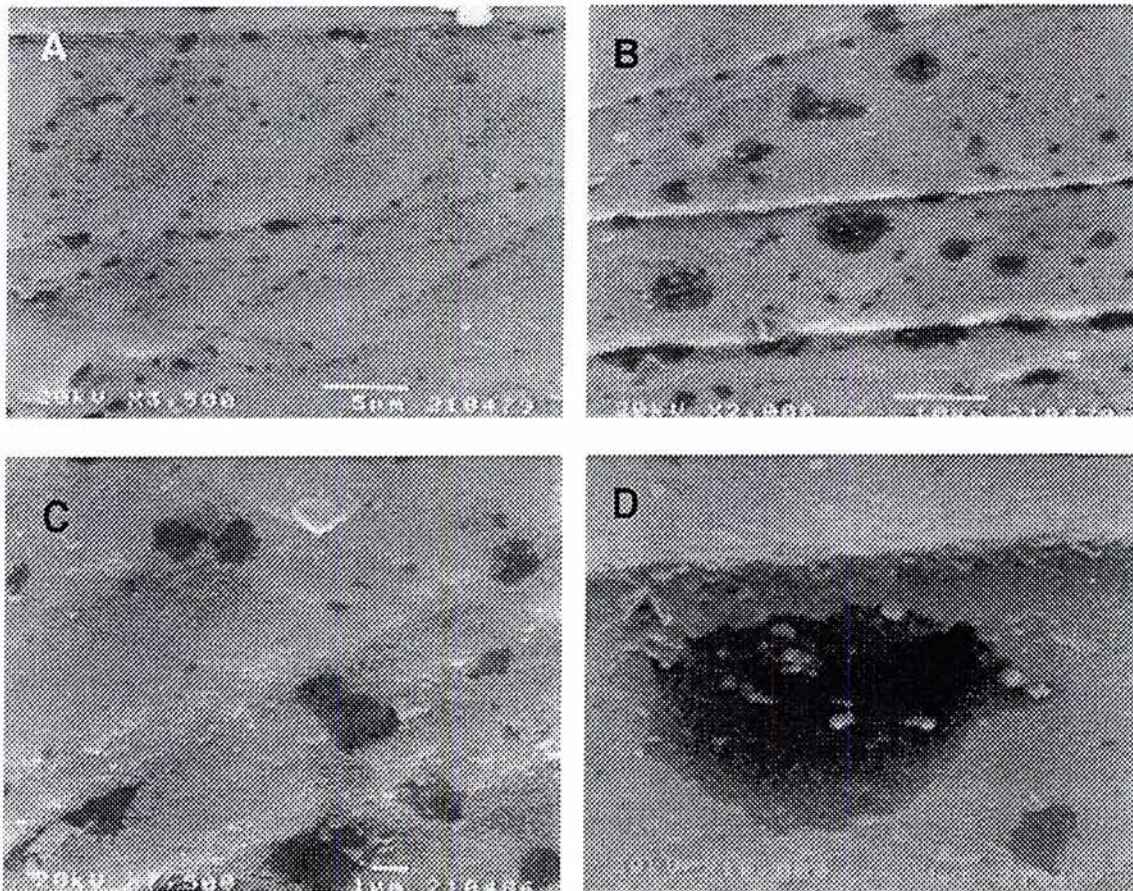


Figura 6.9 Muestra 4. Imágenes de MEB de la superficie del esmalte. A) Nótese el rayado del esmalte como posible efecto del proceso de masticación. B) Fosas presentes en la superficie del esmalte, cerca de la zona de desmineralización. C y D) Observación con mayor detalle de las fositas.

Analizando otro diente en cuya superficie se manifiesta también una mancha blanca se encontró nuevamente la presencia de fosas o cavidades, lo que confirma que éstas son un signo característico en la superficie del esmalte afectado con una "mancha blanca" (figura 6.10 A). El efecto de un ambiente ácido provoca que se llegue a revelar la estructura de los prismas del esmalte. A un mayor aumento de estos prismas se logra ver la presencia de una superficie granulosa en su centro, como se ve en la figura 6.10 B, lo que nos hace pensar que efectivamente este es el sitio de inicio del proceso de disolución (figura 6.10 C).

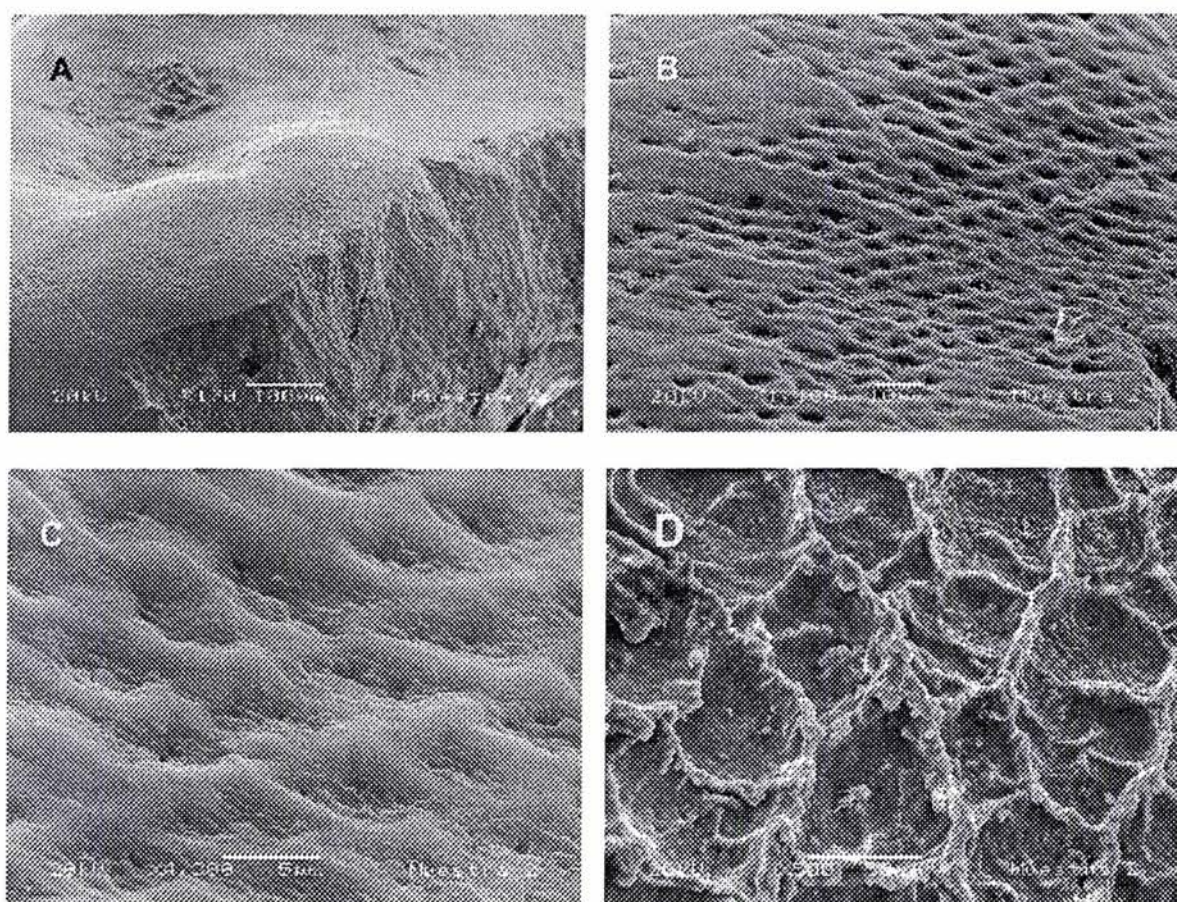


Figura 6.10 Muestra 2. Imágenes de MEB de la superficie del esmalte. A) Zona correspondiente a una "mancha blanca" (señalado con flecha). B) Inicio de la disolución del esmalte, estas fosetas corresponden con los procesos de Tomes. C) Nótese en el centro de las fosetas los cristales del esmalte (señalado con flechas). D) Superficie del esmalte. Estas imágenes se obtuvieron sin ser sometidas a tratamiento alguno sobre la superficie.

Un poco mas hacia adentro, pero aun dentro del espesor del esmalte, se ve otro patrón de disolución por ataque ácido. En este caso los prismas del esmalte dental han sido consumidos o diluidos en parte central, se ve solamente las trazas en las cuales estaban los prismas del esmalte y nos quedan residuos de material orgánicos. Esto se muestra con mayor claridad en la figura 6.10 D.

Reiterando que estas muestras no fueron atacadas ni preparadas para su observación por MEB sino que así es como se presenta el esmalte después de ser afectado por ácidos.

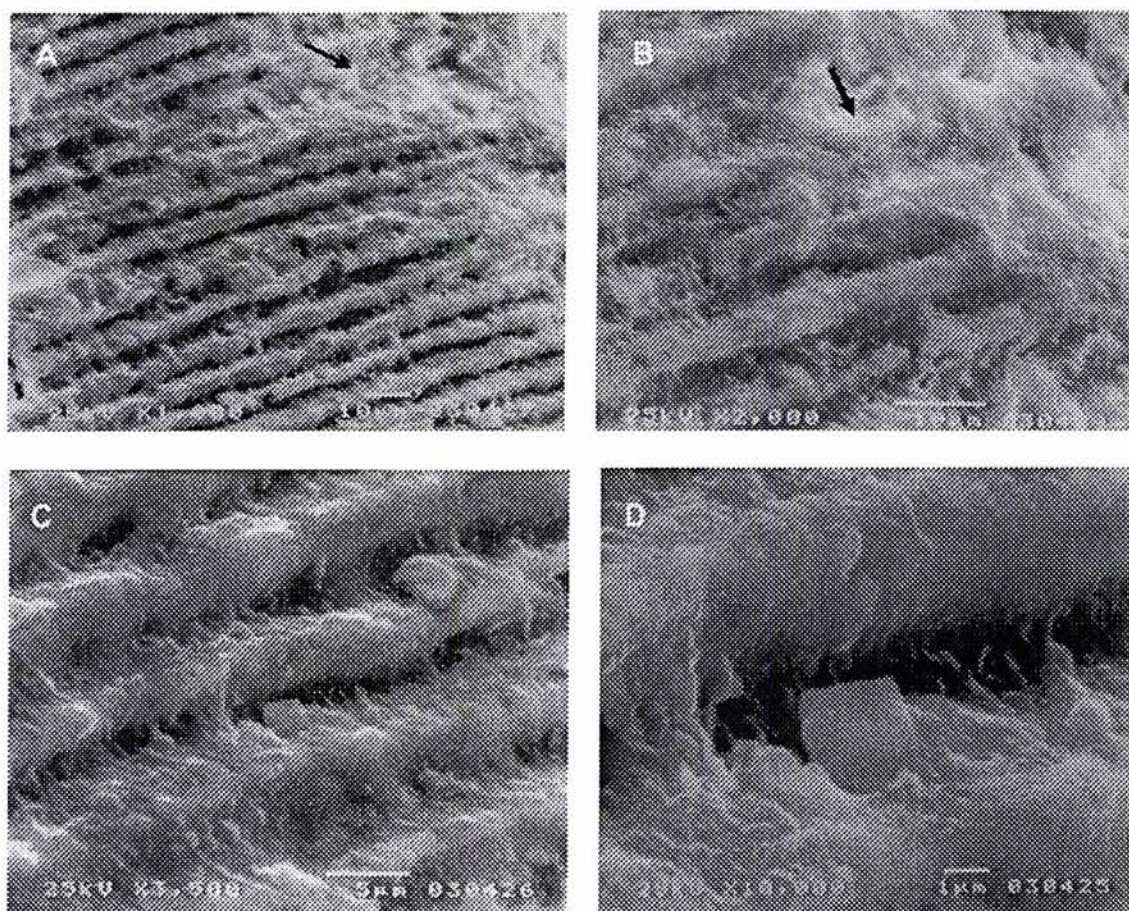


Figura 6.11 Imágenes del MEB del esmalte. A y B) Alteración en la estructura de los prismas, perdiendo su continuidad indicándonos la zona de caries (señalado con flechas). C y D) Trayecto continuo de los prismas del esmalte.

Viendo el esmalte en todo su espesor como se muestra en la figura 6.11, permite analizar el efecto del proceso carioso en los prismas del esmalte. En la figura 6.11 A, se tiene una visión de los prismas del esmalte en sentido longitudinal observando el trayecto de éstos el cual se pierde por degradación del tejido como consecuencia del efecto de los ácidos orgánicos. El sitio en el cual inicia la disolución de los prismas está indicado por la flecha. En la figura 6.11C se observa a los mismos prismas pero en una zona en la cual no se presenta disolución. La continuidad de su trayecto es evidente, pero sí observamos restos de material inorgánico como se muestra en la figura 6.11 D.

La figura 6.12 es una imagen comparativa en la cual se muestran esquemáticamente los prismas del esmalte dental y como se observaría la imagen una vez que han sido removido estos prismas. Se nota la disposición de los prismas y la relación entre un prisma y otro. Al ser separados algunos prismas veríamos la disposición que tiene la sustancia interprismática, debido a que los cristales de hidroxiapatita en esta zona tienen una orientación diferente. Es posible observar la morfología que presenta el prisma diluido, se ven los lugares interprismáticos e incluso se ven algunas zonas donde anteriormente estaban algunos prismas y debido a la disolución se encuentra un espacio, tal y como se muestra con la letra **V**.

Con la idea de ver si existen algunos cambios de tipo composicional en los prismas del esmalte después del ataque carioso se obtuvieron imágenes de electrones retrodispersados y electrones secundarios (figura 6.13). Definitivamente al comparar las imágenes de la figura VI.13 no se observa ninguna diferencia composicional entre estas estructuras. En la figura 6.13C tenemos una imagen de electrones retrodispersados en la cual tenemos señalando la zona de la sustancia interprismática, sitio de separación entre un prisma y otro. Comparativamente se tiene la misma zona en la figura 6.13D pero la imagen fue obtenida con electrones secundarios.

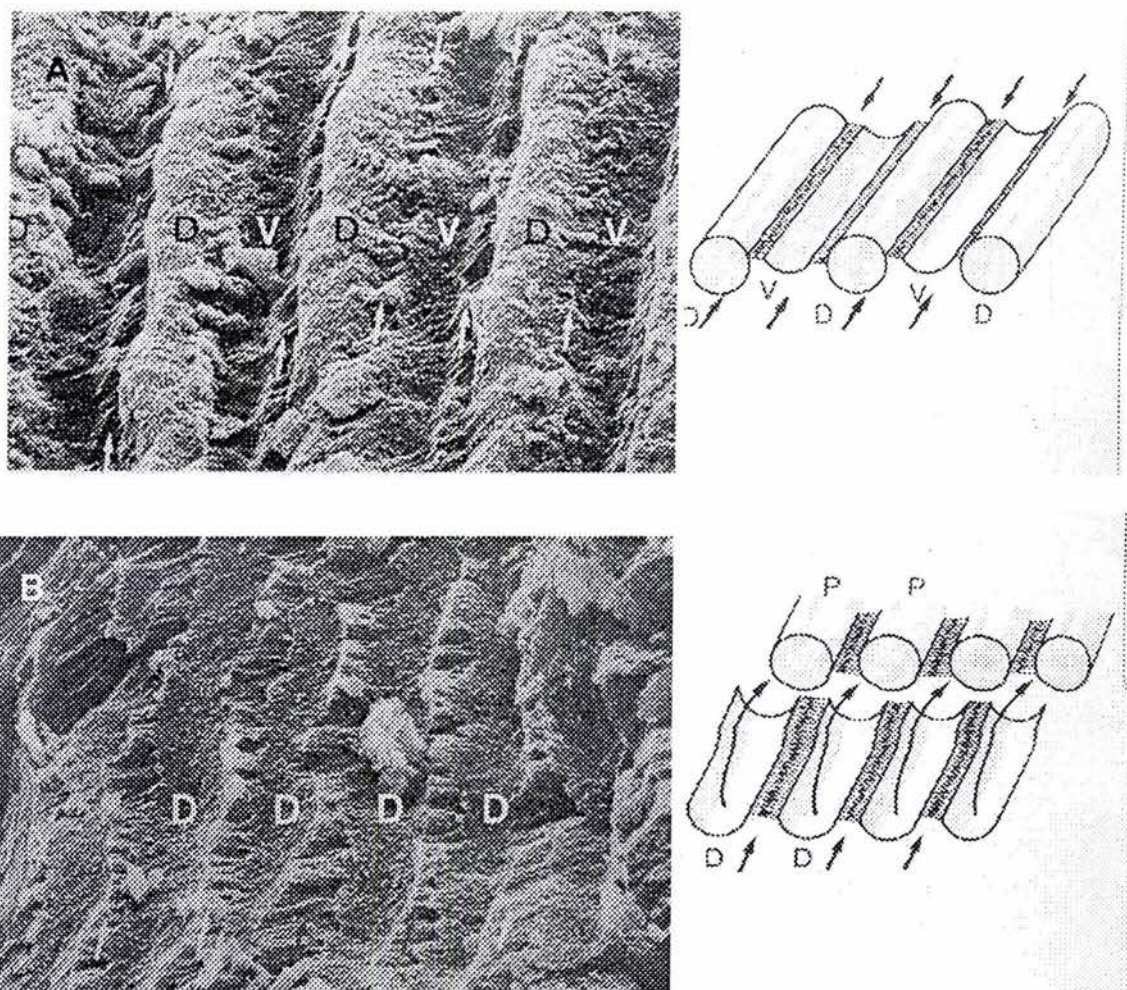


Figura 6.12 Imágenes de MEB y esquemas de los prismas del esmalte, (D) Tejados acanalados de los prismas, las zonas hendidas corresponden a las zonas de ruptura de la sustancia intermedia (V). (Berkovitz 1995).

Continuando con el análisis de las muestras, todavía un poco mas profundo con respecto a la superficie del esmalte pero sin llegar aún a la dentina, se continuó haciendo el análisis de las estructuras.

Dentro del esmalte encontraron zonas de concentración de material orgánico, como lo son las laminillas o husos del esmalte. Así mismo fue posible encontrar algunas fracturas. En la figura 6.14 lo que se observa pudiera corresponder a una laminilla del esmalte o una posible fractura, ocasionada quizás por deshidratación de la muestra

después de ser extraída de la boca. Con el fin de estudiar detenidamente esta zona, se amplificó la imagen (figura 6.14 B), por lo que fue posible observar unas estructuras fibrilares dentro de este defecto en el esmalte. A mayor ampliación (figura 6.14 C) se nota que estas estructuras no parecen corresponder a los componentes de los prismas, probablemente sean residuos de material orgánico, correspondiente a proteínas. Siendo las enamelinas a las que frecuentemente se les localiza en las laminillas o penachos del esmalte. Debido a la morfología y al tamaño que presentan, y comparando éstas con las imágenes de MEB de las bacterias presentadas en la sección 3 (correspondiente a Caries) estas estructuras no corresponden a microorganismos.

