

01475

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN DE
LA FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
INSTITUTO DE FÍSICA



**“ESTUDIO DESCRIPTIVO DE LOS COMPONENTES QUE
CONFORMAN LA UNIÓN ESMALTE – DENTINA
EN DIENTES HUMANOS”.**

TESIS

Que para obtener el Grado de:
MAESTRA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

Area:
BIOLOGÍA BUCAL

Presenta:

GIL CHAVARRÍA MARGARITA IVET

Director de Tesis: DR. JOSÉ REYES GASGA

2005

m. 341728



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.

Dirección de Tesis:

Dr. José Reyes Gasga.

Revisión y Aprobación de Tesis:

Dr. Octavio Álvarez Fragoso (PRESIDENTE-Instituto de Investigaciones en Materiales).

Dr. José Reyes Gasga (VOCAL-Instituto de Física)

Dra. Elba Leyva Huerta (SECRETARIA-Posgrado de Odontología).

Dr. Higinio Arzate (SUPLENTE-Posgrado de Odontología).

Dr. Luis Felipe Jiménez (SUPLENTE-Facultad de Ciencias).

Asesoría durante la Investigación:

Dr. Ramiro García (Instituto de Física-UNAM)

Dr. Luis Felipe Jiménez (Facultad de Ciencias-UNAM)

Dr. Jorge Guevara (Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía)

Dr. Michael Picquart (UAM-Iztapalapa)

Asistencia técnica:

Pedro Mexía, (Laboratorio de Nuevos Materiales-IFUNAM)

Roberto Hernández, Carlos Magaña, Diego Quiterio, Cristina Zorrilla, Jacqueline Cañetas
(Laboratorio central de Microscopía-IFUNAM)

Manuel Aguilar (Rayos X-IFUNAM)

Samuel Tehuacanero (Digitalización-IFUNAM).

Carlos Flores del Instituto de Investigaciones en Materiales-UNAM.

Sr. Teo (Patología Posgrado de Odontología-UNAM).

Manuel Briceño COMEX.

Apoyo financiero:

DGAPA-UNAM-IN 104902

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	7
OBJETIVOS	8
HIPÓTESIS	10
CAPÍTULO I	
PROCESOS BIOLÓGICOS QUE PARTICIPAN EN LA FORMACIÓN DE LA UNIÓN ESMALTE-DENTINA	11
UNIÓN ESAMALTE-DENTINA	13
ORGANIZACIÓN CELULAR	15
COMPONENTES DE LA MATRIZ ORGÁNICA	16
MINERALIZACIÓN	19
DENTINOGENESIS	22
AMELOGÉNESIS	24

CAPÍTULO II

TÉCNICAS DE OBSERVACIÓN Y ANÁLISIS	26
MICROSCOPIA FOTÓNICA O DE LUZ	27
FLUORESCENCIA.....	28
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	29
ESPECTROSCOPIA INFRA-ROJO	33

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	36
OBTENCIÓN Y CRITERIOS DE SELECCIÓN DE MUESTRAS.....	36
METODOLOGÍA PARA MICROSCOPIA FOTÓNICA	37
METODOLOGÍA PARA FLUORESCENCIA	39
METODOLOGÍA PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	40
IMPORTANCIA DE LA FIJACIÓN CON GLUTARALDEHIDO	41
METODOLOGÍA PARA RX Y ESPECTROSCOPIA IR.....	47

CAPÍTULO IV

RESULTADOS	49
-------------------------	----

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN	75
------------------------	----

CONCLUSIONES	80
---------------------------	----

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.....	12
<i>Imágenes de MEB de los prismas, unidad estructural del esmalte.</i>	
FIGURA 2.....	12
<i>Imágenes de MEB de los túbulos dentinarios, en forma transversal y longitudinal.</i>	
FIGURA 3.....	14
<i>Festoneado de la UED en MEB, Tomada de Chun P. (31)</i>	
FIGURA 4.....	15
<i>Organización celular en la odontogénesis, Tomada de Sheila J. (3)</i>	
FIGURA 5.....	21
<i>Imágenes de MET de los cristales de esmalte y dentina.</i>	
FIGURA 6.....	27
<i>Microscopio Fotónico.</i>	
FIGURA 7.....	29
<i>Microscopio con cámara de fluorescencia.</i>	
FIGURA 8.....	30
<i>Microscopio Electrónico de Transmisión.</i>	
FIGURA 9.....	31
<i>Microscopio Electrónico de Barrido.</i>	
FIGURA 10.....	32
<i>Difractómetro de Rayos X.</i>	
FIGURA 11.....	35
<i>Espectroscopio de radiación Infra-Rojo.</i>	
FIGURA 12.....	37
<i>Selección de dientes, molares y premolares con extracción indicada, sin caries.</i>	
FIGURA 13.....	38
<i>UED en MF. A. La UED con luz reflejada y B. La UED con luz transmitida.</i>	

FIGURA 14.....	39
<i>Corte histológico de diente, visto con cámara de Fluorescencia.</i>	
FIGURA 15.....	40
<i>Imágenes de la UED por Microscopía Electrónica de Barrido.</i>	
FIGURA 16.....	42
<i>UED en MEB después de fijar la muestra.</i>	
FIGURA 17.....	43
<i>Exposición de la UED por separación mecánica; visto en MEB.</i>	
FIGURA 18.....	44
<i>Muestra desgastada con ácido nítrico, vista en MEB (eliminación de la UED).</i>	
FIGURA 19.....	44
<i>Desgaste del diente con ácido nítrico, a diferentes intervalos de tiempo para el tercio oclusal, medio y cervical; visto en MEB.</i>	
FIGURA 20.....	45
<i>Muestra desgastada con ácido fosfórico, vista en MEB.</i>	
FIGURA 21.....	46
<i>Muestra desgastada con ácido nítrico al 2.5% por siete días, vista en MEB.</i>	
FIGURA 22.....	50
<i>UED procesada con ácido nítrico al 5% antes de ser fijada, vista en MEB.</i>	
FIGURA 23.....	51
<i>Imágenes de fluorescencia de la zona cercana a la UED.</i>	
FIGURA 24.....	52
<i>Fluorescencia de la dentina, el esmalte y el borde de la UED.</i>	
FIGURA 25.....	53
<i>Imágenes de fluorescencia de la UED.</i>	
FIGURA 26.....	54
<i>Imágenes de MEB de la UED con un procesamiento de la muestra mediante ácido nítrico y la fijación previa con glutaraldehído.</i>	
FIGURA 27.....	56
<i>Imágenes de MEB donde se aprecia la zona de contacto de parte de la dentina.</i>	
FIGURA 28.....	57
<i>Imagen de MEB de la UED por separación mecánica exponiendo la zona de contacto.</i>	
FIGURA 29.....	58
<i>Imagen de MEB de la UED (el material orgánico tiene dimensiones variables).</i>	

FIGURA 30.....	59
<i>Imagen de MEB. Dimensiones de la estructura orgánica reticular de la UED.</i>	
FIGURA 31.....	60
<i>Imagen de MEB de la superficie de contacto de la UED sobre la dentina.</i>	
FIGURA 32.....	62
<i>Imagen de MEB de la estructura orgánica, su EDS con porcentaje atómico y en peso. Recubierta con una película delgada de oro (Au).</i>	
FIGURA 33.....	63
<i>Imagen de MEB de la estructura orgánica, su EDS con porcentaje atómico y en peso. Sin recubrimiento de oro (Au).</i>	
FIGURA 34.....	65
<i>Mapeo químico de los elementos registrados C, Ca, O, P, y K de la UED.</i>	
FIGURA 35.....	66
<i>Mapeo químico de los elementos registrados C, N, O, Ca, P, Na y Mg de la UED.</i>	
FIGURA 36.....	68
<i>Imagen de MEB de fibras observadas en la UED, su EDS con la concentración en porcentaje en peso y porcentaje atómico de los elementos.</i>	
FIGURA 37.....	69
<i>Imágenes de MEB de la UED con un aspecto fibrilar (Tercio medio del diente).</i>	
FIGURA 38.....	70
<i>Imagen de MEB de la estructura fibrilar, su EDS con porcentaje atómico y en peso. Superficie recubierta con una película delgada de oro (Au).</i>	
FIGURA 39.....	72
<i>Imágenes de MEB de polvo de la UED, su EDS con porcentaje atómico y en peso.</i>	