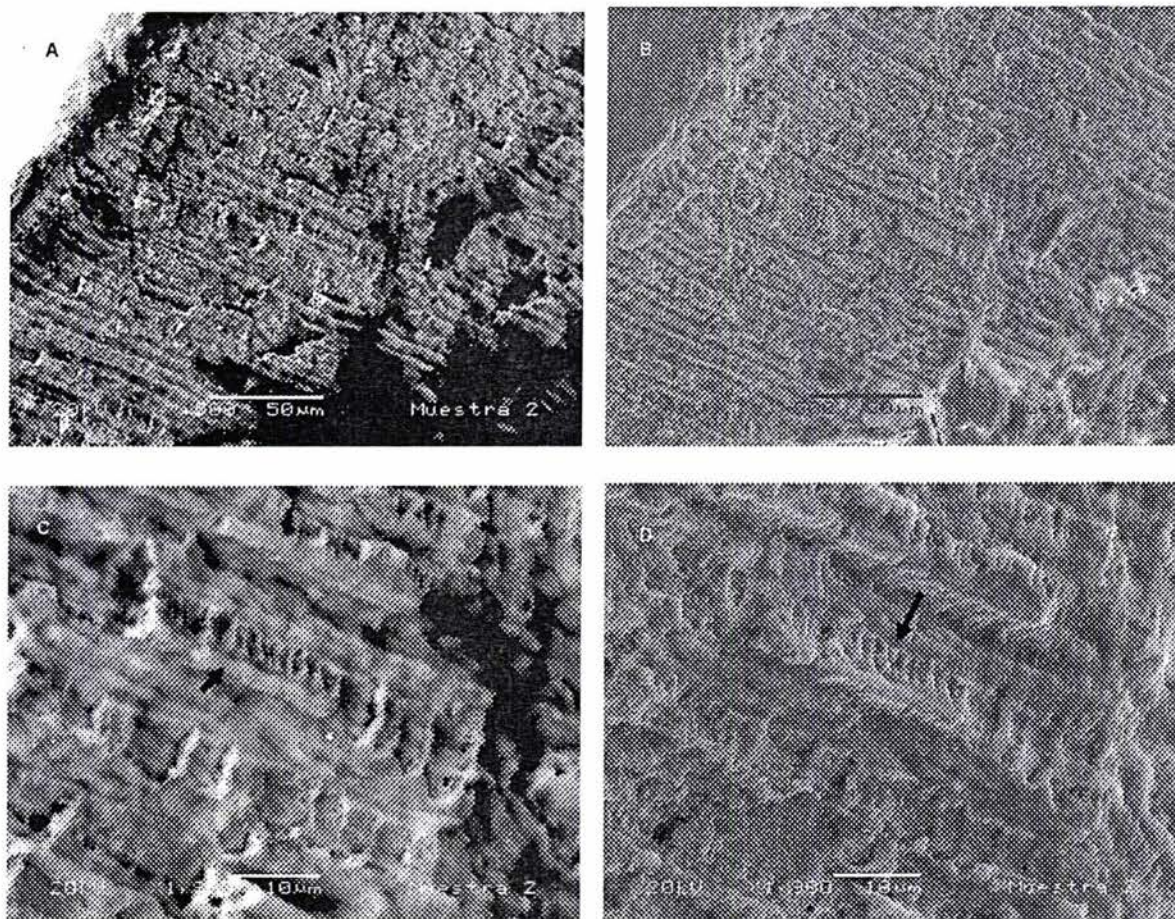


Figura 6.13 Muestra 2. A y C) Imágenes de MEB con electrones retrodispersados del esmalte, zonas de separación de la sustancia intermedia de los prismas (señalado con flechas). B y D) Electrones secundarios, observándose con mayor detalle la topografía.

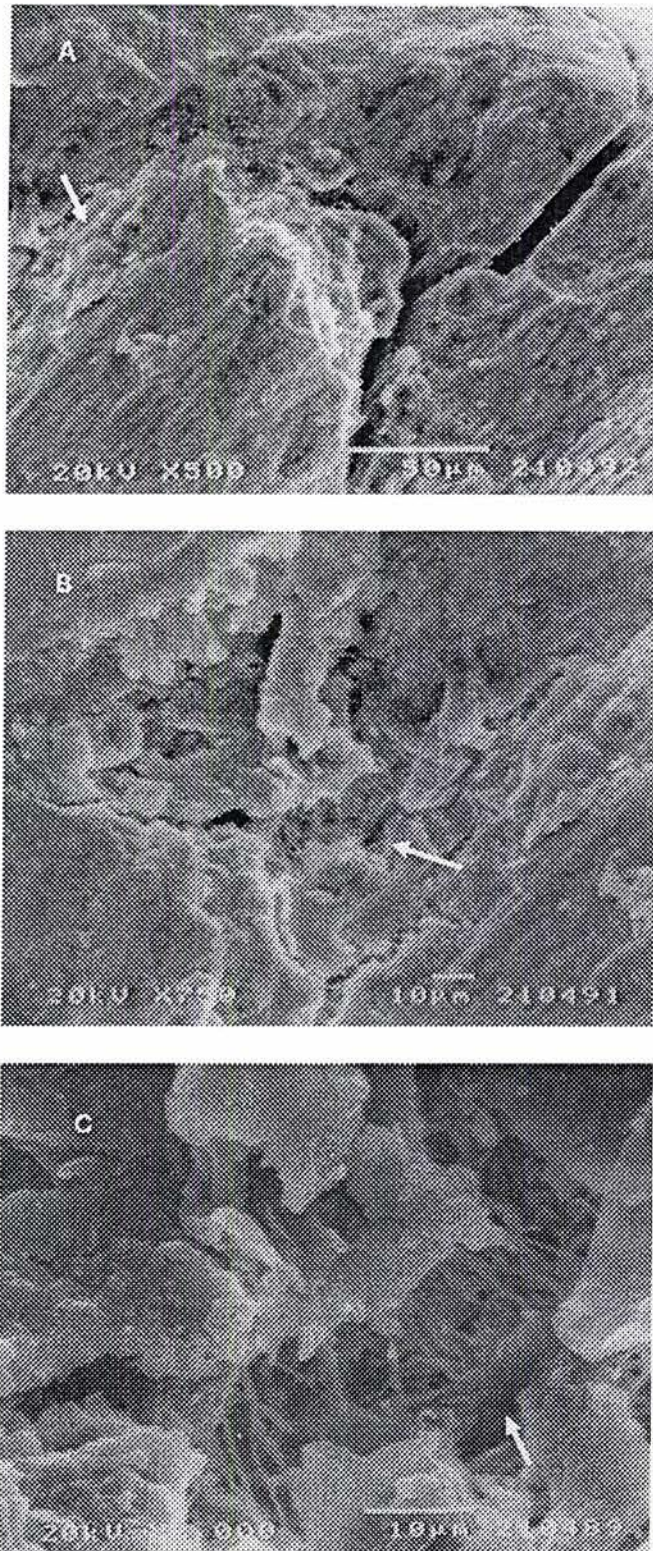


Figura 6.14 Muestra 4. Imágenes de MEB del esmalte. A) Zona afectada por el proceso carioso, nótese los prismas del esmalte (señalado con flecha). B) Estructuras en forma de fibras en el esmalte. C) Estructuras fibrilares a mayor aumento.

6.2.2.2 Dentina

Llegando a la dentina, se observaron los efectos de la caries producidos en ella. En el análisis de la superficie del tejido dentinario expuesto, se ven algunas estructuras conocidas. En la figura 6.15 A se ve lo que correspondería a una zona cercana a la cámara pulpar, viendo algunos componentes sanguíneos como lo son los eritrocitos que se caracterizan por la depresión en su centro debido a la ausencia de núcleo. En la figura 6.15 C se aprecia la estructura del tejido dentinario atacado por ácidos, estructuras como puentes y columnas que posiblemente corresponda a fibras.

La superficie de la dentina es irregular, con presencia de cúmulos del mismo tejido. En la figura 6.15 D se presenta la dentina de reparación; esto hace pensar la escasa presencia de túbulos dentinarios. Aquí se observa la dentina sometida a un ataque muy severo tipo ácido, lo que permite observar los efectos del avance de la lesión. En otra zona observa una dentina cuya superficie está en forma de cúmulos que puede ser el resultado de someter la hidroxiapatita a los ácidos (figura 6.16). Sobre la superficie se pueden notar algunas partículas irregulares. Estas pudieran ser restos de material dentinario desprendido. En la figura 6.16C se presenta la estructura de la dentina bajo los efectos de ácidos. Esta se torna muy irregular sin mostrar una orientación definida de su tejido.

Enfocando los túbulos dentinarios vemos que el diámetro de estos es muy grande. Comparando esta figura con la mostrada en la figura 6.16 D, en la cual se presenta una imagen de túbulos dentinarios "normales" en sentido transversal cuyo un diámetro va de 1 a 2 μm , nos damos una idea de la magnitud de este evento. Esto corresponde de cierta manera a una visión clásica de la dentina en un corte en sentido transversal, pudiendo incluso identificar las diferentes estructuras: túbulos dentinarios rodeados por una delgada capa de dentina peritubular, que en la imagen se ve como un anillo brillante delimitando al túbulo. Asimismo nos podemos percatar de la dentina intertubular la cual da un aspecto de tener una superficie lisa. En el

interior de los túbulos se alcanza a evidenciar lo que pudiera ser algunas prolongaciones odontoblásticas.

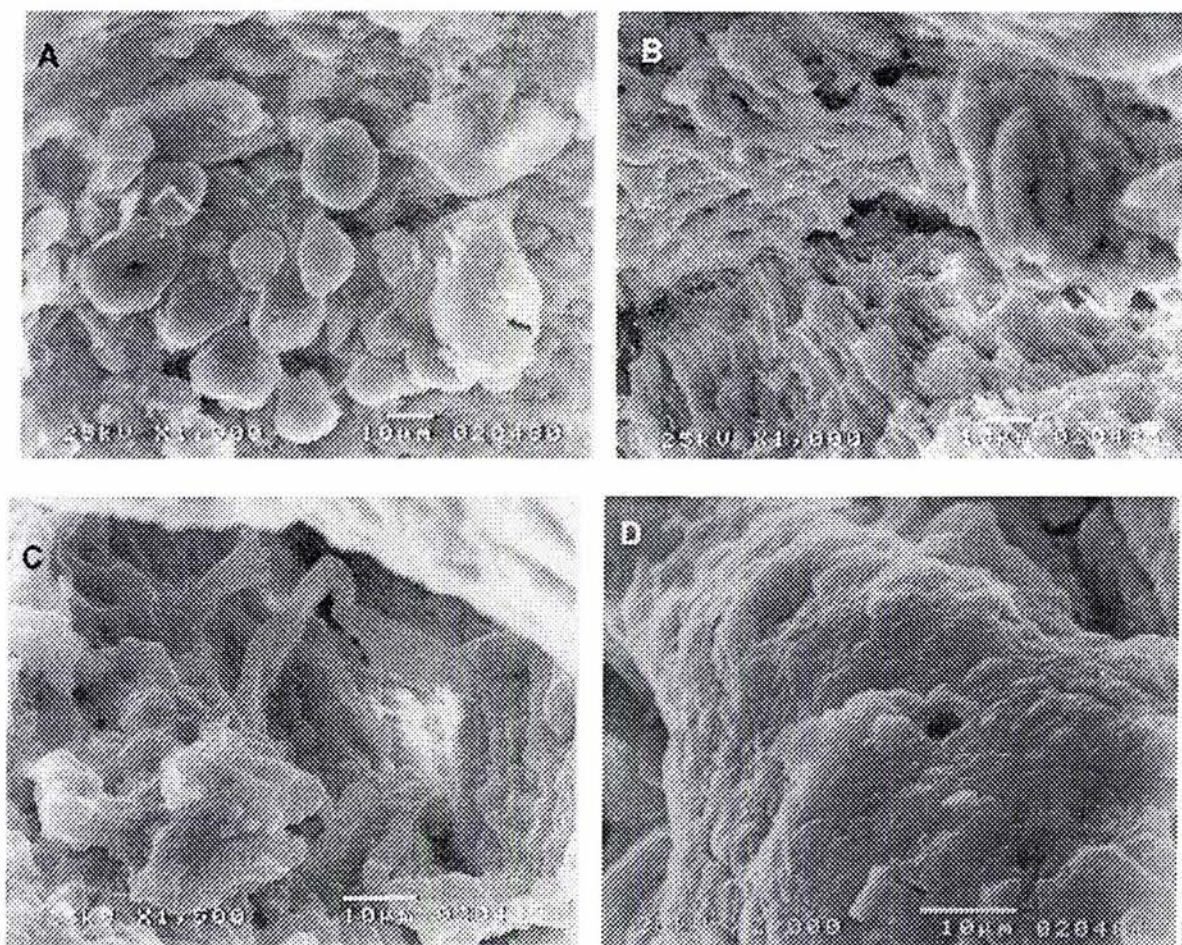


Figura 6.15 Imágenes de MEB de la dentina con presencia de un proceso carioso. A) Restos de componentes sanguíneos: eritrocitos; B) Superficie de la dentina. C) Algunas fibras de colágena. D) Dentina de reparación con túbulos dentinarios aislados;

Los efectos del proceso de caries sobre los tejidos dentarios han sido muy interesantes. Avanzando en la observación de la dentina, la figura 6.17 B y C se presentan túbulos dentinarios con un diámetro de aproximadamente 10 μm por lo que es posible ver la diferencia con los túbulos de la figura 6.16 D. El aumento en el diámetro de los túbulos es evidente en la figura 6.17 C. Aquí se ven uno de estos túbulos correspondientes a la figura 6.17B con mayor detalle, lo que da una idea de

la magnitud del problema. Es frecuente encontrar también la presencia de dentina de reparación (figura 6.17 D) la cual se va a manifestar por la poca presencia de túbulos, la formación es irregular, se pierde ese aspecto de red de túbulos interconectados.

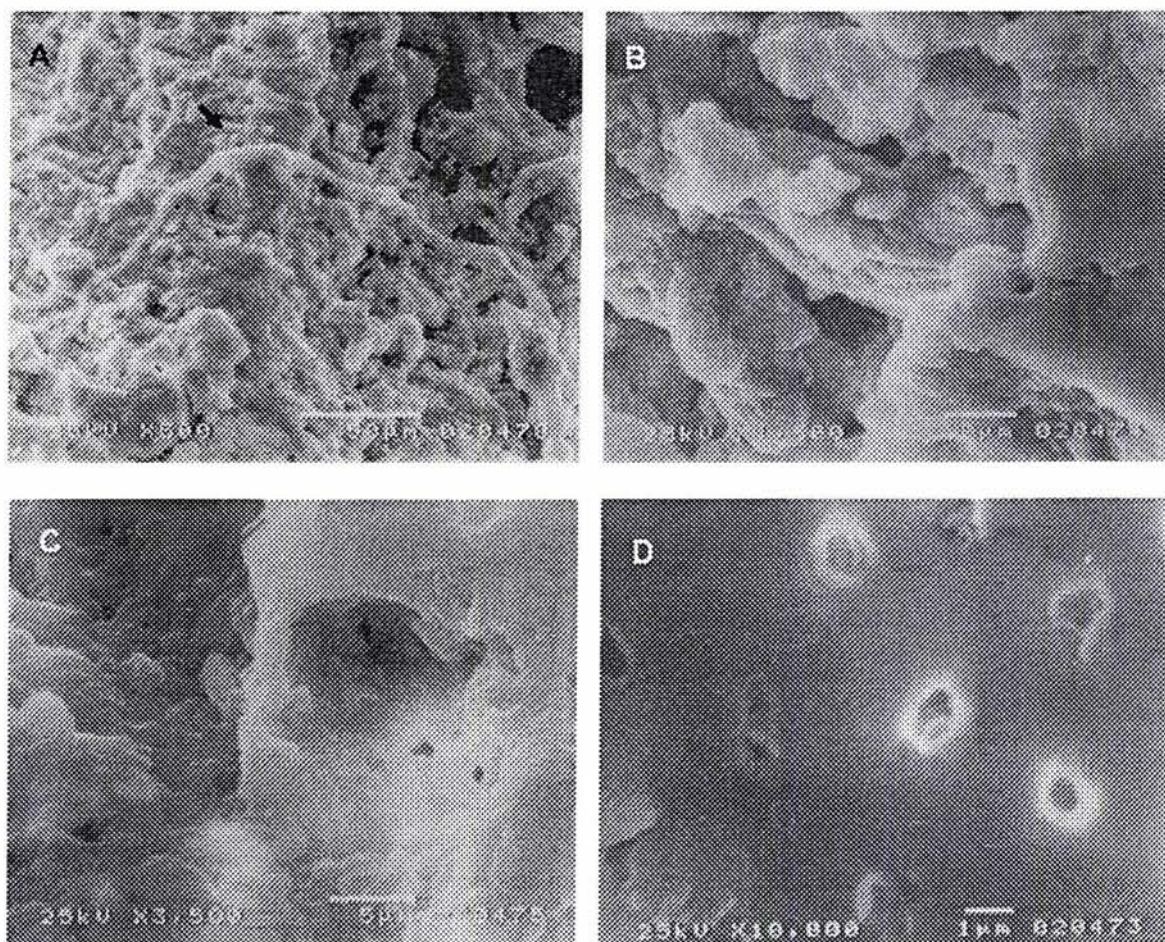


Figura 6.16 Imágenes de MEB de dentina afectada por el proceso carioso. A) Estructura fibrilar correspondiente a colágena (señalado con la flecha). B y C) Superficie irregular de la dentina como efecto del proceso carioso. D) Tubulos dentinales vistos de manera transversal. Nótese la dentina peritubular delimitando los tubulos.

El material orgánico ha quedado expuesto después de un ataque por caries. Esto se demuestra en la figura 6.18, en donde prácticamente no existe dentina intertubular (figura 6.18 B) quedando solamente lo que pudiera tomarse como unas fibras de colágena y dando un aspecto de armazón para el tejido perdido. Se ve en la figura el

ataque drástico del proceso carioso sobre la dentina, dando como resultado que el material orgánico quede expuesto a la intemperie bucal. En la figura 6.18 C se ve la presencia de restos de material orgánico sobre la dentina, lo mismo en la figura 6.18 D la cual corresponde a una mayor amplificación. Observando con detalle este tejido, parece ser colágena.