ÍNDICE DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1.....	18
<i>Niveles organizacionales de la colágena, Tomada de Sheila J. (3)</i>	
ESQUEMA 2.....	34
<i>Longitud de onda, frecuencia y energía del espectro electromagnético.</i>	
ESQUEMA 3.....	75
<i>Representación de la organización de la UED.</i>	
ESQUEMA 4.....	76
<i>Esquema de la estructura y organización de la UED entre los tejidos inorgánicos.</i>	

ÍNDICE DE ESPECTROS

ESPECTRO 1.....	47
<i>Espectros de RX, esmalte (E) y dentina (D) tienen HAP como base inorgánica.</i>	
ESPECTRO 2.....	48
<i>Imagen de espectros de absorbanza, obtenidos por IR de cóndilo y alveolo.</i>	
ESPECTRO 3.....	62
<i>Espectro EDS de la Figura 32. (Recubierta de Au).</i>	
ESPECTRO 4.....	63
<i>Espectro EDS de la Figura 33. (Sin recubrir de Au).</i>	
ESPECTRO 5.....	68
<i>Espectro EDS de la Figura 36. (Fibras en la UED).</i>	
ESPECTRO 6.....	68
<i>Espectro EDS de la Figura 35. (Aspecto fibrilar).</i>	
ESPECTRO 7.....	72
<i>Espectro EDS de la Figura 39A. (Polvo de la UED/material inorgánico).</i>	
ESPECTRO 8.....	72
<i>Espectro EDS de la Figura 39B. (Polvo de la UED/material orgánico).</i>	
ESPECTROS 9.....	73
<i>Espectros de transmitancia en IR del Esmalte, Dentina y UED.</i>	
ESPECTROS 10.....	74
<i>Espectros de absorbanza en IR de colágena y fosfato de calcio tribásico.</i>	

“ESTUDIO DESCRIPTIVO DE LOS COMPONENTES QUE CONFORMAN LA UNIÓN ESMALTE – DENTINA EN DIENTES HUMANOS”.

RESUMEN

Este trabajo es un estudio descriptivo de la interfase conocida como Unión Esmalte-Dentina (UED) en dientes humanos. Desde la odontogénesis ya se establecía una interacción celular epitelio-mesenquimatoso, entre ameloblastos y odontoblastos a través de las fibras de Von Korff; y es ahí donde se inician los procesos biológicos; antecediendo la dentinogénesis a la amelogénesis. La UED es resultado de la mineralización de las matrices orgánicas del esmalte y la dentina. La UED permite el contacto de tejidos fisiológica y estructuralmente distintos, aunque con la misma base inorgánica (Hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Por lo tanto, el objetivo de ésta investigación fue identificar los factores que conforman esa unión, composición química y la organización estructural que presenta.

Las muestras fueron fijadas y preparadas inmediatamente después de la extracción, usando diferentes métodos y técnicas para una caracterización correcta de esta zona. Las observaciones fueron por Microscopía Fotónica, Fluorescencia y Microscopía Electrónica de Barrido, también se realizaron análisis EDS para identificar los elementos presentes en la unión, mapeos químicos para ver su distribución y Espectroscopia Infra-Rojo para obtener información molecular de la UED.

Los resultados obtenidos sugieren que el material de unión tiene una organización reticular, que consiste en extensiones orgánicas que emergen de la dentina y llegan hasta los espacios interprismáticos del esmalte. Esa red presenta variabilidades estructurales dadas en razón de la función, con apariencia fibrilar que brindan amortiguación y soporte mecánico. Por EDS se identificó que la UED es constituida por C, O y N principalmente y su distribución en los mapeos químicos mostraron que están presentes en las prolongaciones que forman la red, y que las señales de Ca y P son porque el análisis fue sobre la superficie dentinaria. Con los espectros de IR se concluyó que el esmalte, la UED y la dentina tienen los mismos componentes, pero en diferente concentración con diferencias significativas en las bandas de los OH, que corresponden a agua y proteína. Finalmente se integran los resultados en un esquema del diseño biológico que presenta la UED.

“ESTUDIO DESCRIPTIVO DE LOS COMPONENTES QUE CONFORMAN LA UNIÓN ESMALTE – DENTINA EN DIENTES HUMANOS”.

ABSTRACT

This work is a descriptive study of the interface Dentin-Enamel Junction (DEJ) in human tooth. In the odontogenesis there was established an epithelial-mesenquimatosa cellular interaction, between ameloblast and odontoblast through of the fibers Von Korff, there is the start place of the biological processes, the dentinogenesis before that the enamelogenesis. Although the DEJ is result of the full mineralization of the organic matrix of dentin and enamel. The DEJ allows contact between two different tissues in the physiological and structural aspects, even though with the same inorganic component (Hydroxyapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). The main objective of this investigation is to characterize the elements presents in the junction, as well as the chemical composition and structural organization.

The samples were fixed and prepared immediately after extraction, using different methods for a correct characterization of its zone. The observations were made by Light Microscopy, Fluorescent Microscopy and Scanning Electron Microscopy. Is very important to note the differences of both tissues and understand how they are maintained together and special role in this junction. The identification of elements were made by EDS and their distribution by chemical maps. For molecular information of the DEJ we used Infra-Red Spectroscopy of the samples.

The results obtained determine that the material of junction presents a reticular structure showing an organic extensions from the dentin until the interprismatic spaces of enamel. The network of reticular has variable structure determined by the function, of the fibrous aspect for the support which provides absorption of the oclusal forces. By EDS we found that the DEJ is constituted principally of C, N and O and the distribution of this elements in the prolongation of network of the DEJ are presented. However the signal of Ca and P is detected due to the analysis was made on surface of the dentin. By Spectroscopy IR we concluded that the enamel, DEJ, and dentin have the same components but different concentration in the bands OH of water and protein. Finally we unified the results in a biological diagram of the design of the DEJ.

INTRODUCCIÓN

El estudio de los tejidos que conforman los seres vivos, en sus diferentes aspectos como es la génesis, diferenciación, crecimiento y función, es un proceso que inició hace siglos pero que a la fecha no deja de sorprendernos el sistema tan específico que emplea la naturaleza para construir organismos tan complejos.

La Unión Esmalte-Dentina (UED) no es la excepción debido a que cuenta con una organización estructural ideal y compleja para el trabajo que realiza el diente. Para entender su conformación hay que tener presente los elementos y los eventos que se llevan a cabo para dar origen a la UED, zona que representa una gran importancia en la conformación del diente y su fisiología.

El conocer más acerca de la UED conduce a una línea de investigación poco limitada. Es decir, que por el simple hecho de ser un área de unión es necesario responder a las siguientes preguntas: ¿qué es el esmalte?, ¿qué es la dentina?, ¿con qué y cómo permanecen unidos? Además tomando en cuenta referencias como la de Marshall (1), donde reporta que “La UED es una estructura pobremente definida”, o la de Gallagher (2) en la que publica que “La UED es una interfase crítica de dos tejidos duros”, surgió el interés por conocer más acerca del tema. Así es como se inició este proyecto en el que diferentes técnicas microscópicas y analíticas fueron los medios principales para llevar a cabo ésta investigación.

Es importante conocer las propiedades que caracterizan al esmalte y a la dentina. El esmalte que es el tejido externo del diente y que también se ha definido como el tejido de mayor dureza en el organismo presenta unidades estructurales conocidos como prismas, formados

por los ameloblastos los cuales pierden actividad celular después de la mineralización del esmalte. La dentina se conforma por túbulos dentinarios que en el interior alojan prolongaciones de los odontoblastos (células formadoras de la dentina), presentan actividad celular aún después de erupcionado el diente reaccionando a estímulos físicos, químicos y biológicos.

La UED surge durante la formación de la dentina y el esmalte, pero al decir que surge es como si fuera a consecuencia de estos procesos; sin embargo, también es el sitio donde se inician esa serie de eventos que tienen como finalidad la formación de un órgano dentario. Esto significa que desde antes de la formación de los tejidos esmalte y dentina, “existe interacción celular, entre las epiteliales (ameloblastos) y las mesenquimatosas (odontoblastos) por la presencia de las fibras de Von Korff”, como lo describe S. Jones (3). Por lo tanto la UED es la superficie de iniciación para la amelogénesis y dentinogénesis, precediendo la formación de la dentina a la del esmalte.

La mineralización es el proceso fundamental en la maduración de los dos tejidos que están presentes en la UED. Para la formación de cristales se requiere de un proceso denominado Biogénesis Mineral, es decir, los modos en que se puede dar el depósito del mineral. Veis (4) describe dos formas: “La Mineralización Biológicamente Inducida, en el cual el cristal puede asumir orientaciones al azar y una variedad de tamaños; y la Mineralización Mediada por Matriz (o “matriz controlada”), donde se genera un cristal único bien definido y orientado”. Estas dos formas de mineralización, por las características de los cristales presentes en los tejidos ya maduros, corresponderían el primero a la dentina y el segundo al esmalte.

Los dos tejidos involucrados en la UED a pesar de las diferencias ya mencionadas son constituidos por la misma base inorgánica (hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$), solo que en diferente concentración y organización. El esmalte se conforma en un 96 % de material inorgánico caracterizado por cristales bien definidos y ordenados, el otro 4% es material orgánico que se encuentra en los espacios interprismáticos. La dentina presenta un 70% de material inorgánico y sus cristales están distribuidos al azar, el otro 30% es material

orgánico. Así entonces, ambos tejidos requieren una base orgánica para la formación de la hidroxiapatita, la biología celular la considera como una matriz extracelular orgánica que junto con componentes de la expresión celular de los ameloblastos y odontoblastos, permiten la formación de material inorgánico. La matriz orgánica del esmalte es constituida por “60% de proteínas y 40% de lípidos, donde los lípidos se identificaron en los espacios interprismáticos” según Veerappan (5). Respecto a las proteínas de la matriz del esmalte, la más abundante es la amelogenina, aunque también está la enamelina y tuftelina; pero “no hay colágena” según Ragazzoni (6). En la dentina predomina la colágena tipo I, la cual provee el soporte físico y el medio favorable para el depósito mineral (7) y otras proteínas no colágenas como la sialoprotein dentina y fosfoprotein dentina (8), además de otras glicoproteínas y proteoglicanos (9).

La matriz orgánica inicia la mineralización, la cual Bordier (10) la describe de la siguiente forma tanto para el esmalte como para la dentina: “Los primeros dos pasos incluyen los procesos iniciales de nucleación y la formación de partículas de tamaño nanométrico, las cuales darán lugar a la formación del cristal. Estos procesos comprenden la nucleación heterogénea de fosfato de calcio inorgánico y de una matriz orgánica extracelular, controlados en ambos tejidos por esa matriz y bajo controles celulares”. Todos estos procesos biológicos se centran en la relación entre los cristales de esmalte y dentina y en la función de las matrices orgánicas en la formación de la UED, que en un inicio en la unión o interacción celular esta dada por las fibras de Von Korff (11). Por lo tanto, la composición y la organización estructural que presenta la UED es resultado de los procesos biológicos que se llevan a cabo para formación del diente; su composición estructural debe corresponder a restos de la matriz orgánica que formó material inorgánico y su organización, así la estructura de la UED está determinada por los tejidos inorgánicos.

Estos antecedentes determinan de alguna manera qué es lo que continúa por estudiar dentro de la misma línea de investigación, ya que se ha descrito en muchas ocasiones tanto al esmalte como a la dentina, y en algunas otras se ha hablado de la UED. Por lo tanto, esta tesis representa la continuación a estas investigaciones y también la vinculación entre lo que ya se conoce y lo que se ha obtenido recientemente. Es el estudio descriptivo de esta

zona mediante un proceso experimental sustentado en una base teórica; que además crea nuevas expectativas para seguir conociendo acerca de este tema, el cual es parte importante en el área de materiales y fundamental en el área odontológica.

Tomando en cuenta todos esos elementos y procesos que participan en la formación del diente, y por ende en la formación de la zona que une a los dos tejidos que conforman la mayor parte del diente, es como se describe la composición, organización y variaciones que tiene la UED, la cual ha sido descrita como una zona festoneada por diferentes autores, tales como Doukoudakis (12). De esta forma con los resultados presentados en éste trabajo de tesis se observa con mayor claridad que ese festoneo es una morfología dada por las proyecciones de material orgánico que emergen de la dentina, en forma de red, para después organizarse en los espacios interprismáticos del esmalte, representando la integración de resultados de forma gráfica el diseño biológico con el que cuenta la UED.. Así es como gracias a esa arquitectura que presenta la unión, con cada uno de los factores que colaboran para su formación, se permite llevar a cabo los mecanismos fisiológicos necesarios para el ser humano, como es la masticación.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La UED es la interfase de dos tejidos que presentan la misma base inorgánica, la cual constituye el mayor porcentaje del esmalte y la dentina. Sin embargo, presentan diferencias importantes tales como sus características estructurales, propiedades físicas y composición química. A pesar de estos factores, se mantienen en contacto en condiciones normales llevando a cabo su fisiología. Estos antecedentes son los que conducen a conocer más sobre los factores que permiten ésta unión, así como su organización o diseño que conforman la zona de unión.

En este trabajo de tesis se ha planteó un estudio descriptivo por el cual, mediante diferentes técnicas de observación y análisis, se resolvieron diferentes cuestionamientos, como son: ¿Cómo se mantienen unidos dos tejidos distintos?, ¿Qué características debe tener el material de unión?, ¿De qué manera interactúa el material presente en la interfase con el esmalte y la dentina?. De igual manera es relevante que en una zona de espesor tan pequeño se involucren sistemas biológicos y que emplee principios de organización estructurales, químicos y físicos complejos para dar origen a una arquitectura tal como la de la UED dentro de los órganos dentales.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de ésta investigación es la caracterización de los componentes de la UED, determinando las propiedades del material que permite la unión y funcionalidad entre éstos dos tejidos, esmalte y dentina; así como determinar la composición química y organización estructural de la zona de unión. Tomando en cuenta que la UED está dada, por sistemas biológicos y por una fluctuación de señales que inician desde las interacciones epitelio-mesenquimatosas al inducir la mineralización de dentina y esmalte, siendo factores determinantes para la estructura y conformación de dicha unión. Para cumplir con el objetivo principal, se podrían desglosar una serie de objetivos específicos, que incluyen:

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Observar la Unión Esmalte-Dentina mediante Microscopía Fotónica y Microscopía Electrónica de Barrido, caracterizando la morfología festoneada descrita en la literatura.
2. Determinar la presencia de material entre los dos tejidos que conforman la Unión Esmalte-Dentina, ayudando a que permanezcan en contacto a pesar de llevar a cabo trabajos mecánicos como la masticación.

3. Visualizar el material orgánico en Microscopía de Fluorescencia, detectando la relación que tiene entre ambos tejidos.
4. Conocer los elementos que constituyen el material presente en la Unión, identificado si es material orgánico, a través de un detector de rayos X con análisis EDS, así como su distribución mediante mapeos químicos en MEB.
5. Obtener mediante Espectroscopia Infra-Rojo, información acerca de las variaciones de material orgánico e inorgánico en el Esmalte, Dentina y Unión Esmalte-Dentina.
6. Integrar los resultados y establecer un esquema del diseño biológico presente en la unión, caracterizando la forma en que se organizan e interactúan tanto los tejidos inorgánicos como el material orgánico; que en conjunto constituyen una estructura funcional.