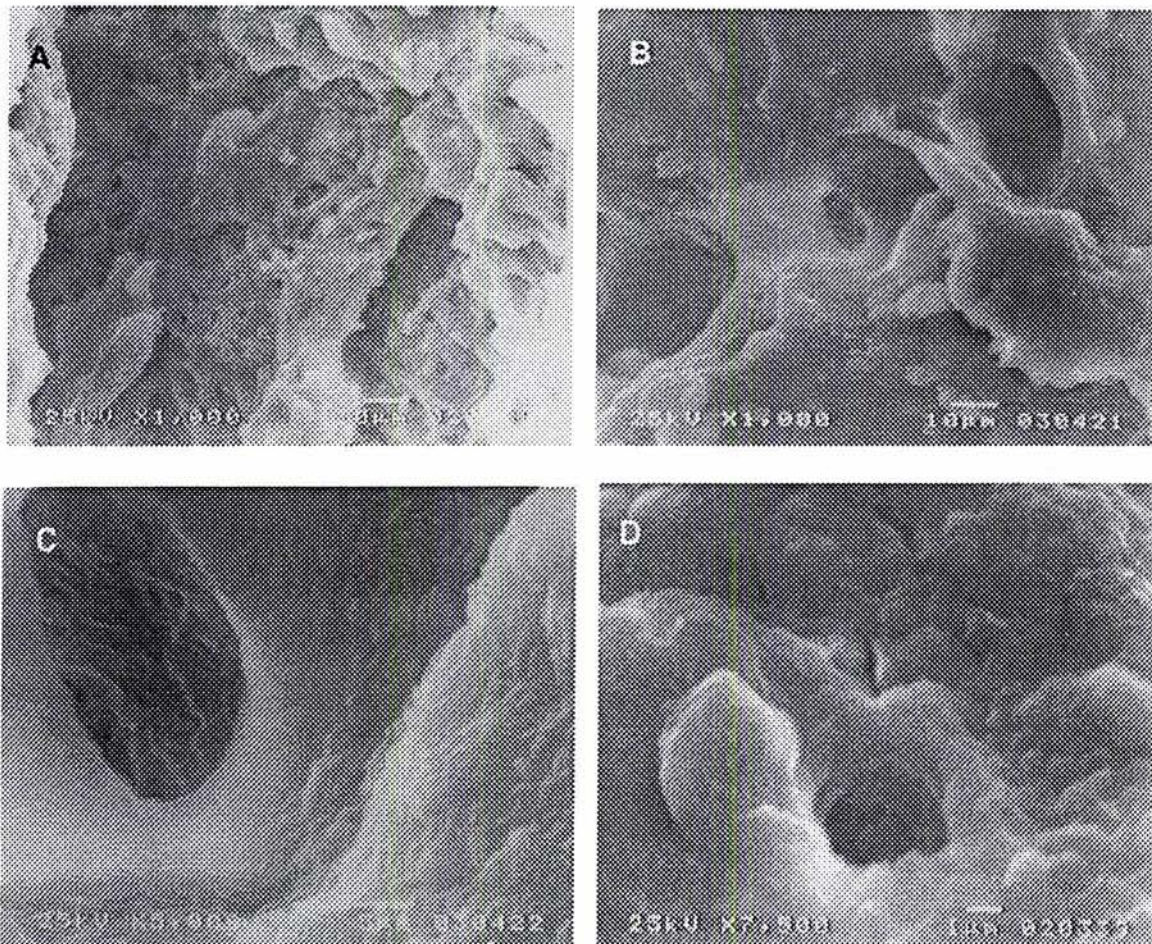


Figura 6.17 Muestra 2. Imágenes de MEB de dentina. A) Red de tubulos dentinarios B y C) Nótese el diámetro de los túbulos que es mayor a 5 μ m. D) Estructura de la dentina de reparación.

Otras estructuras de este tipo están en dentina, cerca de la cámara pulpar (figura 6.19). Se ve que ya no hay una identificación de la red dentinaria sino solamente es visible e identificable lo que sería material orgánico. Al estar en dentina, esto quizás corresponda al molde de las prolongaciones odontoblásticas.

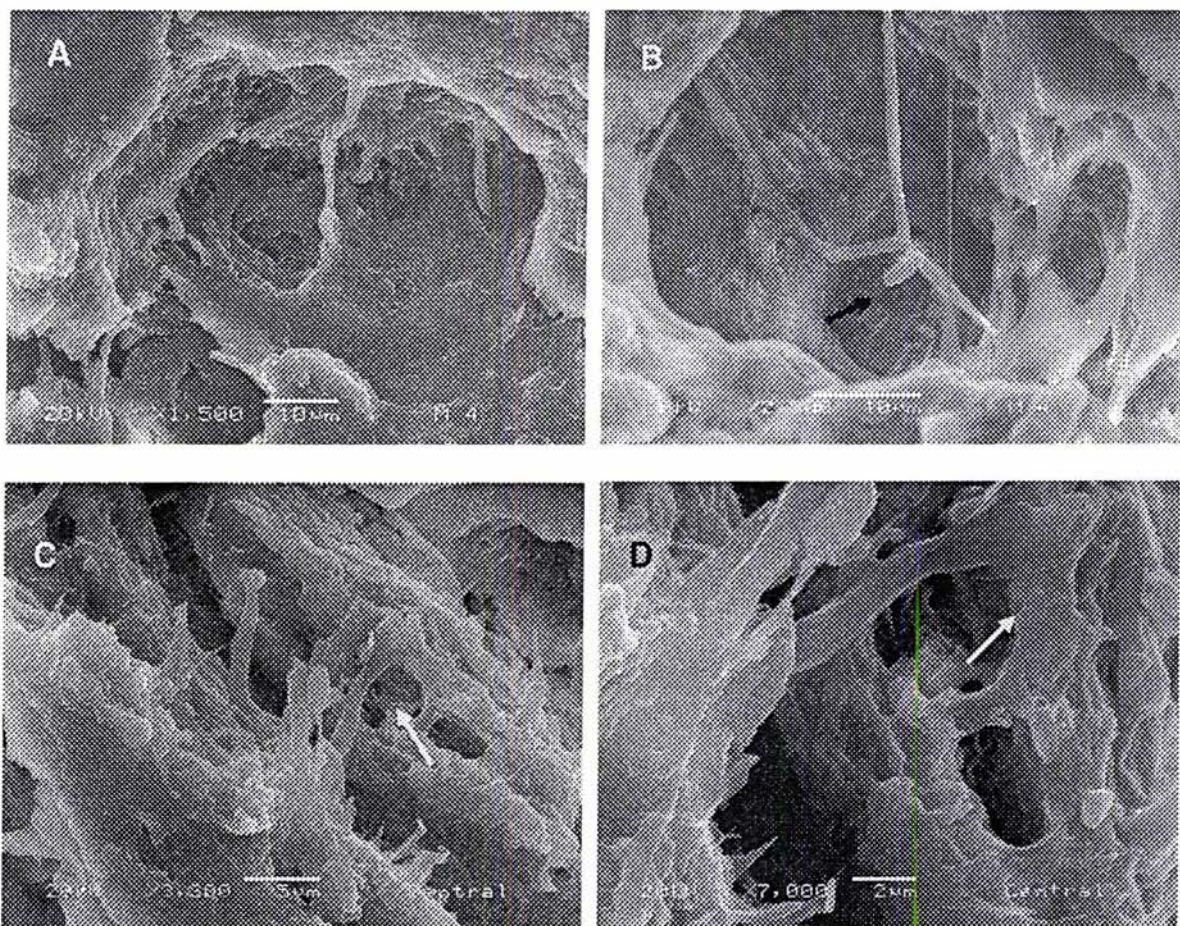


Figura 6.18 Muestra 4. Imágenes de MEB de dentina. A y B) Nótese el tamaño de los tubulos dentinarios, los cuales se encuentran ensanchados, nótese también algunas fibras posiblemente de colágena (señalados con flecha). C y D) Efectos del proceso carioso sobre la dentina, observándose algunas estructuras correspondientes a material orgánico (señalado con flecha).

6.2.2.3 Bacterias

Hasta aquí a sido posible observar el daño que ha sufrido el esmalte dental y la dentina. Ahora se ven algunas bacterias que se asocian a la lesión de caries. Estas se muestran en la figura 6.20. La presencia de dentina en forma de cúmulos puede indicar la formación de manera irregular de este tejido como un proceso rápido de autodefensa ante el estímulo de la caries. De los escasos túbulos dentinarios presentes en esta zona, podemos notar la dentina peritubular (figura 6.20 B). La dentina peritubular se encuentra más mineralizada que la dentina intertubular. Haciendo referencia a la presencia de bacterias en la zona de caries, se muestra en

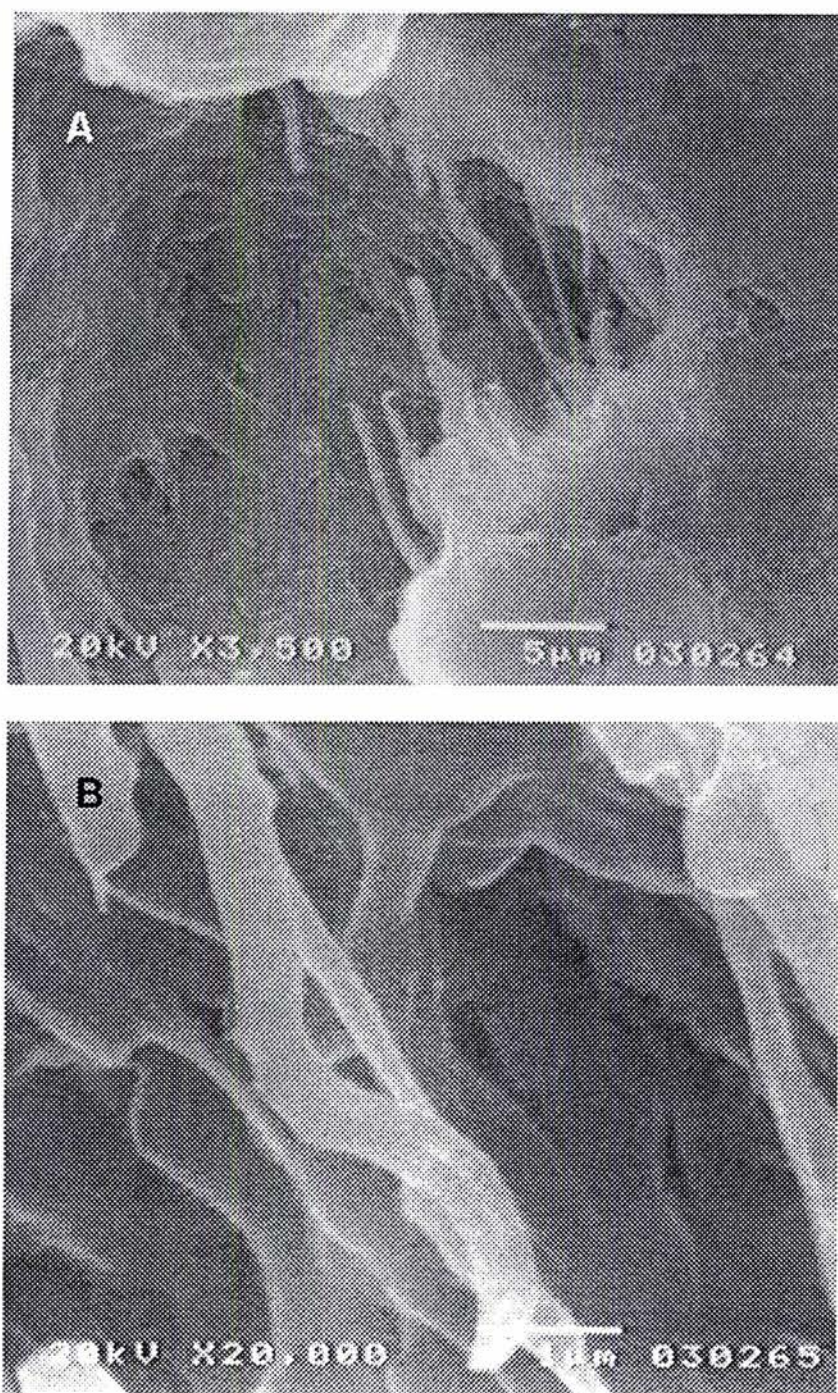


Figura 6.20 Imágenes de MEB del tejido dentinario en el cual se observa la presencia de fibras aparentemente de colágena .

la figura 6.20 C unos microorganismos en forma de bacilos. La forma en que se presentan, es de pequeños segmentos que le dan un aspecto de "collar". En la figura

6.21 se ve con mayor detalle las bacterias que se localizaron en esta zona. En la dentina seguimos observando una degradación del tejido, siendo evidente la gran cantidad de túbulos dentinarios, Una mayor apreciación de las bacterias presentes en el proceso de caries se presenta en las figuras 6.21 C y D. Aquí la forma alargada característica de los bacilos es más evidente.

Nótese de nuevo la “forma de collar” que presentan estas bacterias. El conocer la forma que presentan estas bacterias permite observarlas más fácilmente y reconocer su presencia en el esmalte y en la dentina tal y como se puede ver en la figura 6.22 donde la densidad de estas bacterias aumentó considerablemente.

En la figura 6.23 A se observan túbulos dentinarios en sentido longitudinal, notando perfectamente la forma de “canalitos” que presenta. Es evidente que en el sitio donde se localizan las bacterias, el aspecto característico de los túbulos se pierde, y se degrada la superficie, confirmando una vez más la asociación bacterias-disolución y degradación de materia. La figura 6.22 C da una idea de la cantidad de bacterias presentes y la forma en que se “anidan”. Nótese que el tamaño de las bacterias es de alrededor de 1 μm y forman cadenas con una longitud que llega a medir hasta 10 μm .

Una mayor apreciación de las colonias de bacterias que encuentran en los dientes con caries se pueden ver en la figura 6.23. Aquí se observan con mucha definición la división que presentan de los segmentos e incluso unas bacterias en aparente proceso de división celular. Nótese el tamaño de estos bacilos que va de 1 a 2 μm de largo. Por la morfología que presentan, estas estructuras corresponden a bacterias ya que son alargados, los cocos son perfectamente redondos.

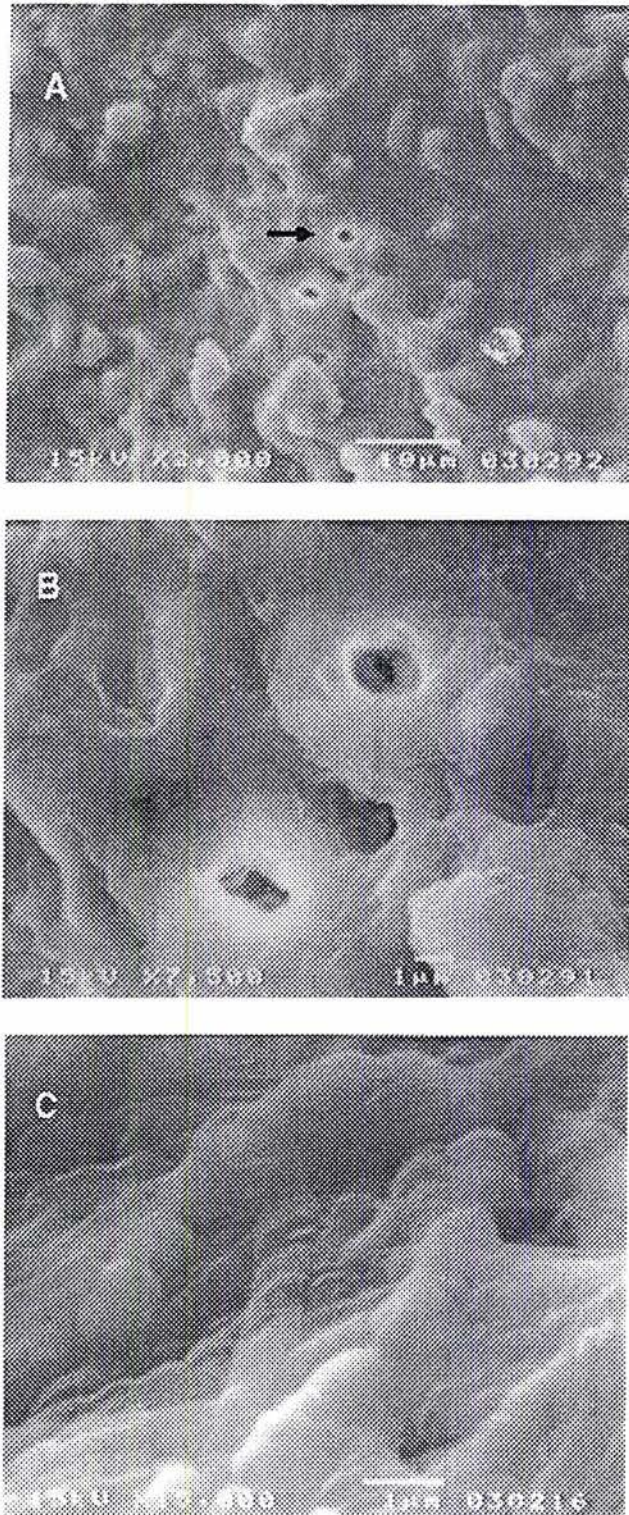


Figura 6.20 Imágenes de MEB de dentina. A) Superficie irregular de la dentina terciaria, C) Aumento de la imagen de A, notándose la poca cantidad de túbulos presentes, C) Microorganismos presentes en el proceso carioso.