HIPÓTESIS

1. El espacio que ocupa la UED es la interfase entre dos tejidos que contiene material orgánico, causa por la cual podría considerarse como una zona débil.
2. La matriz orgánica de la UED presenta una organización de acuerdo a las características estructurales del esmalte y la dentina, determinada por tener la misma base inorgánica. Esto propicia la unificación de éstos, o la adhesión del material de unión, evitando que se separen.
3. La UED es una matriz orgánica extracelular que se caracteriza por tener una estructura a base de prolongaciones de fibras colágenas, y que en general contribuyen a la estructura de unión de los dos tejidos.
4. Las prolongaciones orgánicas que emergen de la dentina se insertan en los espacios interprismáticos del esmalte.

CAPÍTULO I

PROCESOS BIOLÓGICOS QUE PARTICIPAN EN LA FORMACIÓN DE LA UNIÓN ESMALTE-DENTINA.

El inicio de ésta investigación tuvo como bases algunas de las aportaciones donde se han reportado las características estructurales del esmalte y la dentina individualmente. Gracias a esto se establecieron las diferencias más importantes entre ambos tejidos, por el cual uno de los motivos principales fue el conocer cómo se genera esta unión. Estos tejidos realizan trabajos mecánicos fisiológicos y se mantienen en contacto, aunque tengan variabilidades estructurales y físicas.

Para tener presente las características principales del esmalte y la dentina, en éste capítulo se describieron de forma breve algunas de ellas.

El esmalte es el tejido que cubre la corona del diente, presenta un grosor mayor en oclusal, principalmente en las cúspides y se adelgaza hacia cervical. Sus características físicas son translucidez y permeabilidad, además de que se le reconoce como el tejido con mayor dureza del cuerpo humano. El esmalte es formado por los ameloblastos, células epiteliales las cuales pierden su actividad después de mineralizado el tejido, conformándose en un 94% de material inorgánico y solo 4% de restos de la material orgánico y agua. Su unidad estructural son los prismas, los cuales miden en promedio de 4 a 8 micrómetros. En cortes transversales se observan como escamas de pescado y en cortes longitudinales tienen una trayectoria curva (Figura 1). En los espacios interprismáticos es donde se encuentra distribuido el material orgánico.

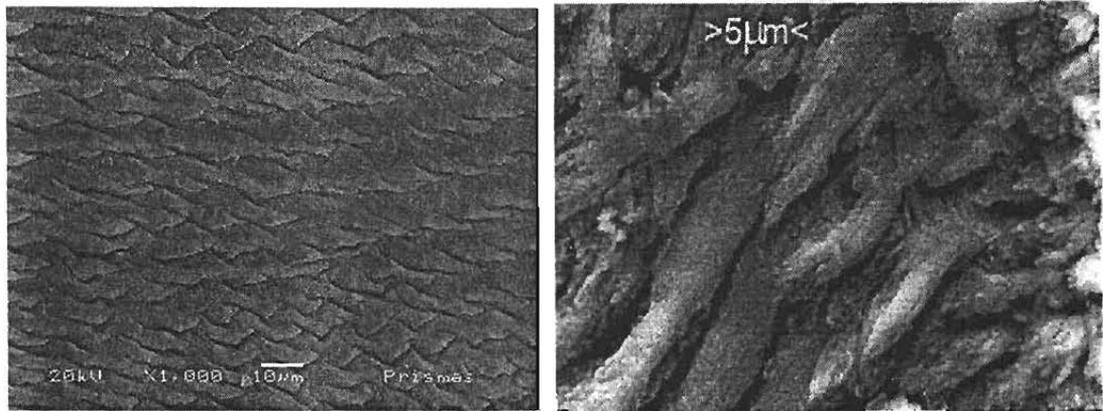


FIGURA 1

Imágenes de MEB de los prismas, unidad estructural del esmalte.

La dentina es el tejido que se forma por acción de la mineralización de la matriz orgánica producida por los odontoblastos (células mesenquimatosas); éste hecho se sigue llevando a cabo constantemente durante la vitalidad del órgano dentario. Se han descrito diferentes tipos de dentina dependiendo de su ubicación, la dentina coronaria que es la que esta cercana a la UED, la radicular, la intertubular, la peritubular y la de reparación. Pero de forma general cuenta con un 70% de material inorgánico y un 30% de sustancia orgánica y agua. Su unidad estructural son los túbulos dentinarios, los cuales contienen procesos odontoblásticos o remanentes de fluidos orgánicos. Ver la figura 2.

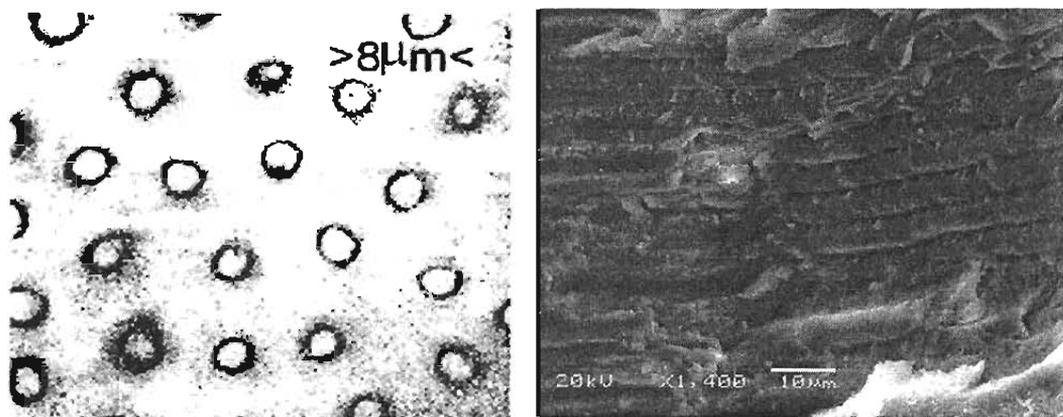


FIGURA 2

Imágenes de MEB de los túbulos dentinarios, en la figura izquierda con una vista transversal y del lado derecho en forma longitudinal.

Por lo tanto para el estudio de las características, elementos y mecanismos de organización de la UED es fundamental la aplicación de conceptos básicos ya conocidos de cada tejido que la conforman, para así entonces, integrar cada proceso que esté involucrado y que halla contribuido a la formación de la UED.

Estos principios confieren un enfoque conceptual de lo que es la UED que pertenece propiamente a la interfase, entre lo que respecta de un lado el esmalte y del otro la dentina; y aunque podría existir una imagen principal de lo que es la unión tal y como un tejido aislado, se han encontrado una variabilidad de factores determinantes o que de algún modo participan para la conformación de la UED. Cada uno de estos elementos está participando desde la formación de la dentina (dentinogénesis) y del esmalte (amelogénesis) para ese diseño biológico en una zona tan pequeña pero muy representativa de la superorganización que tienen, no solo los órganos dentales, sino también de todo organismo vivo.

En éste capítulo se hace referencia de las características de los tejidos, de la serie de eventos que se llevan a cabo para dar origen a la UED, y de los elementos que son parte de la arquitectura de esta unión. Por esta razón se describen algunos conceptos básicos y que en conjunto con esta información proyectarán una mayor claridad al momento de definir e interpretar los resultados. Sería difícil cubrir todo lo que se ha reportado del esmalte y la dentina, la intención de éste capítulo es mostrar una visión general de los temas que colaboraron para la conformación de la UED, haciendo mención de las aportaciones más relevantes y recientes que han contribuido al desarrollo de la misma.

UNIÓN ESMALTE-DENTINA.

Existen estudios sobre la UED realizados con microscopía fotónica donde se muestran evidencias de su característica festoneada (12) como se observa en la Figura 3. Esto ha sido aceptado, aunque el plano específico de la unión esmalte-dentina, con estudios ya mas recientes y de carácter ultraestructural, han ido permitiendo conocer más acerca de lo que parecería una superficie irregular.

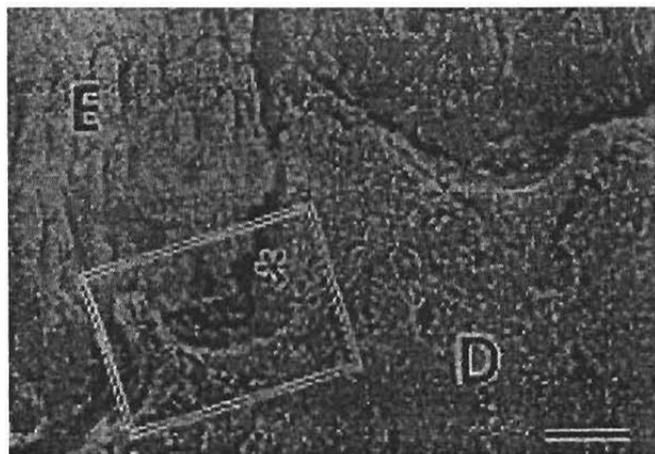


FIGURA 3

*Zona de UED en MEB, donde se observa el característico festoneado.
Tomada de Chun P. (31)*

Esta relación que establece la unión indudablemente está presente desde antes de la dentinogénesis y la amelogénesis, porque existe un contacto celular entre los odontoblastos que son de origen mesenquimatoso y los ameloblastos que son de origen epitelial. Esa relación está dada por la presencia de las Fibras de Von Korff, las cuales establecen interacciones epitelio-mesenquimatosas y son las que conformarán la UED después de la maduración. En esa zona es precisamente donde se inician los procesos biológicos para la formación de cada tejido.

Tanto la dentinogénesis como la amelogénesis requieren una matriz orgánica extracelular mediante la cual se llevará a cabo la mineralización. De parte del esmalte la matriz orgánica son proteínas amelogeninas, enamelinas y tuftelinas con un porcentaje de lípidos, y de parte de la dentina son colágena, sialoprotein dentina y fosfoprotein dentina además de algunos proteoglicanos y glicoproteínas. Esto permite llevar a cabo la nucleación, el depósito mineral y el crecimiento del cristal en ambos casos. Aún a pesar de que ambos procesos no son dependientes, es importante mencionar que la formación de la dentina precede al depósito de la matriz del esmalte. Por lo tanto se introduce una descripción de cómo se encuentran organizadas las células antes de iniciarse los procesos biológicos, posteriormente se describe la matriz orgánica secretada por las células y las características de la mineralización que ocurre para concluir con la dentinogénesis y la amelogénesis.

ORGANIZACIÓN CELULAR

Primeramente hay que identificar las células que llevan a cabo estos procesos, los odontoblastos (responsables de la odontogénesis) y los ameloblastos (responsables de la amelogénesis). Los odontoblastos son células diferenciadas del ectomesénquima y se encuentran adyacentes a las células epiteliales por la parte interna, estas células epiteliales son los ameloblastos. Los elementos que separan éstas dos capas celulares son, lámina basal, microfibras adherentes (conocidos como fibras de Von Korff) y un material amorfo electrodenso esto sería propiamente la UED, después de finalizar la mineralización de tejidos (Figura 4). Por lo tanto existen interacciones epitelio-mesenquimatosas que están dadas por esas microfibras; de tal forma que la lámina basal es penetrada por los preameloblastos, formándose un contacto directo entre las proyecciones de los preameloblastos y los procesos de los odontoblastos. Esa “unión” deja de ser interacción epitelio-mesenquimatosa y se convierte en la UED cuando los tejidos estén totalmente diferenciados (3).

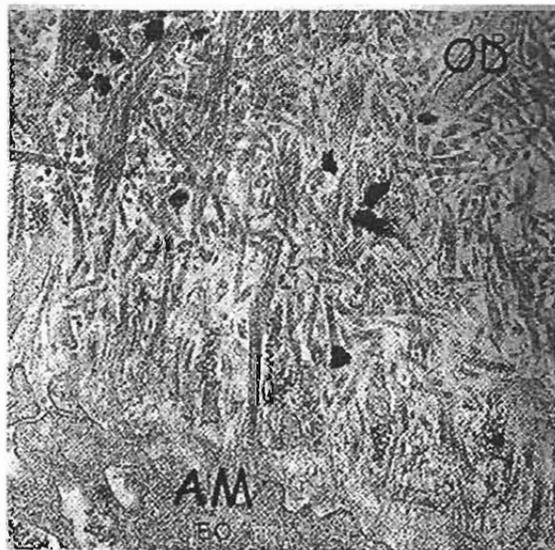


FIGURA 4

Imagen que muestra la organización celular de odontoblastos y ameloblastos, se observa la interacción epitelio-mesenquimatosa mediante fibras.

OD=odontoblastos AM=ameloblastos

Tomada de Sheila J. (3)

Los odontoblastos son células elongadas, con un retículo endoplásmico alineado a lo largo de toda la célula y con el núcleo del lado apical. Del otro extremo se encuentra el aparato de Golgi, que es donde aparecen los gránulos secretores. Los odontoblastos son las células encargadas de secretar las proteínas y la matriz extracelular que posteriormente se convertirá en la base para la mineralización de la dentina. Estas células se caracterizan por presentar prolongaciones, llamados también procesos odontoblásticos, los cuales contienen microtúbulos y filamentos finos o microfilamentos. Algunas de esas prolongaciones van a permanecer aún después de la maduración de la matriz orgánica. Por este motivo es que Sigal (13) y colaboradores identificaron en los procesos odontoblásticos proteínas del citoesqueleto como, tubulina, actina y vimentina que se extienden hasta la UED.

Los ameloblastos son las células epiteliales que se encargan de la formación del esmalte; son células cuboidales que en la etapa de pre-secretorios tienen aproximadamente 60 micrómetros de altura y de 2 a 3 micrómetros de ancho. Los cristales de apatita son nucleados en el estado secretorio y crecen rápidamente. Los ameloblastos dan origen a la matriz orgánica y cada uno es responsable de la formación de un prisma dental (14). La importancia que presenta cada línea celular, consiste en los elementos que secreta para conformar la matriz extracelular y proteica, que permiten llevar a cabo la mineralización.

COMPONENTES DE LA MATRIZ ORGÁNICA

Los constituyentes de la matriz orgánica que dan lugar a la mineralización, son diferentes para la formación de cada uno de los tejidos de inicio porque son producidas por líneas celulares distintas.

MATRIZ ORGÁNICA DE LA DENTINA. Está constituida principalmente por proteínas, en su mayoría colágena tipo I, también están presentes otras proteínas no colágenas (PNC), algunas glicoproteínas y proteoglicanos. Las PNC's son capaces de influenciar los procesos de mineralización fuertemente. Su importancia radica en que son de carácter

predominantemente aniónico y son las que van a determinar los sitios o centros de nucleación por medio de la distribución de cargas eléctricas. Además de presentar otros grupos químicos reactivos iniciándose en estos sitios el crecimiento del cristal mineral. Muchas de éstas PNC's están fosforiladas, por lo que se les llama fosfoproteínas. La más común es la Dentin Fosfoproteína altamente fosforilada. Otra proteína de gran relevancia presente durante la formación de dentina es la Sialoprotein Dentin, que también se ve involucrada en los procesos de mineralización y es del grupo de las proteínas no colágenas PNC's (9).

La colágena al igual que las otras también tiene una función importante en los mecanismos de mineralización. La colágena es una proteína fibrilar insoluble, esas fibras están presentes en todos los tejidos mineralizados (es en donde los cristales de apatita son depositados), involucrando mecanismos bioquímicos específicos que determinan qué tejidos tendrán que ser mineralizados y cuales no (como la piel que aunque contiene colágena no es mineralizada). A nivel microscópico la colágena presenta un patrón de bandas con una periodicidad de 68 nm. aproximadamente; pero cada fibra tiene dimensiones entre los 50 y los 150 nm. La que está presente en ésta matriz, es la colágena del tipo I, aunque se ha reportado que “en dientes deciduos está presente la colágena tipo III junto con la colágena tipo I, y que ambas son derivadas de las fibras de Von Korff” (15). La colágena dentro de sus características presenta diferentes niveles organizacionales:

A). La forma general de la secuencia de aminoácidos presenta glicina (Gly) cada tres aminoácidos, representándose (Gly-X-Y) en triplete de hasta 338 a 342 aminoácidos. Sin embargo, ésto no se presenta en los extremos amino (NH_2) y carboxilo (COOH) terminal. En la colágena primaria hay muchos aminoácidos prolina e hidroxiprolina en las cadenas alfa α , y están aproximadamente uno en cada cuatro aminoácidos en toda la cadena.