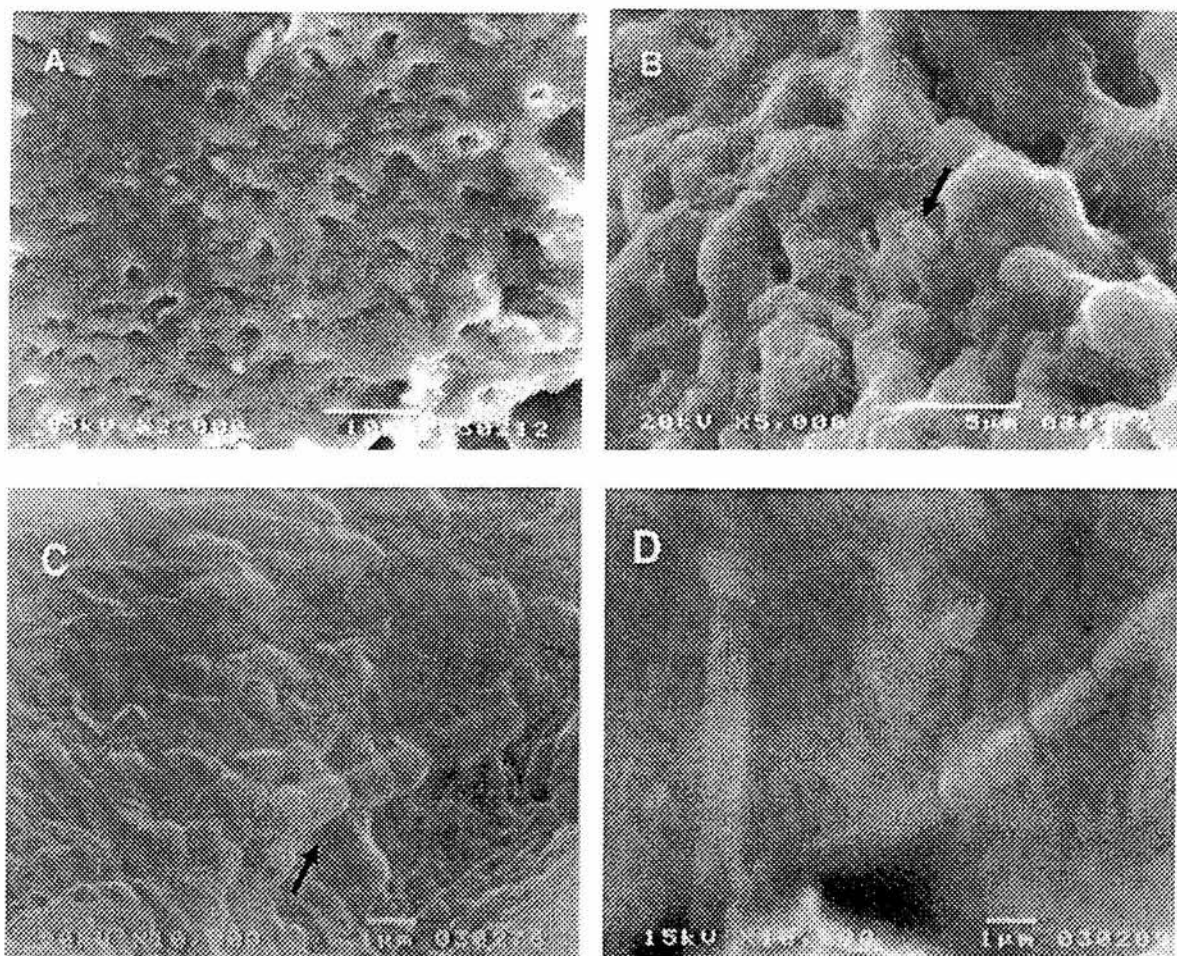


Figura 6.21 Imágenes de MEB de los microorganismos. A) Superficie irregular de la dentina, por efecto del proceso de caries. B y C) Bacilos implantado sobre la estructura de la dentina (señalados con las flechas). D) Nótese la presencia de estructuras en forma de bacilos y sus divisiones.

6.3 Análisis químico por EDS

6.3.1 Dentina

Una vez localizadas las bacterias y observado la morfología, se hizo un estudio de la composición química de estos organismos, por medio de los rayos x característicos (EDS). Esto se presenta en la figura 6.24 donde se muestra una imagen de la dentina y su espectro de EDS. Fue posible observar la presencia de elementos correspondientes a la hidroxiapatita (Ca, P, O), así como elementos que han sido considerados como elementos traza. Los elementos traza son el Mg, Na, K. Se ve

que en esta zona la cantidad de Ca es de 0.48 y de P es 0.31, ésto da una razón C/P de 1.54.

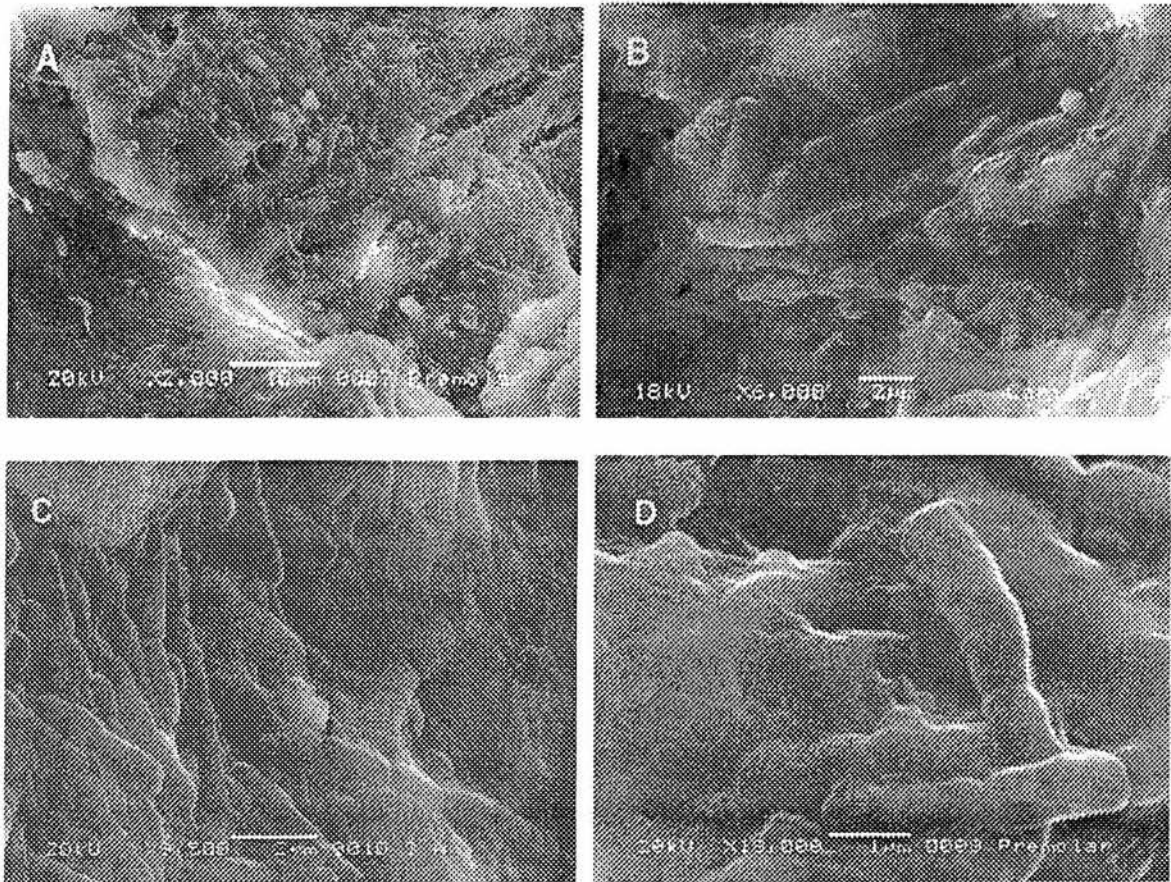


Figura 6.22 Imágenes de MEB de microorganismos presentes en dentina. A) Túbulo dentinario en sentido longitudinal, dentro de los cuales hay bacterias; B) Amplificación de los microorganismos; C y D) Microorganismos con un tamaño promedio de 10 μm de largo y 1 μm de ancho.

Entonces se ve que tenemos un alto contenido de C y O, lo que es característico de un componente un orgánico. Este resultado lo que dice es que en esta zona la dentina está cubierta de una capa de material orgánico. Es decir, aunque se ve también en la imagen la presencia aislada de algunas bacterias.

Para asegurar que estos elementos efectivamente si están presentes en la dentina se realizó un hecho un análisis químico de la dentina sana. La concentración de los elementos encontrados se presentan en la tabla 6.1. Se ha tomado un mapeo

químico de la dentina con los elementos Na, P, Ca, C y O (figura 6.25). Observando que el Ca y P están homogéneamente distribuidos, así también el O y C. Por lo tanto no se tiene ningún problema en comentar que estos elementos están presentes en la dentina.

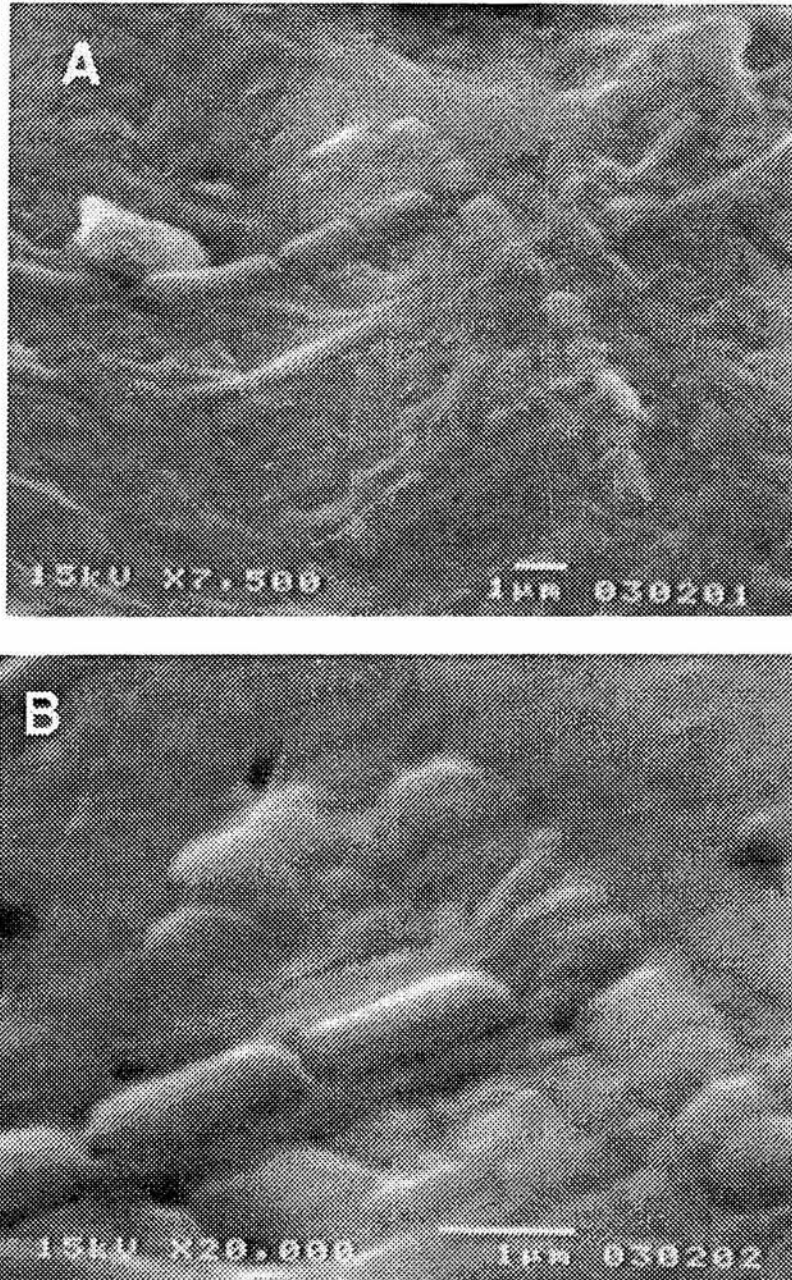


Figura 6.23 Imágenes de MEB de microorganismos presentes en la zona de caries. A) Cadenas de bacilos sobre la estructura dentinaria. B) Una mayor amplificación. Nótese el tamaño de las bacterias.

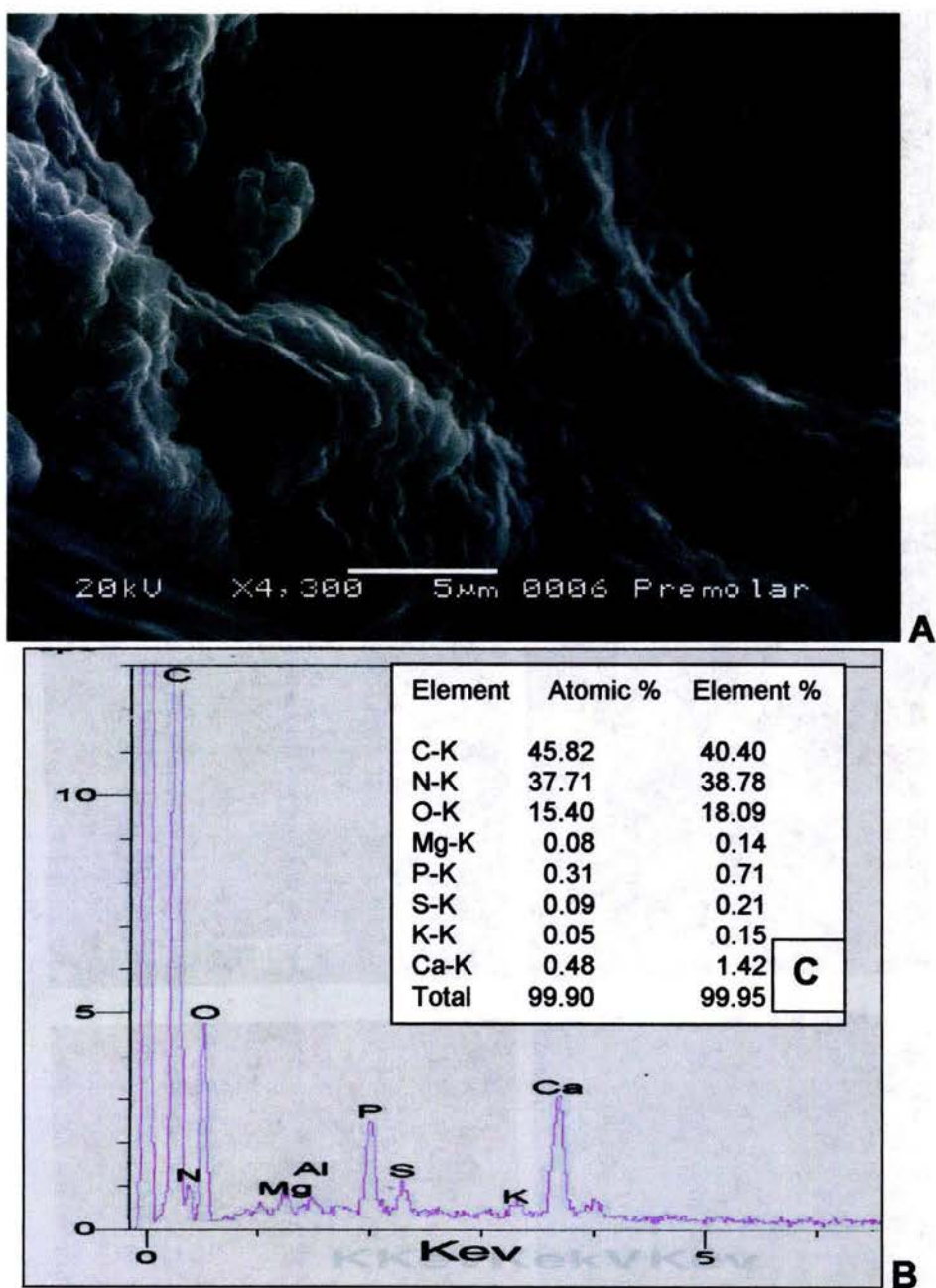


Figura 6.24 A) Imagen de MEB de la dentina cubierta con algunas bacterias y a la cual se le realizo un estudio con EDS. B) Espectro del EDS. C) Tabla con los elementos cuantificados, con una razón Ca/ P de 1.54.

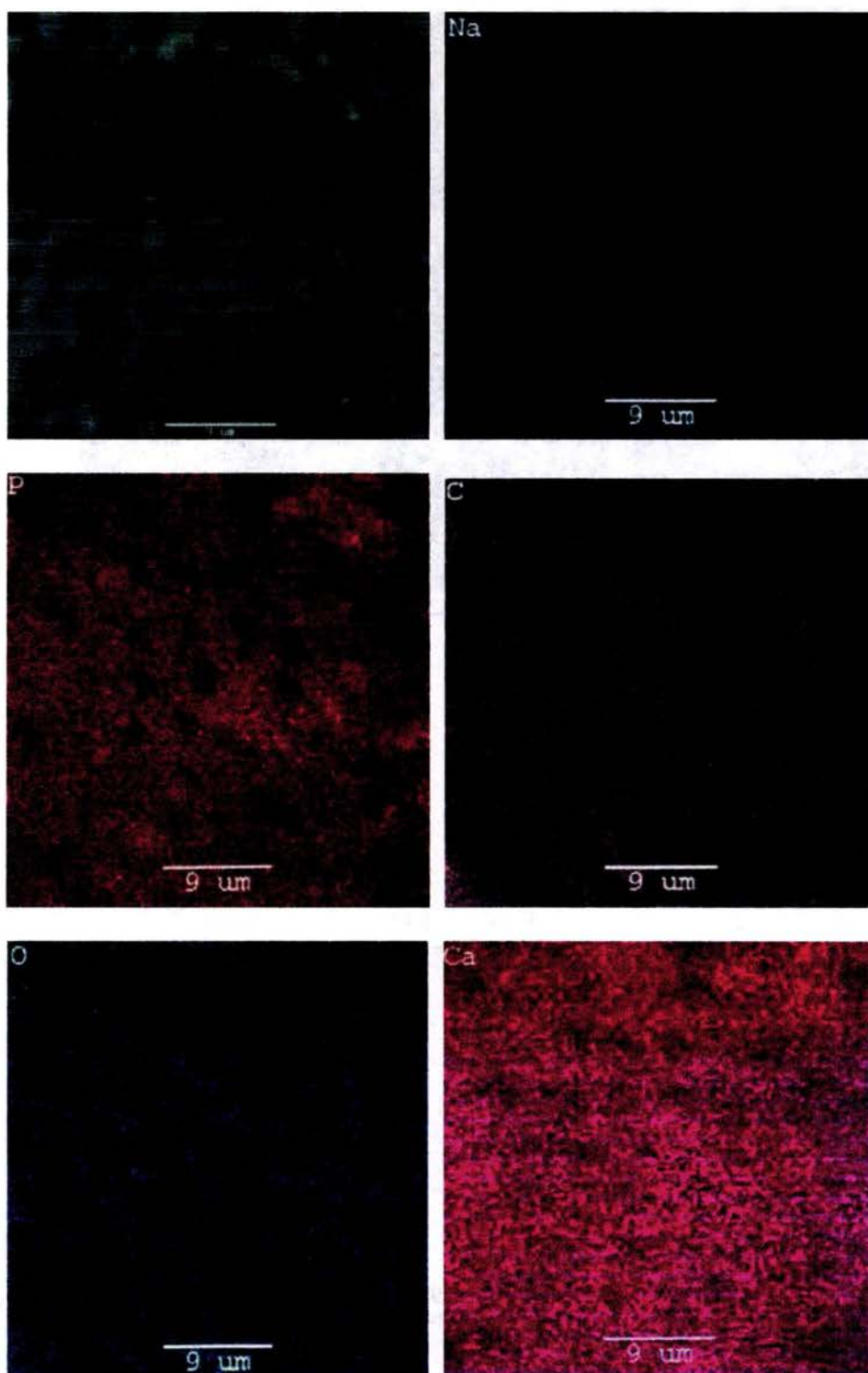


Figura 6.25 Imágenes de MEB en el modo de mapeo químico de dentina sana; presentando cada recuadro la distribución que de un elemento dentro del área analizada: Na, P, C, O, Ca.

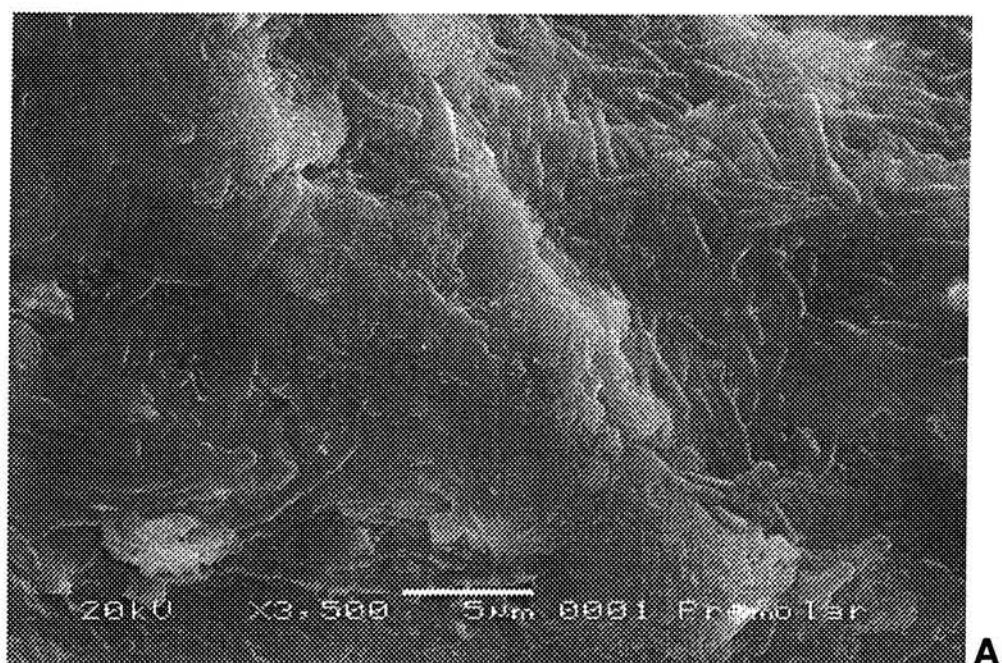
Elemento	Concentración promedio (% peso en seco)
Ca	26.9
P	13.2
CO ₃	4.6
Na	0.6
Mg	0.8
Cl	0.06
K	0.02

Tabla 6.1 Elementos presentes encontrados en dentina sana.

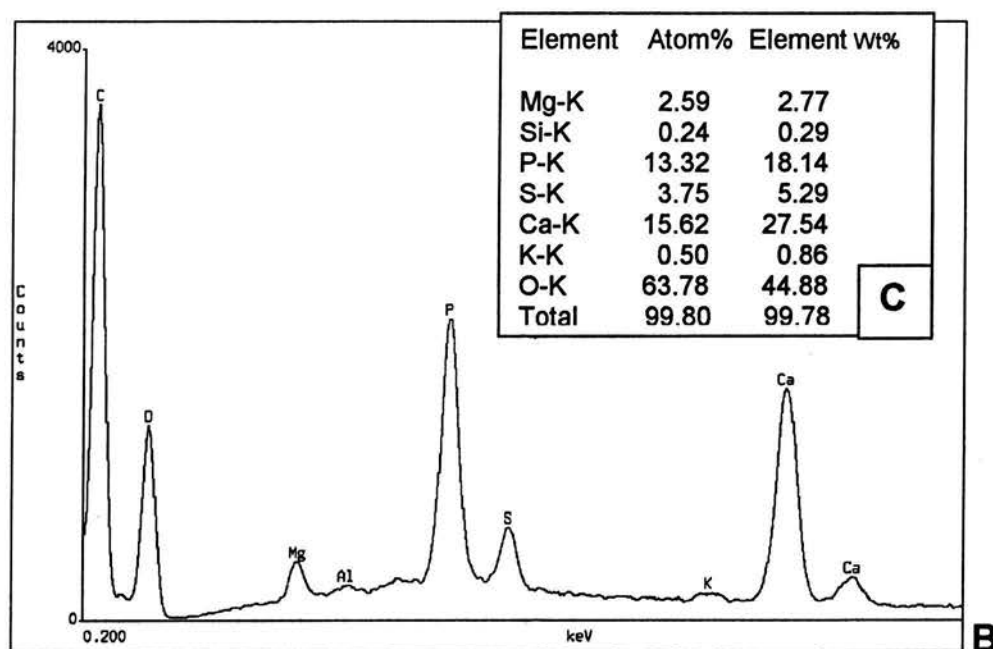
6.3.2 Bacterias

Ahora se verá el análisis químico de las bacterias. En la figura 6.28 se presenta una imagen de MEB principalmente de una zona poblada por bacterias, y realizando el análisis químico correspondiente. De nuevo se observan elementos Ca, P y O; también es posible ver la traza de los elementos Mg, K, Si y S. La presencia del azufre no era esperada. La alta concentración de S quizás sea un producto de metabolismo sobre todo del tipo sulfhídricos. La presencia de Si y Mg, se puede justificar como elementos residuales de la dentina. Algo importante de notar es la relación Ca/P la cuál nos da el valor de 1.17.

Sólo para asegurar que efectivamente los elementos mostrados en la figura 6.26 son los más comunes en la zona de las bacterias, se obtuvieron un par de espectros más, y efectivamente, en la figura 6.27 de nuevo se encuentra una alta concentración de S. Aquí la relación de Ca/P es de 1.6. Otros elementos encontrados en altas concentraciones son el C y O, así como la presencia de Na.



A



B

Figura 6.26 Imagen de MEB de bacilos presentes en dentina. B) Espectro del EDS en el cual se identifican los elementos presentes en (A). C) Tabla con la cuantificación en porcentaje de los elementos identificados en el espectro con una relación Ca/P de 1.17.

Recordando que el Na es un elemento característico de material orgánico. Con la idea de que los datos obtenidos por el EDS sea lo más representativo de los microorganismos, se realizó el análisis químico en forma puntual sobre una sola

bacteria (figura 6. 27, indicada con la flecha). De nuevo se obtuvo S, C, O y Na entre otros. La relación Ca/P fue de 1.6.

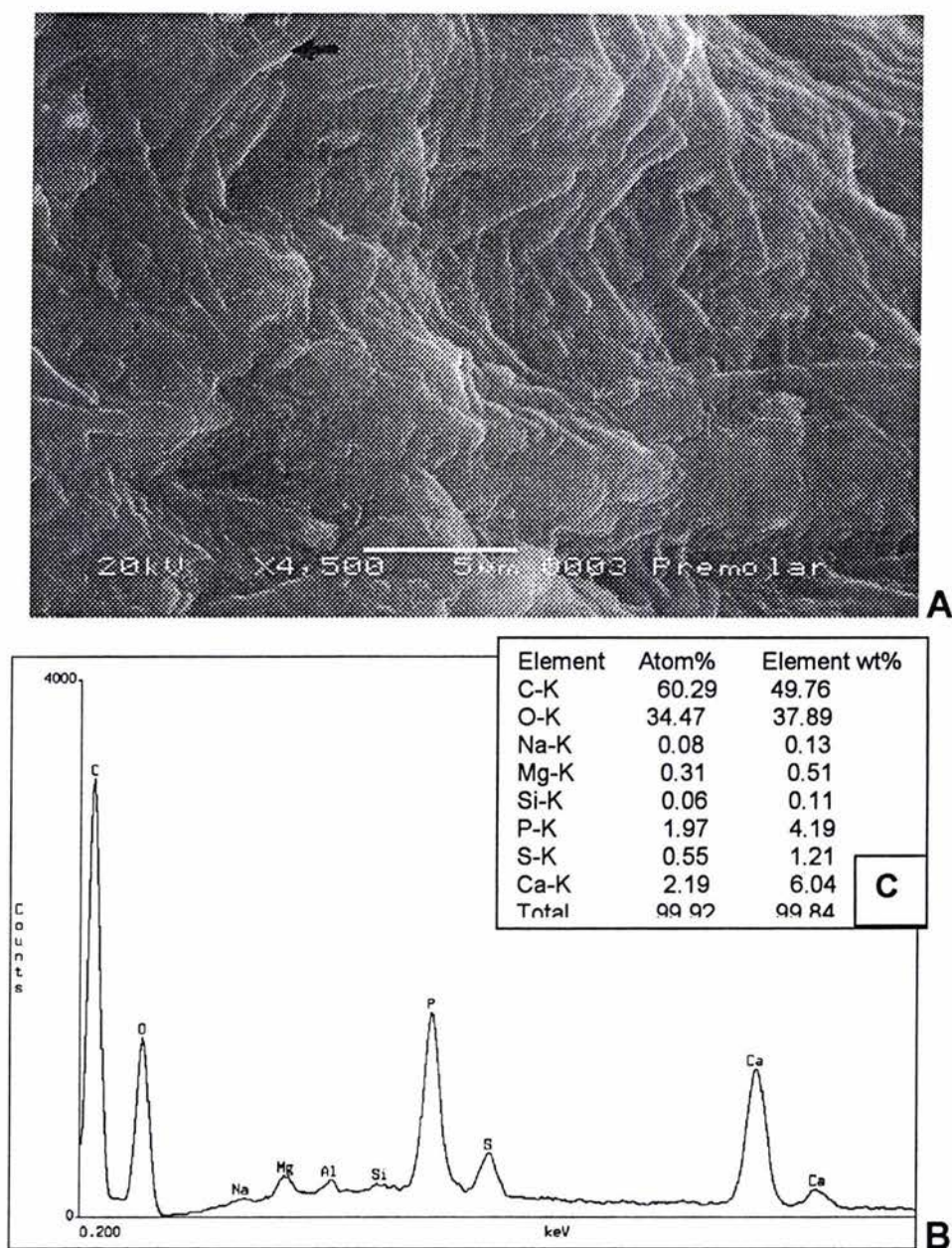


Figura 6.27 Imagen de MEB de bacterias realizando el EDS de manera puntual a una bacilo (indicado con la flecha). B) Espectro de EDS correspondiente. C) Tablas con la cuantificación de los elementos presentes en (A). La relación Ca/P es de 1.6.

A diferencia de lo anterior, en la figura 6.28 el análisis químico se hizo de nuevo sobre toda la imagen, la cual incluye ahora una gran cantidad de bacterias. En el espectro EDS una vez más se reflejo la presencia de azufre, quedando claro que el

azufre proviene de la presencia de la bacteria o de sus desechos. Así mismo tenemos los componentes propios de la hidroxiapatita que son Ca, P, Mg, O y también un poco de nitrógeno.

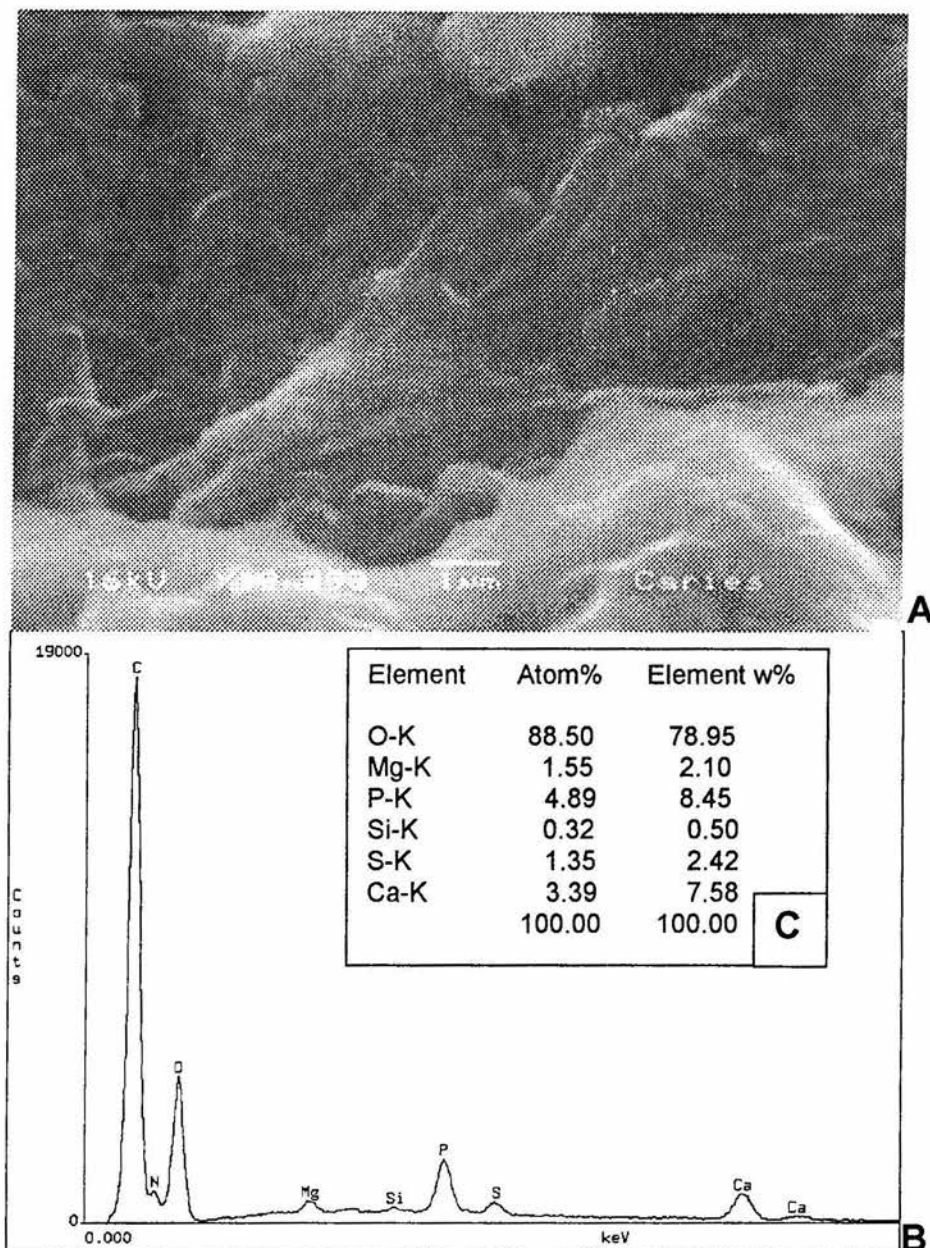


Figura 6.28 A) Imagen de MEB de bacterias en la cual se realizó el EDS. B) Espectro del EDS. C) Tablas con los elementos presentes en (A), así como los porcentajes, con una razón Ca/P de 0.61.

6.4 Diente pulido espejo

Para asegurar que los elementos que constituyen el esmalte y dentina son los que se han comentado, se procedió a pulir la muestra (de un diente cariado) por medios

6.4 Diente pulido espejo

Para asegurar que los elementos que constituyen el esmalte y dentina son los que se han comentado, se procedió a pulir la muestra (de un diente cariado) por medios metalográficos hasta obtener un pulido a espejo. La muestra fue analizada por ML, MEB, y por análisis químico EDS.

6.4.1 Microscopia de luz

En la figura 6.29 se observa un molar cortado en sentido sagital y transversal. Posteriormente la muestra se incluyó en resina acrílica de uso dental para tener un manejo óptimo en el momento de pulir.

El proceso de pulido permite una mayor apreciación de todos los detalles de la muestra. Se nota que este molar presenta un proceso carioso, donde se ha procedido a retirar el tejido dañado y posteriormente colocar una restauración de resina. Sin embargo, debajo de esta restauración se presenta de nuevo los signos de una caries dental recurrente o caries secundaria. En las lesiones de caries en la corona dental asocian al *Streptococcus mutans* y a bacilos gram positivos como lo es el *Lactobacillus* en dentina de acuerdo a los resultados obtenidos por Fontana et al. (61)

Las bacterias aparentemente pueden llegar a soportar las condiciones del grabado ácido y la preparación de cavidades quedando algunas implantadas en la dentina hasta por 5 años. Así y al momento de estar de nuevo en contacto con nutrientes y condiciones óptimas para desarrollarse, se inicia de nuevo una actividad metabólica, y con ello el proceso de disolución y degradación del material circundante: caries.

En la figura 6.29 B se observa la muestra en un corte en sentido transversal, notando la extensión del proceso de caries. Por lo tanto, se tiene un diente pulido a espejo en donde se puede analizar la extensión que alcanzado el proceso carioso.

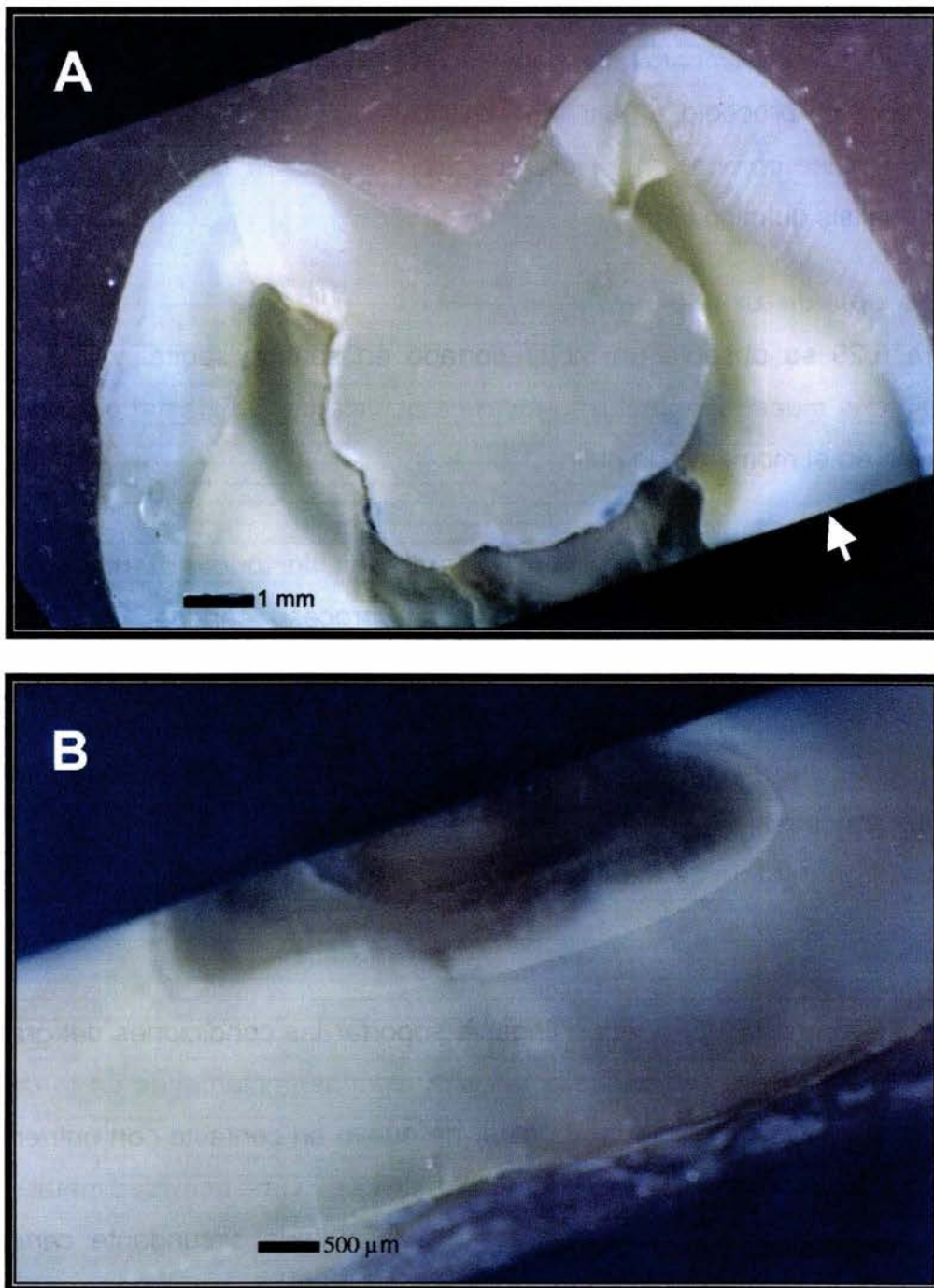


Figura 6. 29 Imágenes de ML de una muestra pulida a espejo. A) Caries recurrente presente bajo una restauración de resina. B) Corte transversal de la muestra, notándose la extensión del proceso carioso. En este caso, la imagen en (B) corresponde a la vista de (A) en la dirección indicada por la flecha.