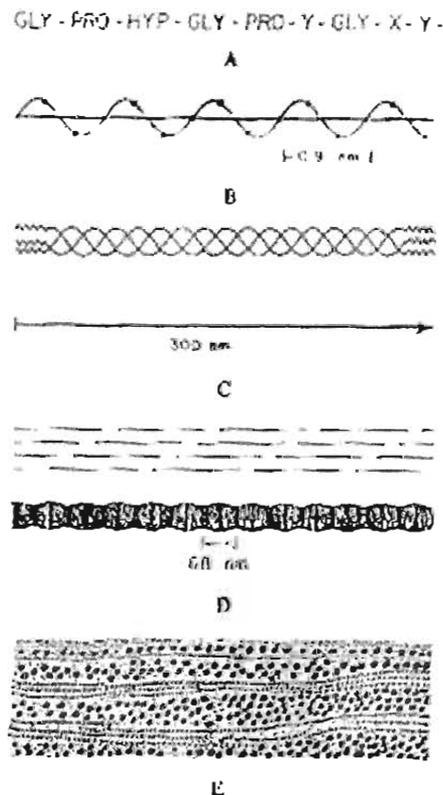
B). La cadena tiene una estructura de hélice, lo que se le conoce como hélice menor, girándose cada tres aminoácidos.

C). A cada tres cadenas alfa-polipeptídicas, se le identifica como una hélice mayor. Al unirse esas 3 cadenas polipeptídicas conforman una molécula de colágena que tienen aproximadamente 300 nm. de longitud.

D). Un gran número de esas fibras colágenas se pueden ir agregando para formar fibras lo suficientemente largas. Estas se han identificado por microscopía electrónica como bandas fibrilares que se repiten cada 68 nm. Las uniones intermoleculares son de tipo covalente.

E). Se organizan en los diferentes tejidos, creando sistemas de fibras estables en espacios extracelulares dependiendo de las características de cada tejido y de su función.

En el Esquema 1 se representan los niveles de organización de la colágena antes descritos, haciendo énfasis en que las diferencias en las secuencias de aminoácidos da toda la variedad de tipos de colágena que se conocen. El último nivel se adapta dependiendo del tejido en el que esté y la función que realice.



ESQUEMA 1

*Diferentes niveles organizacionales de la colágena.
Tomada de Sheila J. (3)*

Como se mencionó con anterioridad, los diferentes tipos de colágena están dados por cambios en la estructura primaria de la proteína, es decir, cambios en la secuencia de los aminoácidos. Sin embargo, la colágena de la dentina y la de la piel parecería la misma; la diferencia significativa esta dada porque dos de tres aminoácidos son hidroxilisina de forma constante. En este caso la colágena que esta presente en casi el 90% de la matriz orgánica de la dentina, es la tipo I.

MATRIZ ORGÁNICA DEL ESMALTE. Está conformada por proteínas especializadas, principalmente amelogenina. Algunas investigaciones bioquímicas han reportado el 60% de proteínas y 40% de lípidos; éstos últimos, se ha encontrado que previenen la desmineralización del esmalte, y que están en la superficie según Veerappan (5). Dentro del 60% de las proteínas, están presentes otras además de la amelogenina que es la que predomina en un 90%. El otro 10% restante corresponden a proteínas no-amelogeninas y son la enamelina y tuftelina. En un estudio realizado por Diekwish (16) reporta que además del esmalte de los vertebrados también se encuentran epitopes de tuftelina en otros tejidos y que algunos vertebrados como larvas y anfibios tienen en lugar de esmalte un paquete denso de matriz de colágena, en la cual un grupo de cristales de calcio y apatita son asociados con las fibras lo que se le llama enameloides.

En otras especies con los estudios de Ichiro (17), Toshihiko y colaboradores (18) determinaron la actividad de la fosfatasa alcalina en la producción de tejidos duros, específicamente en el esmalte, asociando la actividad de la fosfatasa alcalina y la hidrólisis de pirofosfatos a la regulación del crecimiento del cristal, transporte de calcio y provisión de iones fosfato. Reportaron que la actividad de la enzima es intensa y localizada y que la diferencia entre esmalte y enameloides quizá sea la distribución de la fosfatasa alcalina.

MINERALIZACIÓN

Las propiedades específicas que presentan los tejidos mineralizados son definidos por la composición de la matriz orgánica proteica, tanto colágena (en el caso de la dentina) como

de otras proteínas no-colágenas (en el caso del esmalte). Estas proteínas juegan un papel importante en los procesos de la activación de la mineralización, donde su expresión temporal y espacial es definitivamente regulada. Se han descrito dos mecanismos de depósito para la biogénesis mineral: la Mineralización “biológicamente inducida”, en el cual el habitat del cristal es esencial ya que el cristal puede asumir por precipitación de una solución inorgánica de los iones relevantes orientaciones al azar y una variedad de tamaños. La “matriz-mediada” (o “matriz controlada”) de la mineralización, es donde la fase mineral crea un cristal único de forma bien definida y orientado, con un tamaño estrecho y bien distribuido (4). El primer modo podría corresponder a la mineralización de la dentina y la segunda al esmalte.

Los procesos generales de la mineralización se pueden resumir en:

- Secreción de la matriz orgánica
- Nucleación del cristal.
- Elongación del cristal.
- Remoción de la matriz orgánica.
- Maduración del cristal.

El proceso de mineralización de la dentina, como se mencionó con anterioridad, antecede a la amelogénesis, lo que implica un depósito temprano mineral sobre la preentina (19). El crecimiento y nucleación de los cristales del esmalte son independientes de los procesos de mineralización que ocurren en la dentina, a pesar de las interacciones celulares que existen. Esto es debido a que los agregados supramoleculares o proteínas de la matriz orgánica son derivados extracelulares de distinto origen: los de la dentina derivan del mesénquima y el producto extracelular del esmalte es derivado ectodérmicamente de las células epiteliales (20).

Los primeros cristales aparecen sobre la unión esmalte-dentina. La forma de crecimiento de los patrones de estos cristales pueden ser interpretados como evidencia para una fase precursora de fosfato octacálcico. Un cristal de OCP desplaza sobre esta cara una superficie que puede actuar como templete para la precipitación de la hidroxiapatita (el OCP es menos

estable que la hidroxiapatita). Durante el proceso de hidrolización, una única celda de OCP es convertida en dos celdas de hidroxiapatita (21). La base inorgánica tanto del esmalte como de la dentina es la hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$. La hidroxiapatita forma cristales hexagonales que son más estables que la OCP. La proporción calcio/fósforo es de 1.67 en hidroxiapatita y 1.33 en el fosfato octacálcico. Ver la Figura 5.