6.4.2 Microscopia electrónica de barrido

La muestra presentada en las figuras 6.29 A y B se recubrió de una película de oro para poder analizarla en MEB. Así, en la figura 6.30 se notan fácilmente dos tipos de estructuras. En la figura 6.30 A se observan dos recuadros marcados con las letras B y C, las cuales corresponden a la zona ampliada de las figuras B y C respectivamente. Nótese que la figura 6.29 B corresponde a una zona cercana a la interfase dentina-resina, en el interior del diente, mientras que la figura 6.30 C se encuentra muy cercana la cámara pulpar.

Actualmente los materiales de restauración utilizados como o son la amalgama y la resina no logran una unión con el tejido dental presentándose un espacio en la interfase entre material y tejido. En la figura 6.30 B se observa lo que es la interfase resina-dentina. Esta imagen deja ver con qué facilidad puede darse la penetración de bacterias, fluidos bucales, y restos alimenticios a través de este espacio entre diente y material de restauración. Todo esto en conjunto da las condiciones ideales para inducir de nuevo un proceso carioso. Es evidente la presencia y disposición de túbulos dentinarios; algunos de estos túbulos se encuentran con un diámetro mayor a los 3 μm . No así en la figura 6.30 C en donde la densidad de túbulos es muy pobre. Esta imagen corresponde a una zona cercana a la pulpa dental (área de mucha actividad de defensa por parte de los odontoblastos). Por lo tanto esto corresponde a dentina terciaria ó dentina esclerótica.

La formación de dentina esclerótica es un manifiesto más de defensa del organismo ante una situación de caries. La dentina esclerótica, se caracteriza por la obliteración de los túbulos dentinarios limitando con esto el avance de la penetración tanto de bacterias así como de fluidos.

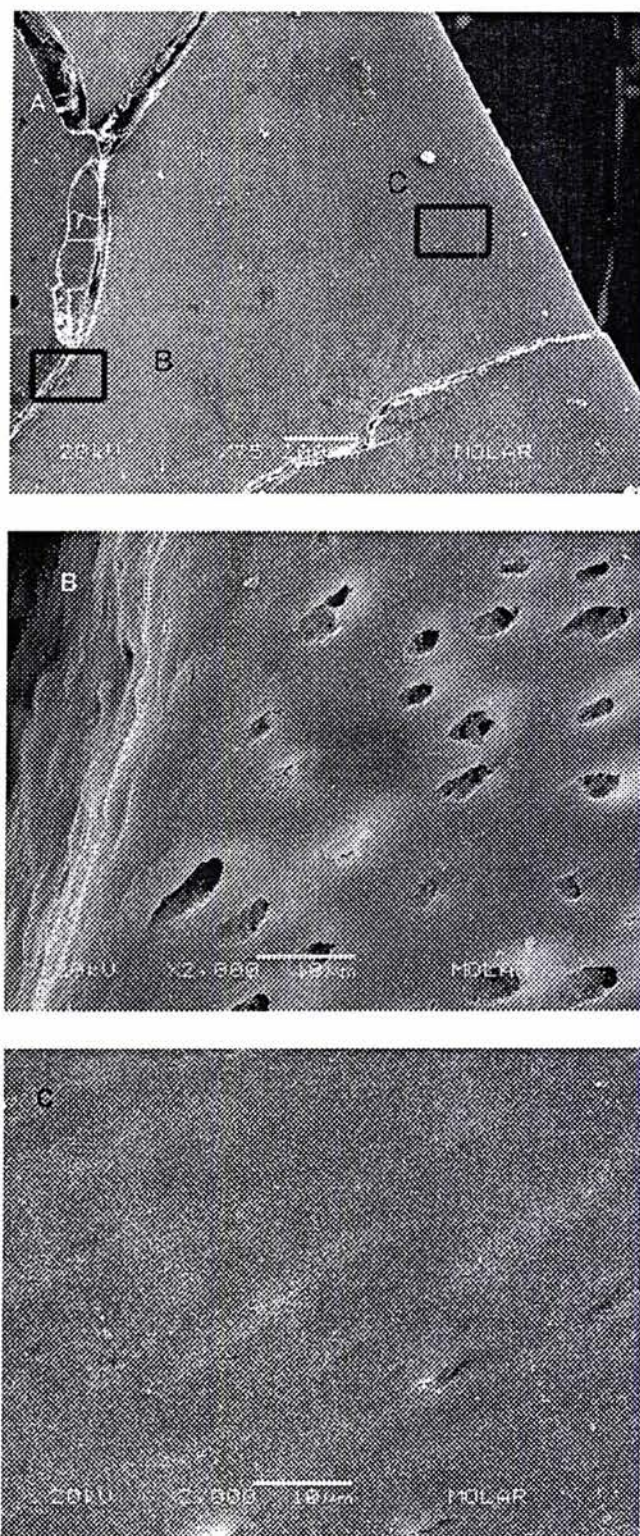


Figura 6.30 A) Imágenes de MEB de un tercer molar con caries mostrado en la figura VI.31 y donde se aprecia una restauración con resina. B) Interfase dentina- resina. C) Escasa presencia de túbulos dentinarios.

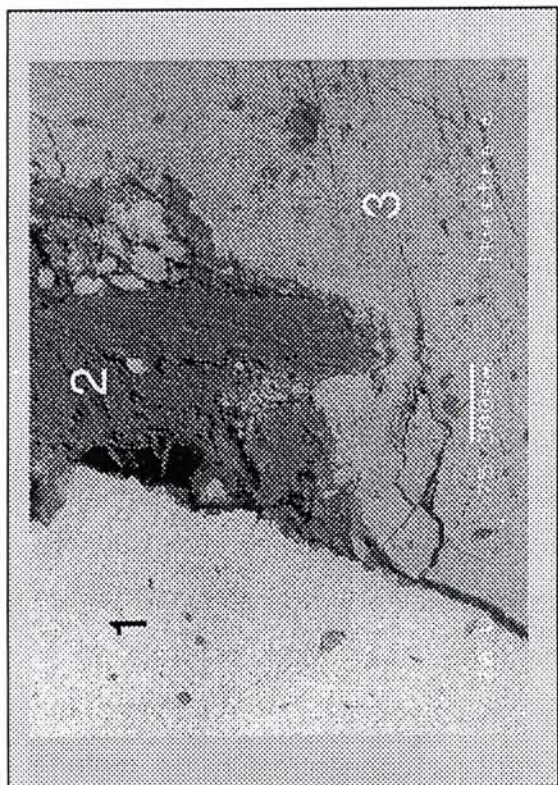
6.4.3 EDS

Para hacer una comparación entre la composición química del esmalte y la dentina cariados se realizó el análisis por EDS en diferentes zonas de la muestra correspondiente a la figura 6.29. Así se obtuvo el análisis químico mostrado en la figura 6.31, en cuya imagen de MEB es posible percatarnos de tres zonas muy bien definidas, y numeradas con: 1, 2 y 3.

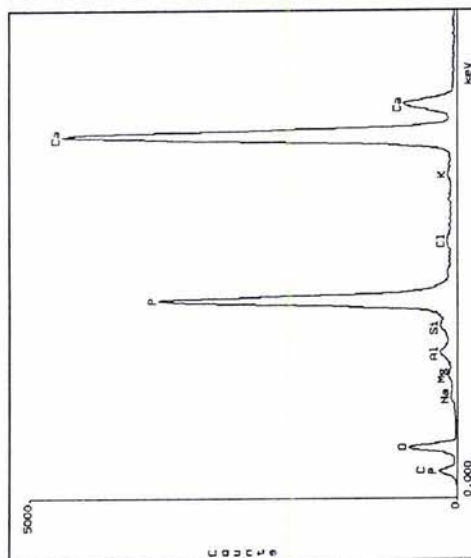
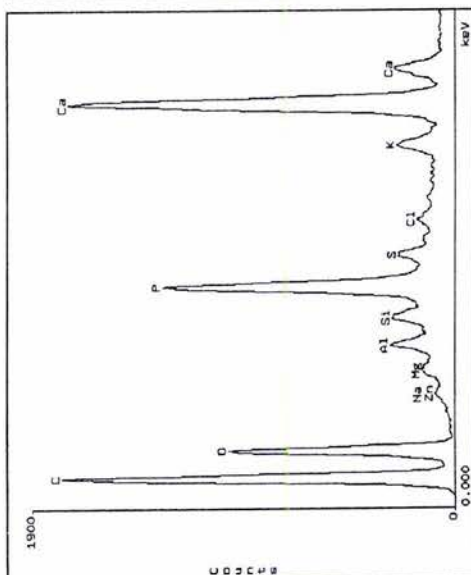
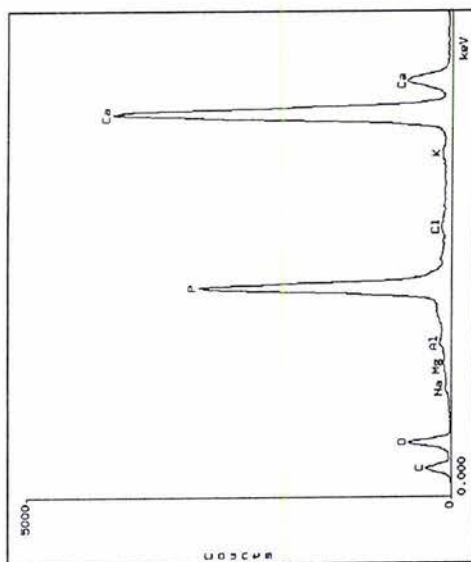
El 1 corresponde a la zona del esmalte, 2 y 3 corresponden a dentina; siendo el número 2 una zona que se caracteriza por la presencia de dentina reblandecida (material inorgánico y material orgánico propios de la dentina), y seguramente restos de alimentos así como microorganismos; a zona 3 es propiamente dentina dura, dentina que no está todavía totalmente descalcificada.

Los espectros de EDS obtenidos se muestran en las figuras 6.33 B marcadas con 1, 2, 3 respectivamente. El esmalte se compone, como era de esperarse de Ca, P, O, y tiene restos de Si y Cl que son elementos normales localizados en zona de esmalte. La relación Ca/P es de 1.93. En el espectro 2 correspondiente, a la zona de dentina reblandecida. Igualmente se nota la presencia de elementos propios de la hidroxiapatita Ca, P y O, pero también indica una alta concentración de carbono, hay S, K, Na, elementos que indican efectivamente una concentración de material orgánico y bacteriano.

En el espectro 3, correspondiente a la zona de dentina dura, aquí se tiene la presencia de Ca P y O así como otros elementos en menor proporción. Aquí la cantidad de C se ve notablemente disminuida, asimismo el K y Na, como era de esperarse. El S es un elemento que no realmente no se localiza en esmalte ni en dentina lo que nos indicaría que son producto del proceso bacteriano, como se concluyó anteriormente; las altas concentraciones de cloro son debido al contenido de cloruro de sodio en el medio de cultivo.



A



B

1			2			3		
Element	Atom %	Element Wt%	Element	Atom %	Element Wt %	Element	Atom %	Element Wt%
C-K	18.25	9.85	Na-K	0.45	0.43	Na-K	0.23	0.21
O-K	47.96	34.47	Zn-K	0.29	0.79	Mg-K	0.13	0.13
Na-K	0.28	0.28	Mg-K	1.07	1.08	P-K	13.37	16.99
Mg-K	0.15	0.16	Si-K	1.21	1.41	Cl-K	0.27	0.39
Si-K	0.11	0.14	P-K	11.00	14.17	K-K	0.15	0.24
P-K	11.16	15.53	S-K	1.26	1.68	Ca-K	25.95	42.67
Cl-K	0.20	0.31	Cl-K	0.52	0.76	O-K	59.82	39.72
K-K	0.11	0.20	K-K	1.82	2.95			
Ca-K	21.51	38.73	Ca-K	21.24	35.39			
			O-K	59.66	39.68			
Total	99.73	99.67		98.51	98.73		99.92	99.91
Ca/P	1.94			1.93			1.94	

Figura 33. A) Imagen de MEB observándose esmalte (1), dentina reblandecida (2) y dentina dura (3) a cada uno se les realizó un EDS puntual. B) Espectros de EDS con los que se identificaron los elementos presentes en las áreas seleccionadas. C) Cuantificación de cada uno de los espectros, encontrando una relación Ca/ P de: 1.92, 1.93 y 1.94 respectivamente.

6.5 Cultivos

6.5.1 Microscopía de Luz

Hasta aquí se ha realizado el análisis morfológico y químico del proceso carioso. Ahora para poder identificar la presencia de bacterias, se hicieron una serie de cultivos bacterianos. Estos cultivos fueron analizados por ML, MEB y EDS principalmente, para saber las características que se presentan en cada caso.

Se utilizaron dos medios de cultivos par obtener el crecimiento de bacterias, y un medio de cultivo de orientación. Dependiendo el tipo de microorganismo es el color de la colonia. Se observó un crecimiento positivo de *Streptococcus sp*, *Streptococcus mutans*, y *Staphylococcus aureus*. Con el fin de ver la forma de estos microorganismos se realizaron frotis con tinción de gram, tal y como se ve en la

figura 6.32 que muestra imágenes de ML en el modo de transmisión a diferentes ampliificaciones.

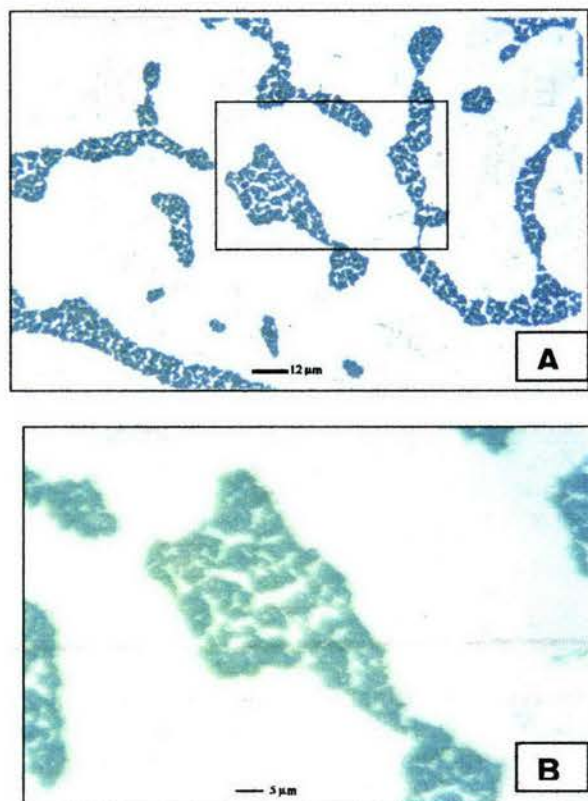


Figura 6. 32 Imágenes de ML de frotis teñidos con tinción de Gram. A) Concentraciones de bacterias en racimos característico de *Streptococcus* sp. En el recuadro en (A) indica la zona observada a mayor ampliificación en (B).

De cierta manera no se pueden identificar como en imágenes anteriores en las que se define muy bien su morfología. Así que para un mejor análisis de estos frotis se procedió a recubrirlos con una película de carbón para poder analizarlos por MEB.

6.5.2 Microscopía Electrónica de Barrido

Una vez recubierto los frotis fue posible ver por MEB el agrupamiento de cocos notando una morfología más definida así como el tamaño que presentan siendo este de aproximadamente 2 a 3 μm (figura 6.33).

6.5.2 Microscopía Electrónica de Barrido

Una vez recubierto los frotis fue posible ver por MEB el agrupamiento de cocos notando una morfología más definida así como el tamaño que presentan siendo este de aproximadamente 2 a 3 μm (figura 6.33).

Una imagen con mayor detalle de estas bacterias se presenta en la figura 6.34. Estos son cocos y fueron obtenidos directamente de las colonias de los cultivos. Reafirmando la identificación de su morfología, la cual no varía mucho de las bacterias de los microorganismos obtenidos de un crecimiento en cultivo puro a un crecimiento en su medio ambiente. Es posible notar en la figura 6.34 C que algunos de estos cocos están en proceso de división: se ve una franja que delimita a cada uno. También se observa que estos cocos se encuentran como recubiertos por una sustancia que da un aspecto gelatinoso. La pared de las bacterias está constituida principalmente de lipoproteínas y péptidoglicanos, una unidad pentamérica de azúcares con glucosaminoglicanos generalmente ácido hialurónico o derivados de eritrosamina.

6.5.3 EDS

Para tratar de identificar los componentes químicos de estos cocos en condiciones puras, se procedió a realizar una serie de análisis químicos en los cuales se reflejan grandes cantidades de cloro principalmente (figura 6.35). Otros elementos son C, O y Na los cuales se esperaban debido a que son elementos característicos de material orgánico. Algo que se esperaba encontrar era la presencia de S, lo cual no se dio, recordando que este elemento sí se encontró en todos los análisis químicos en los cuales estaban involucrados los bacilos. Este resultado es quizás por la naturaleza del tipo de bacterias que encontró. Se puede decir que este tipo de bacterias no es la que está presente en este estudio, sino que en nuestro caso tenemos una bacteria donde sí se observa la presencia de S. Por morfología y en cuanto a la zona

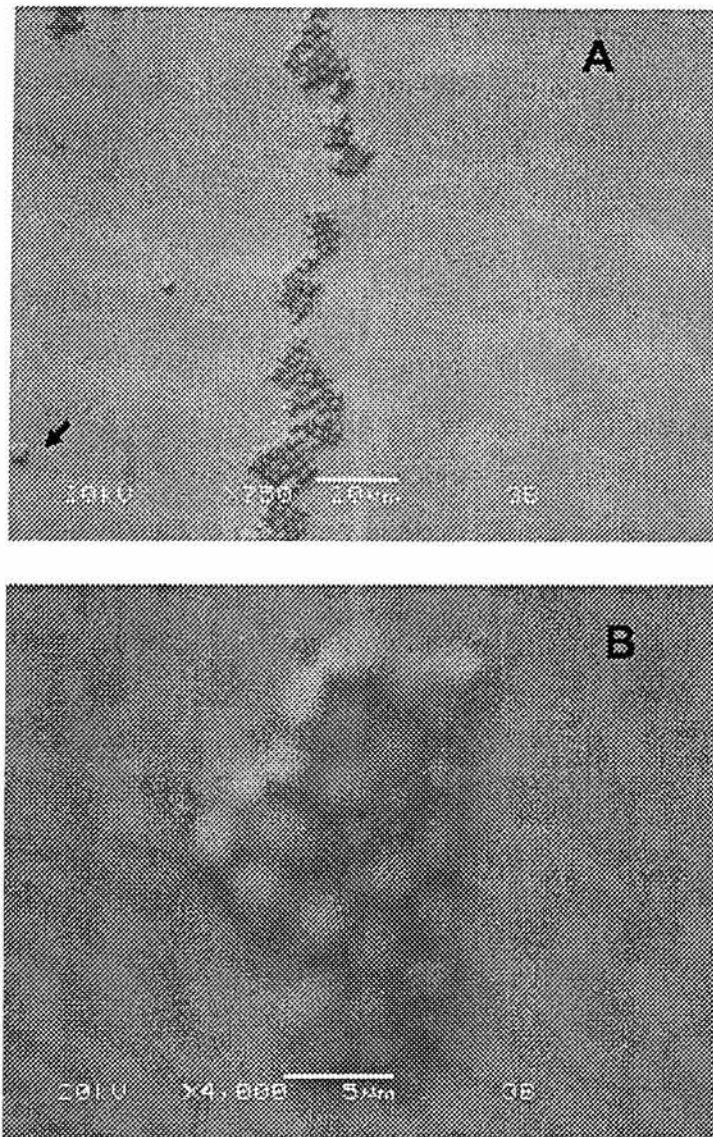


Figura 6.33 Imágenes de MEB de *Staphylococcus aureus*. A) Agrupamientos en racimos y algunos cocos aislados o triadas (señalado con flechas). B) Nótese el tamaño de los bacterias.

analizada dentro del diente corresponde a un *Lactobacillo*. Sin embargo como se ve en la figura 3.3 en el capítulo de caries, los cocos al estar presentes en el medio bucal si están asociados al proceso de caries, pero principalmente en áreas superficiales del diente.

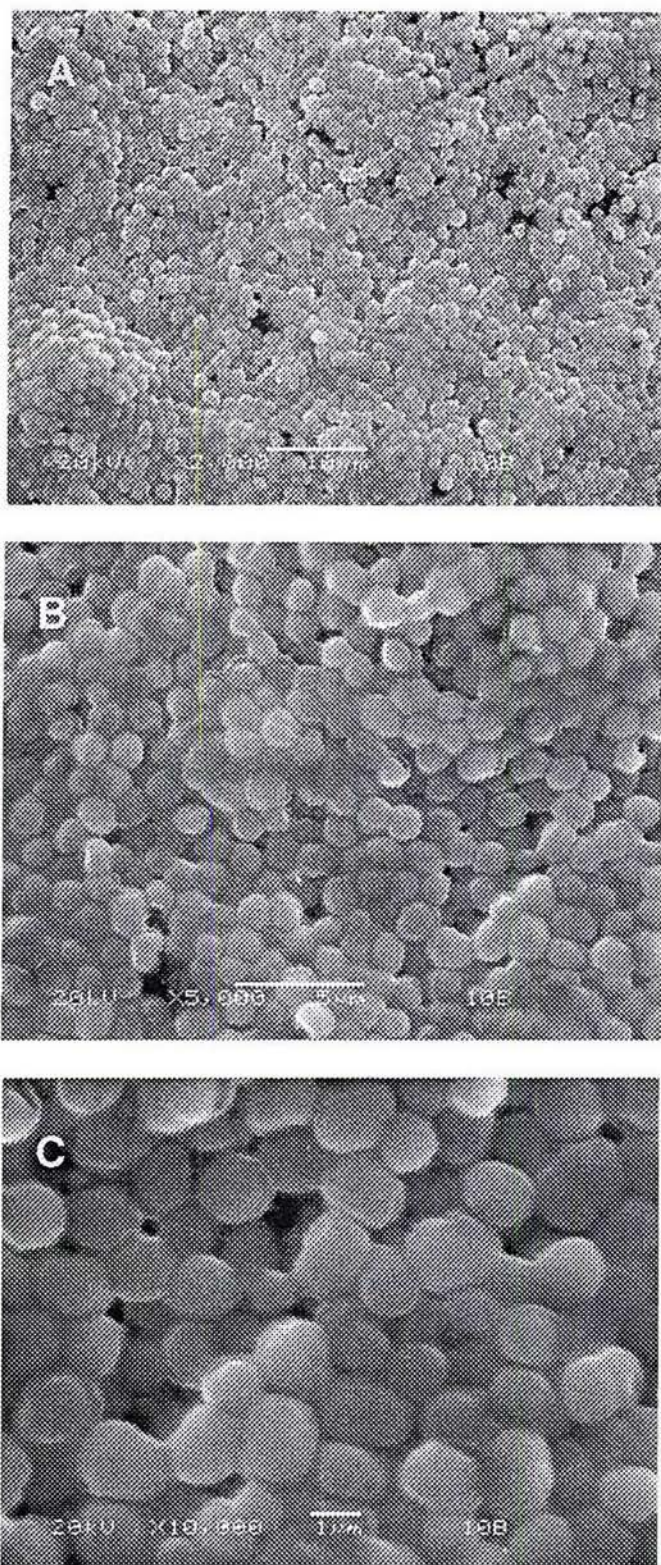


Figura 6.34 Imágenes de MEB de cultivos bacterianos. A y B) Colonias de *Streptococcus* sp. C) Nótese el tamaño de las bacterias, en promedio es de 1 a 2 μm .

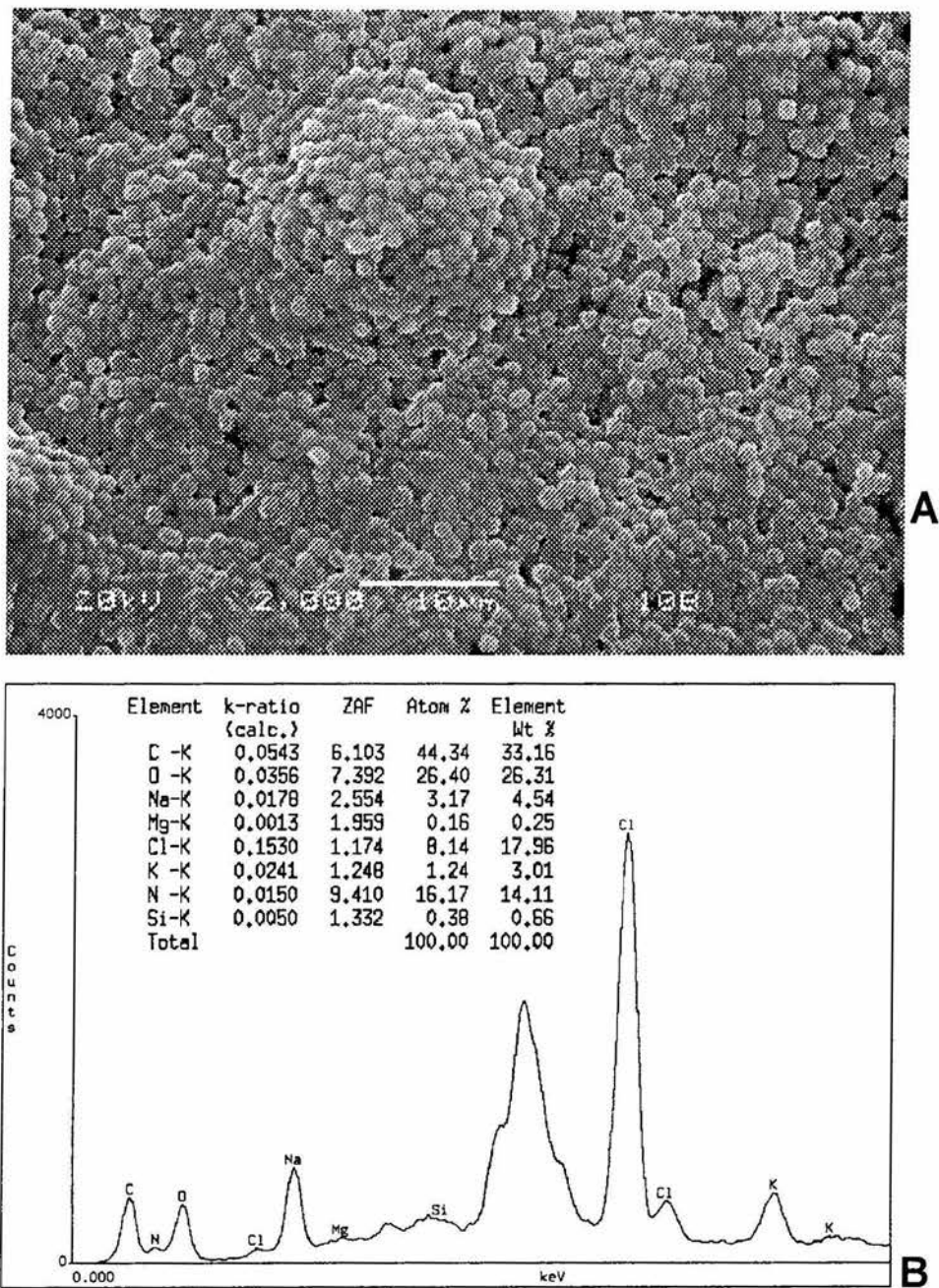


Figura 6. 35 A) Imagen de MEB de una colonia de *Streptococcus sp.* del cual se obtuvo EDS de toda el área de la imagen. B) Espectro identificando los elementos presentes en (A). El pico observado a un lado del cloro corresponde a oro, proviene del recubrimiento que se le dio a la muestra. C) Tablas con los elementos y compuestos presentes así como la cuantificación de cada uno.

7. DISCUSIÓN

Los resultados permiten conocer más sobre la caries dental y dan pauta a una mejor comprensión del tema. Se analizaron los cambios estructurales que se presentaron tanto en esmalte como en dentina, a medida que va avanzando el proceso carioso dándonos una visión de la evolución de los cambios morfológicos que sufren los tejidos dentales bajo sus efectos. De la misma manera se confirmó la presencia de bacterias cuya morfología asemeja mucho a estructuras con forma de bacilos asociados a procesos de caries muy avanzados en dentina y con ayuda de los microanálisis se supo la composición química que tienen las mismas.

7.1 Esmalte

La mancha blanca considerada como el inicio del proceso de disolución de la estructura del esmalte, fue analizada. Se encontró en la superficie del esmalte la presencia de algunos poros o fositas con una superficie irregular. Se encontraron también unas líneas o ralladuras las cuales se consideran efecto del proceso de masticación.

Debemos de comentar un resultado muy interesante observado por la Dra. Pilar Gutiérrez, en un estudio del esmalte en pacientes con alto y bajo riesgo a la caries.⁽⁶⁾ Ella encontró que los sujetos de bajo riesgo presentan una superficie normal o lisa del esmalte, mientras que los sujetos de alto riesgo presentan una superficie porosa del esmalte, tal y como presentamos en este trabajo, aunque en este caso sólo se observó esta superficie irregular dentro del área correspondiente a la mancha blanca.⁽⁶⁾

Hallazgos similares son reportados por Miani, al observar por microscopía electrónica de barrido lesiones tempranas de caries dental. Estas lesiones se caracterizan por la presencia de gran cantidad de poros en las capas más superficiales del esmalte, las cuales tienen un tamaño promedio de 0.5-2

micrómetros. ⁽²⁴⁾ La superficie de los dientes analizados en este trabajo de tesis presentaron las características presentadas por los dientes de individuos de un alto riesgo de caries.

Se demostró con ayuda de técnicas de MEB que el primer cambio observado en el esmalte con lesión cariosa incipiente fue la pérdida de sustancia en los núcleos de los prismas como resultado de un tipo de ataque ácido,⁽²⁹⁾ llegando a notar algunas estructuras que corresponden a los cristales de hidroxiapatita, dando un aspecto rugoso a la superficie del esmalte. Tal y como también fue comentado por Gutiérrez et al. y Miani en su trabajo reportado para el caso de individuos con alto riesgo de caries. ^(6, 24)

En estas condiciones de inicio del proceso carioso, algunos investigadores sugieren que se da un proceso de remineralización. Esto dado por un intercambio con componentes iónicos presentes en saliva, el cual se puede ver afectado por la presencia de material orgánico en la superficie dental. ⁽²⁵⁾ Dentro del mismo esmalte fuimos observando cómo es el trayecto de los prismas en condiciones normales, y cómo esto se va perdiendo debido al proceso carioso, rompiendo la disposición característica de los prismas hasta que no es posible definirlos bien.

Establecer una composición química del esmalte es algo complicado debido a la variación que presenta éste dentro de toda su estructura, así como de la presencia de elementos traza. En los elementos encontrados están los componentes de la hidroxiapatita, Ca, P, O, así como los elementos minoritarios localizados en esmalte cariado fueron Mg, Si y Cl con una relación de Ca/P de 1.93. En estudios previos realizados por Lee se realizaron análisis químicos en zonas de manchas blancas y en dientes grabados se reportó que la relación de Ca/P no presentó diferencias significativas entre ellas, siendo en promedio de 1.7.⁽²⁵⁾ Sin embargo, resultados ampliamente reportados en la literatura del esmalte sano indican que la relación Ca/P generalmente varía entre 1.5 y 2.⁽⁵⁹⁾ El resultado de la relación Ca/P

de 1.93 indica una estructura que ha perdido P o ha ganado Ca. En cualquiera de los casos, se trata de una estructura con un alto contenido de calcio.

7.2 Dentina

La dentina presenta una reacción más activa que el esmalte debido a las prolongaciones odontoblásticas, las cuales ayudan a las bacterias a defenderse, a sobrevivir, y a propagarse rápidamente. En cuanto a la dentina los cambios estructurales que se observaron en este tejido fueron la total degradación del tejido mineralizado.

La dentina, como método de defensa, reacciona formando dentina esclerótica. Esta es como una obliteración de los túbulos dentinarios para evitar el avance del proceso carioso. Otra forma de defenderse el diente es formando dentina terciaria. Esta se caracteriza por la formación de dentina con poca presencia de túbulos dentinarios dispuestos de manera desordenada, sin una orientación definida, algo que pudimos observar en las imágenes obtenidas en este trabajo, dejando una superficie irregular.

La presencia de dentina de reparación también se hace en forma de depósitos globulares, así como la completa desaparición de los túbulos dentinarios en algunas zonas (figura 6.15 D y 6.16 B y C). Imágenes similares fueron reportadas por Pantelidou y Lyrroudia.⁽⁵⁵⁾

Observamos que la dentina peritubular se pierde totalmente en algunas zonas y en otras se encuentra disminuida, lo cual va dejando unos túbulos ensanchados con diámetro que llega en algunos casos a medir hasta los 10 μm . Algo similar fue reportado por Shimizu et al. en un estudio sobre los cambios que se dan en dentina cariada.⁽⁵⁴⁾

La composición química de la dentina sano, analizada por EDS, indicó la presencia de los elementos que conforman la hidroxiapatita, que son Ca, P, O. Además se registró la presencia de elementos traza, que en este caso fueron Mg, C, Na, K y Si. El contenido de C y Na fué mayor al registrados en el esmalte. Esto como una consecuencia directa del mayor porcentaje que se tiene de material orgánico en el caso de la dentina. La relación Ca/P para la dentina fue de 1.54, indicándonos una mayor concentración de P que de Ca, contrario a lo obtenido para la razón Ca/P en el esmalte donde fue de 1.93.

Análisis químicos realizados por Angker en dentina sana y cariada, reportan una dramática reducción de contenido mineral en zonas de caries, coincidiendo con reportes previos realizados por Kinney et al.^(55, 61) Así, el observado en este trabajo de tesis indica que la capa superficial de la dentina cariada se encuentra en un completo estado de mineralización. En el espectro del EDS de la figura VI.31 efectivamente encontramos una reducción en la cantidad de Ca y P en la zona 2 correspondiente a dentina reblandecida, lo que refiere Angker como capa superficial de la dentina.⁽⁵⁵⁾ Angker y Kinney le llaman "capa de dentina interna" a lo que en este estudio se consideró como la zona 3 (dentina no reblandecida), en la cual los índices de mineralización no presentan una gran variante a los encontrados en condiciones sana. Sería conveniente hacer énfasis en este punto, debido a que el objetivo de la odontología restauradora es ser lo menos extensiva, conservando la mayor parte de tejido dental evitando debilitar al diente en el momento de hacer preparaciones cavitarias.

7.3 Bacterias

La presencia de microorganismos asociados al proceso carioso fue algo confirmado en nuestro estudio. Estos se anidaban en la zona donde la pérdida de la estructura de los túbulos dentinarios era notoria (dentina reblandecida), evidenciando el sitio exacto de invasión y actividad bacteriana. Por lo tanto, este tejido dentinario "reblandecido" debe ser eliminado en su totalidad en el momento

de hacer el odontólogo la preparación de cavidades para la colocación de un material restaurador. Hay que tomar en cuenta que bajo una restauración dental, en un ambiente pobre de oxígeno y sin el contacto con nutrientes, algunas bacterias tienen la capacidad de sobrevivir hasta por 5 años, ya que las bacterias entran en un estado latente, y en el momento de ponerse en contacto de nuevo con esos nutrientes, oxígeno, humedad, pH, y temperatura (provocado por una mala restauración dental) inician de nuevo con actividad metabólica y su consecuente reproducción.

Algo muy importante revelado por los análisis químicos en la zona de invasión bacteriana, y en las bacterias mismas, fue la presencia de azufre. Nosotros consideramos, en base a la literatura, que este es un elemento necesario para actividades metabólicas de la bacteria, pudiendo tomarlo del mismo medio bucal, ya que este no es un elemento característico del diente. Tratando de identificar los tipos de bacterias involucradas en nuestras muestras estudiadas realizamos una toma de muestras en las que se aislaron principalmente *Streptococcus sp.*, como era de esperarse, ya que es el principal grupo de bacterias a las cuales se les asocia con la caries.^(37, 47)

A partir de la forma que presenta la bacteria (la cual muestra una estructura casi rectangular), y a lo reportado en la literatura en la cual se asocia a los *Lactobacillus* en las muestras de dentina cariada como el microorganismo predominante en el frente de avance de la lesión,⁽²²⁾ podemos inferir que las bacterias encontradas en nuestro estudio posiblemente pertenezca a familia de los Lactobacilos. La anatomía de una bacteria, como podemos ver en las imágenes VII. 1 A y B incluye su tamaño y forma, son características estructurales que las hace distintivas entre ellas. Siendo los "bastones" la forma que adquieren los microorganismos a los cuales se les denominan bacilos, éstos llegan a medir desde 0.5 μm hasta los 20 μm , encontrándose en forma individual o formando cadenas, tal y como se representa muy bien en la figura 7.1 A, al comparar este esquema con los

microorganismos es evidente la similitud en morfología de éstos (figura 7.1B). por lo tanto, concluimos que los bacilos observados en este trabajo de tesis pertenecen a la familia de los lactobacilos.