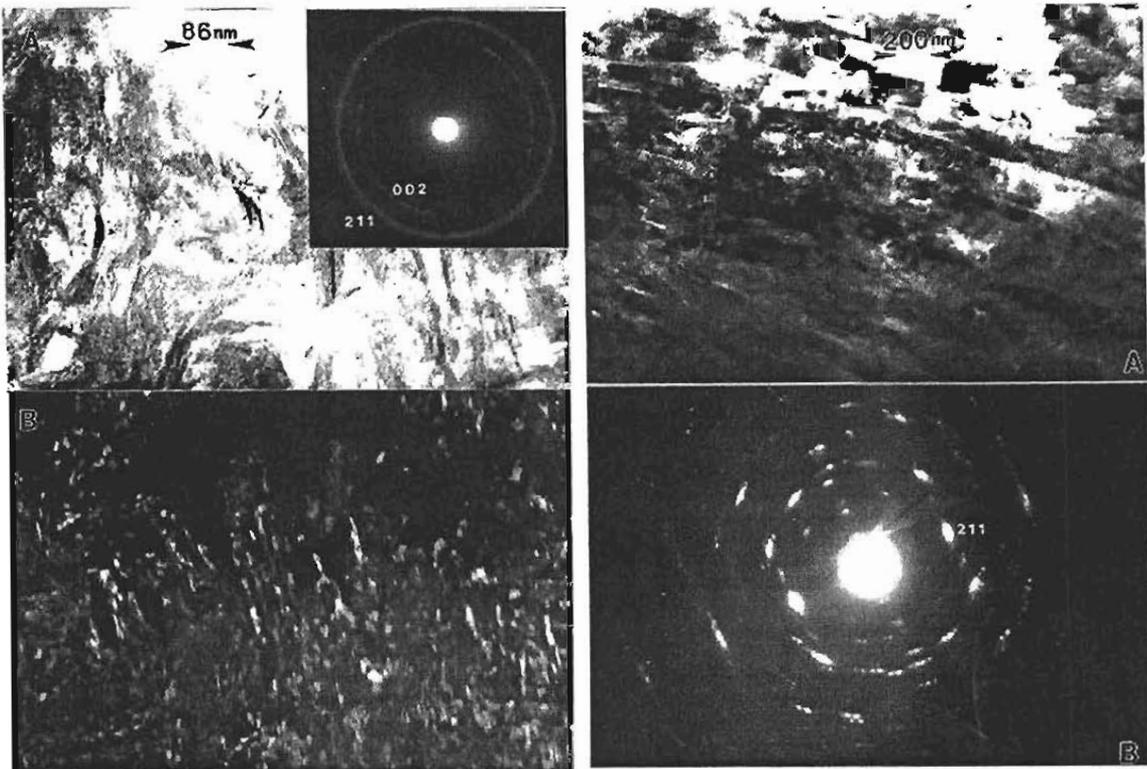


FIGURA 5

Imágenes de MET. Lado Izquierdo: cristales de la dentina y su patrón de difracción de círculos que indica distribución al azar. Del lado derecho: cristales del esmalte con una distribución ordenada y su patrón de difracción de puntos. Ambos corresponden a hidroxiapatita.

El crecimiento del cristal ocurre por tres estados: 1). Formación de un germen (agrupación mínima de iones dentro del cristal), 2). Crecimiento duo-dimensional del germen (crece a lo largo y a lo ancho, como un cristal de OCP con una sola celda unitaria), y 3). Crecimiento tridimensional, por precipitación e hidrólisis, donde la celda unitaria del OCP hidroliza dentro a dos celdas unitarias de hidroxiapatita (OHAp). La distancia entre los cristales es de

aproximadamente 20 nanómetros. Los iones de fluor aceleran la hidrólisis de OCP a apatita, mientras los iones magnesio la inhiben. La incorporación de carbonato incrementa la solubilidad alterando las propiedades físicas tales como la forma y el tamaño del cristal, los cuales son remplazados por iones hidroxilo cerca de la UED. Los iones Fluor pueden unirse a proteínas del esmalte e incrementar su afinidad por el calcio. El Magnesio (Mg) inhibe el crecimiento del cristal de hidroxiapatita, su contenido en dentina es mayor que en el esmalte. En el esmalte hay 56 calcio por cada magnesio, y mientras el Mg disminuye 0.4% en el esmalte, en la UED disminuye solo el 0.1%, con estas generalidades de la mineralización, es posible entender con mayor claridad, estos procesos biológicos de manera individual.

DENTINOGÉNESIS.

Este proceso se puede resumir en que es una secuencia bifásica:

La primera fase es la que comprende los eventos que se suscitan desde el inicio de la secreción de la lámina basal, en la que los preodontoblastos se caracterizan por tener extensiones de procesos celulares hacia las células epiteliales. Estas fibras tienen disposición divergente o de abanico, conocidas como fibras de Von Korff con un diámetro de 0.1 a 0.2 micrómetros, además de fibras colágenas más pequeñas. Los preodontoblastos se diferencian en odontoblastos terminando la división celular, completando totalmente sus organelos e iniciando la secreción de la matriz orgánica no calcificada llamada predentina. Por esto es que los preodontoblastos son los responsables de la degradación de la lámina basal por las secreciones enzimáticas a partir de los procesos celulares.

La segunda fase es de mineralización, que no comienza si no hasta que se deposita una banda amplia de predentina estando la matriz orgánica completa, es decir, colágena y otras proteínas no colágenas como sialoproteín y fosfoproteín dentin (22), manteniendo un grosor constante. La formación y calcificación de la dentina comienza en las cúspides o en

los bordes incisivos avanzando hacia el interior por la aposición rítmica de capas cónicas, una dentro de la otra, hasta llegar a su fin en la dentina radicular. El avance de la mineralización se acompaña de cambios en la sustancia fundamental de la matriz orgánica ya que se depositan fosfoproteínas, proteoglicanos, glicoproteínas y la matriz colágena. La secuencia de ésta inicia con el depósito de un cristal en las fibrillas el cual se hace en forma de placas finas. Por esto es que se secreta primero la dentina intratubular, dejando procesos odontoblásticos dentro de los túbulos dentinarios.

La mineralización de la matriz dentinaria ocurre extracelularmente. Los odontoblastos son los que controlan la mineralización de la dentina mediante la producción de matrices vesiculares, que acumulan calcio y es el inicio de la mineralización (3). Esta mineralización, para formar la dentina abarca factores fisicoquímicos que interactúan para inducir el depósito de sustancia inorgánica en matrices orgánicas, puede ser estimulada o inhibida por actividad celular, además hay algunos factores que afectan la estructura de la mineralización de la matriz orgánica, tales como la composición bioquímica de esos constituyentes y la organización espacial de las moléculas.

La mineralización de la dentina ocurre extracelularmente; los cristales de apatita no han sido demostrados en los odontoblastos; sin embargo, los odontoblastos no son el único camino para regular el ingreso de calcio a la dentina, puede ocurrir una regulación de la acumulación adecuada que pasa a través del espacio interodontoblástico. El manto de la dentina que es lo primero que se forma, es una capa de grosor variable que se extiende no más de 100 micrómetros, después se mineraliza y cada capa es completada mediante la organización de los odontoblastos. Otros elementos observados en la dentinogénesis son las Matrices Vesiculares (MV), que son de origen celular aunque no tienen conexión directa con la célula, éstas son los sitios de inicio para la mineralización porque acumulan calcio; además de ser ricas en fosfatasa alcalina, presentes en el manto de la dentina, formando cantidades variables de cristales, se conforman por una sustancia amorfa y son cubiertas por una membrana, estando en contacto con fibras de colágena.

AMELOGÉNESIS

Durante el desarrollo del esmalte, los cristales inician su formación en la UED sobre la dentina recientemente mineralizada y una matriz de proteínas dentales específicas. Los ameloblastos son células columnares y son responsables de la secreción durante el desarrollo del esmalte. La porción más distal del ameloblasto provoca ciertas estructuras durante la formación del esmalte. Esas estructuras son llamadas procesos de Tomes, que van hacia un lado (fase secretoria), debido a que las proteínas son secretadas a partir de los ameloblastos dentro de la matriz del esmalte. La amelogénesis consiste en tres estados que incluye el secretorio, el de transición y el de maduración. Cuando inicia la mineralización, la hidroxiapatita tiene bajo porcentaje de carbonato, sodio y magnesio. La orientación de los cristales es variable durante el estado de transición hasta llegar al estado de maduración en la cual decrece el material orgánico.

Los cristales llegan a formar una capa lo suficientemente densa, y se van degradando las proteínas por las proteinazas. En el caso de la amelogenina, los productos de degradación tienen diferentes propiedades con respecto a la unión de los cristales y su solubilidad, los cuales son potencialmente importantes dentro de las características funcionales y son los menos solubles. La interacción proteína-cristal son aspectos importantes en la formación del cristal así como las diferencias proteolíticas en la solubilidad de las proteínas y la afinidad para la adsorción de los cristales, todos estos factores probablemente influyan para la maduración del esmalte, según Bartlett (23).