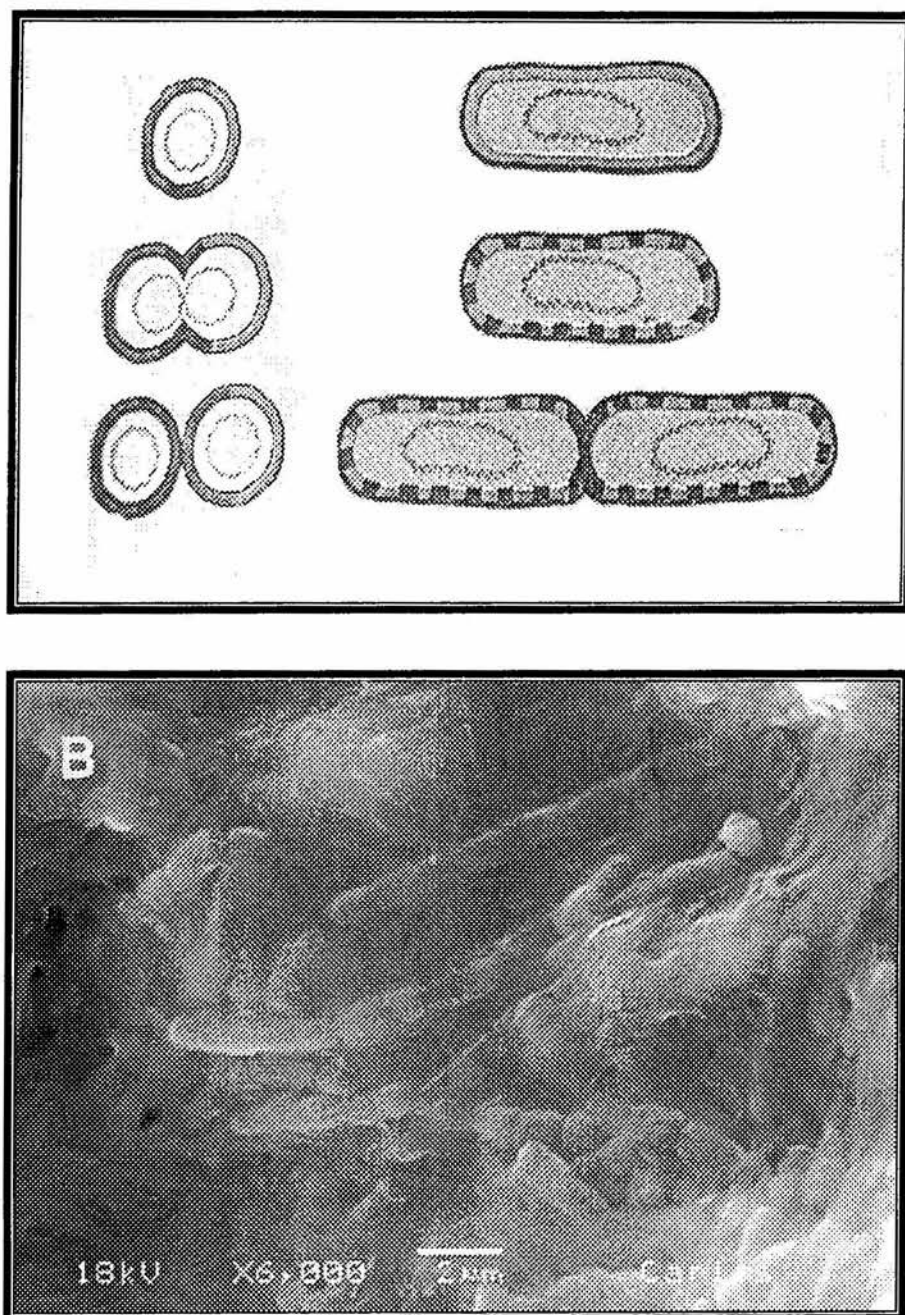


Figura 7.1A) Esquema de la morfología de bacterias que pertenecen al grupo de los cocos, y bacilos. B) Imagen de MEB de dentina cariada, mostrando bacterias con forma muy similar a los bacilos representados en (A).

7.4 Cultivos

Con el fin de poder determinar la variedad de microorganismos presentes en un proceso de caries, se realizaron unos cultivos bacterianos con muestras tomadas de la cavidad en la zona de caries. Estos resultados fueron algo esperados, ya que efectivamente encontramos la presencia de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sp.* tal como se refiere en la literatura en investigaciones sobre microorganismos cariogénicos ^(21, 34, 35, 36) así también se encontró en un paciente *Staphylococcus aureus*.

La razón por la cual no se obtuvieron cultivos de lactobacilos así como de otras especies asociadas a la caries, se debió a la poca profundidad de donde se extrajo la muestra en los dientes de los pacientes así como a los medios de cultivos que se utilizaron; algunos medios de cultivos son específicos para el crecimiento de ciertos microorganismos. Los medios de cultivos utilizados en esta investigación nos permitieron (de estar presente en la cavidad y en la zona de toma de muestra) un crecimiento de estreptococos, estafilococos, pseudomonas, hongos. Microorganismos como lo son del género de *Lactobacillus sp.*, y *Actinomyces sp.* requieren de condiciones muy específicas de laboratorio (medio de cultivo, ausencia de oxígeno). Debido a que el laboratorio de Histopatología no cuenta con el equipo necesario para mantener las condiciones requeridas para el crecimiento de estos microorganismos, no fue posible llevar a cabo esta parte del estudio. Pero es importante tomarlo en consideración para futuras investigaciones. En nuestro trabajo, los dientes analizados se encontraban fuera de la cavidad bucal (recién extraídos) lo que permitió hacer los cortes respectivos para el análisis de la zona de interés, teniendo así, acceso a zonas más profundas de la dentina; zonas en las cuales se encuentran bacterias del tipo lactobacilos entre otros microorganismos.

En algunas colonias de estreptococos y estafilococos se hicieron análisis químicos esperando encontrar en éste presencia de S, lo cual no se dio. Lo que si se

encontró en grandes cantidades fue Cl. Además de cloro, encontramos C, Mg y N, estos últimos eran esperados por ser componentes de material orgánico. En dentina cariada fue común la presencia de C, K, Mg, N, S y Cl, como elementos minoritarios, los cuales se asociaron a la presencia de los microorganismos, la presencia de cloro está asociada a la composición del medio de cultivo. ⁽⁴³⁾

8. CONCLUSIONES

1. Se encontró la presencia de bacterias anidadas en tejido dentinario cariado y a partir de su morfología (rectangular) se identificaron como bacilos (posiblemente *Lactobacillus sp.*), y por medio de cultivos bacterianos, se logró aislar otro tipo de bacterias presentes en procesos cariosos como lo son *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sp.* y *Staphylococcus aureus*. Estos microorganismos se encuentran en la cavidad bucal como constituyentes de la flora bacteriana pero a niveles mas bajos según estudios de Shu y col.⁽³⁷⁾
2. La información obtenida por análisis químicos en la zona cariada nos indica la presencia de elementos característicos de la hidroxiapatita y también de azufre, el cual fue asociado a las bacterias. La presencia de elementos traza Mg, Si, K y C se debe a la cantidad de material orgánico y bacterias en la zona. En esmalte y dentina cariados encontramos una relación Ca/P de 1.93 y 1.94 respectivamente, lo cual nos habla de una estructura con un alto contenido de calcio al compararla con la relación Ca/P de la hidroxiapatita que es de 1.67.
3. Las estructuras del esmalte sano y del esmalte con caries se diferencian, por la presencia en este último de cavidades en su superficie con diámetros promedio de 3 a 5 μm , lo cual refleja zonas afectada por un ambiente ácido.
4. Las estructuras de la dentina cariada se caracterizó por la dilatación de los túbulos dentinarios como efecto de los ácidos bacterianos, así como la eliminación en un gran porcentaje de la dentina intertubular. La pérdida de dentina intertubular y ensanchamiento de los túbulos dentinarios se deben considerar al momento de restaurar el diente y en la selección del material óptimo para ésta, debiendo valorar si éste tejido soportará las fuerzas de impacto y masticatorias que se producirán.

REFERENCIAS

1. Fejerskov O. Concepts of dental caries their consequences for understanding the disease. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1997; 25:5-12.
2. Irigoyen-Camacho, Maria E. y col. Caries dental en escolares del Distrito Federal. *Salud Pública de México.* 1997; 39:133-136.
3. Irigoyen-Camacho, Maria E. y col. Cambios en los índices de caries dental en escolares de una zona de Xochimilco, México: 1984-1992. *Salud Pública de México.* 1995; 37:430-436.
4. Shafer, W. G, Hine MK, A Textbook or Oral Pathology. Ed. Saunders Co. Philadelphia. 1983.
5. William, R. A. D., Ellio, J. C. Bioquímica dental básica y aplicada: "composición química y química de los dientes y su medio". Ed. Manual Moderno. 1990.
6. Gutiérrez, Maria del Pilar. Estudio Comparativo de la Estructura, Composición Química y Propiedades Mecánicas del Esmalte Dental en Sujetos de Alto Riesgo y Sujetos Libres de Caries. (Tesis Doctoral). UNAM. 2002.
7. Tean Cate, Arnold Richard. Histología Oral. Desarrollo, estructura y función. Ed. Panamericana. México. 1986.

8. Avery, James K. Oral Development and Histology. Segunda edición. Ed. Thieme. EEUU. 1994.
9. Menaker, Lewis. et al. Bases biológicas de la caries dental. Ed. Salvat. Barcelona. 1986.
10. Kidd, Edwing A. et al. Essential of Dental Caries. Ed. Oxford. 1997.
11. klass de Groot, P. Biocerámicas de Fosfato de Ca. CRC Press. Boca Ratón, Florida. 1983.
12. Gómez De Ferraris, Maria Elsa y col. Histología y Embriología Bucodental. Ed. Panamericana. 2001.
13. Lazzari, Eugene P. Bioquímica Dental. Ed. Interamericana. México. 1970
14. Rodríguez Hernández, Ana Guadalupe. "Estudio estructural de la dentina por medio de microscopía fotónica, microscopía electrónica y difracción de rayos X". (Tesis Licenciatura). UNAM. 2002.
15. Title, Keith et al. The Morphology of the demineralized layer in primer dentón. American Journal of Dentistry. 1994. 7(1):22-27.
16. W. L., Davis. Histología y Embriología Bucal. Ed. Interamericana-Mc GrawHill. México. 1986.
17. Weiner, Steve et al. Peritubular Dentin Formation: Crystal Organization and the Macromolecular constituents in Human Teeth. Journal of Structural Biology. 1999. 126: 27-41.

18. Houllé, P. et al. High Resolution Electron Microscopy: Structure and Growth Mechanisms of Human Dentin Crystals. *J. Dental Research*. 1997. 76(3): 895-904.
19. Linde, Anders. Dentinogenesis. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*. 1993. 4(5):679-728.
20. Mjör, A. Ivar., et al. Pulp-dentin Biology in restorative Dentistry. Part 1: Normal Structure and Physiology. *Quintessence*. 2001; 32(6):427-441.
21. Johnsen, E., Parks, H. F. electron Microscopic Observations on Sound Human Dentine. *Arch. Oral Biology*. 1962; (7):85-193.
22. L. Griffen, Ann. Dental Caries. An infectious and transmissible Disease. *Pediatric Clinic of North America*. 2000; 47(5).
23. Albrektsson O., Tomas et al. Tissue preservation in caries Treatment. Ed. Quintessence Publishing Co. Ltd. 2001
24. Newbrun, Ernest. Cariology. Tercera ed. Ed. Quintessence Books. 1989.
25. Miani, MC. et al. Clinical observations on the nature of early caries. A study with scanning electron microscopy. *Minerva Stomatologica*. 2000; 49(4):139-47.
26. Lee, Charles Q., Shey, Zian. Microscopic appearance of enamel white-spot lesion after acid etching. *Quintessence International*. 1995; 26(4):279-286.

27. Ripa, Louis W. The histology of the early carious lesions in primary teeth with special reference to a "Prismless" outer layer of primary enamel. J. Dent Res. 1965; 45(1): 5-11.
28. Seif R., Tomás. Cariología. Prevención, Diagnóstico y Tratamiento Contemporáneo de la Caries Dental. Ed. Actualidades Odontológicas Latinoamericanas. C. A. Venezuela. 1997.
29. Robinson, C. The Chemistry of enamel caries. Crit Rev Oral Biol Med. 2000; 11(4):481-95.
30. Gloria Hernández, Ma. De Jesús. "Proceso de Disolución *in vitro* del Esmalte Dental Humano durante un ataque ácido observado por microscopía electrónica". (Tesis de Licenciatura). UNAM. 1994.
31. Sánchez Pérez, Teresa Leonor y col. Resistencia del esmalte a la disolución ácida y su correlación con la caries dental. Salud Pública de México. 1995; 37:224-231.
32. Tohda, H., Takuma, S. Intercristalline Structure of Enamel Crystals Affected by Caries. Journal Dental Research. 1987; 66 (11): 1647-1653.
33. Martínez, Benjamín. Revisión Bibliográfica. Clínica e Histología de la Caries Dental. (<http://www.db.odonto.lu.se/car/data/basic.html>)
34. Brookes, S. J. et al. Copper ions inhibit the demineralization of human enamel. Archives of Oral Biology. 2003; 48(1):25-30.

35. Bratthall, Douglas. Mutans Streptococci-Oral Health. Faculty of Odontology, Malmö University, Sweden in collaboration with International Health Care Foundation.
36. Basotti, Odile et al. Identification of *Streptococcus mitis* group species by RFLP of the PCR-amplified 16S-23S rDNA intergenic spacer. *Research in Microbiology*. 2002; 153: 687-691.
37. Shu, M. et al. Development of multi-species consortia biofilms of oral bacteria as an enamel and root caries model system. *Archives of Oral Biology*. 2000; 45(1): 27-40.
38. Martínez- Romero, Esperanza y Martínez Romero, Julio. Microbios en línea. Coordinación de Investigación Científica. UNAM. México. 2001.
39. Burne, Robert A. Alkali production by oral bacteria and protection against dental caries. *FEMS Microbiology Letters*. 2000; 193(1):1-6.
40. Costerton, J. W. et al. How Bacteria Stick. *Research in Microbiology*. 1989; 69(12):237-245.
41. Tanzer, Jason. et al. Salivary and Plaque Microbiological Test and the Management of Dental Caries. *Journal of Dental Education*. 1997; 61(11).
42. Morgan, Thomas., Bunch W. alan. Cryopreservation of *Streptococcus mutans* for microcalorimetry based applications. *Thermochimica Acta*. 2000; 349: 9-15.

43. Akintoye, S. O., et al. Partial characterization of a human submandibular/sublingual salivary adhesion-promoting protein. *Archives of Oral Biology*. 2002; 47 (5):337-345.
44. Sharma, M. L. , Newbrun, E. Chemical composition of the Washed Cells of *Streptococcus sanguis* (804) and *Streptococcus mutans* (B-14). *J. Dental Research*. 1975; 54(3).
45. Dowd, F. J. Saliva and dental caries. *Dent Clin North Am*. 1999; 43(4): 579-97.
46. Ooshima, T., Osaka, Y. et al. Cariostatic activity of cacao mass extract. *Archives of oral Biology*. 2000; 45(9):805-808.
47. Akintoye, S. O. et al. Partial characterization of a human submandibular/sublingual salivay adhesión-promoting protein. *Archives of Oral Biology*. 2000; 47(5):337-345.
48. Koga, Toshihiko., Oho, Takahiko et al. Immunization agains dental caries. *Vaccine*. 2002; 20(16):20227-2044.
49. Driessens, F. C., Wöltgens, J. H. Tooth Development and caries. *Library of Congress Card*. 1986.
50. Robinson, C. Identification of human serum albumin in human caries lesions of enamel: the role of putative inhibitors of remineralization. *Caries Research*. 1998; 32(3):193-9.
51. Reyes, José. *Microscopía Electrónica. Una visión del microcosmos*. Fondo de cultura Económica. México.

52. Hall, Cecil E. Introduction to Electron Microscopy. Ed. Krieger Publishing. 1983.
53. Valdré, Ugo. Use, Applications and Value of Stereo-EBIC imaging. Ultramicroscopy. Noth Holland. 1993; 49:366-381.
54. Flegler, Stanley et al. Scanning and Transmission Electron Microscopy. An Introduction. Ed. Freeman. 1993.
55. Shimizu, C et al. Carious Change of Dentin Observed on Longspan Ultrathin Sections. J. Dent Res. 60(11):1826-1831.
56. Angker, Linny et al. Quantitative analysis of the mineral content of sound and carious primary dentine using BSE imaging. Archive of Oral Biology. 2004; 49(2):99-107.
57. Pantelidou, Ourania y Lyroudia, Kleoniki. SEM Examination of Secondary Dentine Under and Opposite Cervical Carious Lesions. Journal of Endodontics. 1997. 23(11):680-682.
58. Hubble, T. S., et al. Influence of *Enterococcus faecalis* proteases and the collagen binding protein, Ace, on adhesion to dentin. Oral Microbiology and Immunology. 2003; 18(2): 121.
59. Fontana, M. et al. An in vitro Microbial Model for Studying Secondary Caries Formation. Caries Research. 1996.;30:112-118.
60. Reyes Gasga, José, et al. La microscopía electrónica y el esmalte dental humano. Ciencia y Desarrollo. 1995; 21:30-43.

61. Zahradnik R. T., Moreno, E. Effect of salivary pellicle on enamel subsurface demineralization ins vitro. J. Dental Research. 1976, 55:644-670.
62. Silverstone, L. M. Remineralization Phenomena. Caries Research. 1977; 11 (suplemento 1):59-84.
63. Gray, J. A., Francis, m. Physical chemistry of enamel dissolution in mechanism of hard tissue destruction. American Association for the Advancement of Science. 1963; 213-260.
64. Maupomé-Cervantes, Gerardo, et al. Prevalencia de caries en zonas rurales y periurbanas marginadas. Salud Pública México. 1993; 35:357-367.
65. Alcamo, Edward. Fundamentals of Microbiology. Ed. Addison Wesley Longman. Inc. 1997.
66. Lim, Daniel. Microbiology. Ed. Mc-GrawHill. 1998.