El depósito del mineral ocurre durante la maduración y crecimiento del esmalte, seguido por la degradación y remoción de la matriz. Es importante mencionar que los cristales del esmalte tienen una proporción Ca/P que indican fosfatos octacálcicos OCP y tricálcicos TCP independientes de la hidroxiapatita (HAP) de la dentina. En estados tardíos aparece HAP, esto sugiere que la nucleación de los cristales del esmalte ocurre separadamente de la presencia de dentina mineralizada, pero que si requiere un templete de dentina mineralizada. Por lo tanto, la nucleación de los cristales del esmalte es independiente a la formación de cristales de la dentina. Esto se resume en tres procesos que controlan la

formación inicial del esmalte: 1) El establecimiento de un medio ambiente apropiado asociado con la lámina basal y una secreción electro densa, 2). La iniciación de la formación del cristal de fosfato cálcico con agregados electrodensos separados de la matriz de la dentina y 3). La formación del esmalte y cristales de HAP los cuales eventualmente se extienden a la superficie de la dentina (20).

El mecanismo de crecimiento y orientación de los cristales de apatita del esmalte fueron estudiados por Iijima (24), sobre las hipótesis de que los cristales del esmalte crecen inicialmente como fosfatos octacálcicos, como precursores de la apatita. La segunda hipótesis es que, un ion de calcio (Ca^{2+}) unidireccional interviene en los ameloblastos en su crecimiento y orientación del cristal por lo que crecieron OCP en un modelo de formación del esmalte. Los cristales de OCP crecen a lo largo de las fibras colágenas y orientados con una elongación perpendicular a la dirección del flujo iónico. El tamaño y crecimiento del cristal es regulado por una difusión iónica.

Así es como se llevan a cabo éstos procesos biológicos, fundamentales para la formación del órgano dental, con los principales aspectos que se involucran para la organización estructural de la UED.

CAPÍTULO II

TÉCNICAS DE OBSERVACIÓN Y ANÁLISIS

Diferentes aspectos biológicos se han estudiado desde hace mucho tiempo y de diversas formas. Sin embargo, no existe un conocimiento total y preciso de lo que sucede con todos esos sistemas organizados que se regulan y conforman tejidos u organismos funcionales; aunque día a día se ha ido complementado el conocimiento gracias al surgimiento de nuevos instrumentos de observación y análisis que han sido y son de gran utilidad para la investigación científica. Respecto al conocimiento de la estructura de la UED, ésta ha sido analizada con técnicas microscópicas. En primera instancia se observó con Microscopía Fotónica (MF), pero los avances tecnológicos a mitad del siglo veinte, innovaron las técnicas de observación con la Microscopía Electrónica (ME).

Para llevar a cabo este estudio, se emplearon técnicas multidisciplinarias, utilizando la Microscopía Fotónica y Microscopía Electrónica principalmente. Sin embargo, se recurrió a otros métodos analíticos elegidos principalmente por las diferentes ventajas que presentan y al tipo de información que se obtiene. Estas opciones se trabajaron de forma complementaria para poder entender de forma más completa la arquitectura de la UED ya que con una sola técnica no podría ser resuelto.

Se considera importante mencionar que la manipulación y manejo de cada método de estudio se logra gracias al conocimiento básico de las ventajas que presenta cada uno, la forma en que funciona y sus mecanismos. Por esta razón es que en éste capítulo se describe acerca de las técnicas que permitieron concretar el diseño de la UED, involucrando un

continuo análisis de los resultados obtenidos. Aunque una de las actividades específicas y de mayor importancia es la Microscopía Electrónica de Barrido, cada uno de los resultados obtenidos por las diferentes técnicas utilizadas fueron de gran utilidad y en beneficio para el desarrollo de la presente investigación.

MICROSCOPIA FOTÓNICA.

La Microscopía Fotónica (MF) hasta el día de hoy es la primera opción en cuanto a técnicas de observación de materiales orgánicos e inorgánicos (Figura 6). Este microscopio fue inventado por Zacharias Janssen en 1590; para conocer lo que existe más allá de una observación a simple vista, esto porque el ojo tiene una resolución de 0.1mm. (Los objetos separados por distancias menores a ésta, no los podemos distinguir con nuestra visión). El microscopio fotónico trabaja mediante fuentes de luz (fotones) o rayos luminosos. Se basa en un sistema de lentes de vidrio. Los lentes que están cerca de la muestra se llaman objetivos, forman una imagen real, invertida y aumentada de ésta. Los lentes llamados oculares van cerca del ojo del observador, son donde diverge cada punto de la imagen y emergen paralelos, al mismo tiempo que aumenta la imagen formada por la lente intermedia (25).



FIGURA 6
Microscopio Fotónico.

Indudablemente, para este estudio la MF fue una de las técnicas más importantes y de gran utilidad, tanto para la obtención de primeros resultados como para facilitarnos la observación en los diferentes procesamientos de las muestras para otras técnicas. Por lo tanto, es parte fundamental del proceso de investigación sin quedar en desuso a pesar de que ahora se cuenta con mejores técnicas de caracterización, como lo es la microscopía electrónica (ME).

FLUORESCENCIA

Esta técnica se caracteriza porque las moléculas de la muestra absorben la luz de una determinada longitud de onda y emiten luz de otra longitud de onda más larga. Si un componente de este tipo es iluminado a su longitud de onda absorbente y visualizado a través de un filtro que sólo permita pasar la luz de longitud de onda igual a la de la luz emitida, el componente aparece brillante sobre un fondo oscuro. La intensidad y el color de la luz es una propiedad característica de la molécula utilizada.

Los colorantes para la tinción son detectados con ayuda del microscopio y en este caso de la cámara de fluorescencia (Figura 7), que es muy similar al microscopio confocal, a excepción de que en el confocal la luz incidente que procede de una potente fuente atraviesa un primer filtro que selecciona la longitud de onda antes de incidir sobre la muestra. La luz emitida por la muestra atraviesa un segundo filtro que selecciona la longitud de onda de emisión. La luz incide sobre la preparación a través de las lentes del objetivo. La observación microscópica es posible cuando se dispone de objetos pequeños o de secciones finas del material a observar; dependiendo de las condiciones de la observación y del grosor de la muestra. Los mejores resultados son en cortes finos.

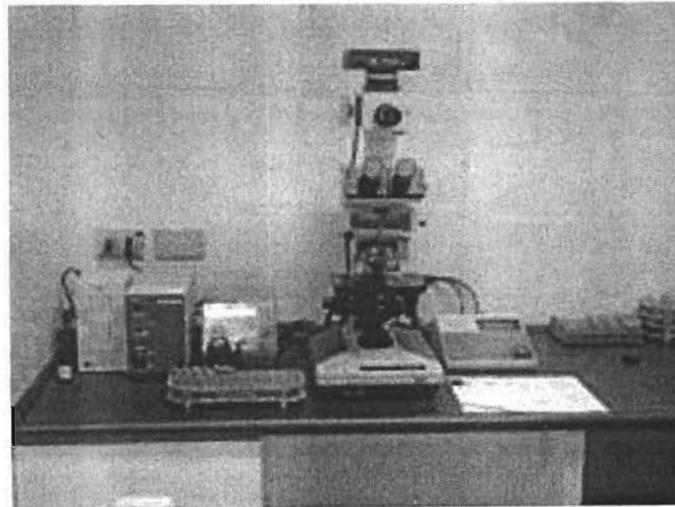


FIGURA 7
Microscopio con cámara de fluorescencia.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

La microscopía electrónica es una técnica muy útil que surge con la invención del microscopio electrónico en el siglo XX (Figura 8). Esta técnica permite ver mas detalles, texturas muy finas y hacer análisis más complejos de las muestras que se están estudiando. El microscopio electrónico es un aparato con los mismos principios físicos que el microscopio fotónico, con la diferencia que utiliza electrones en lugar de fotones.

Cuenta con un cañón electrónico, que en realidad es la única lente electrostática del microscopio, y consiste en un filamento con forma de “V” por donde fluye una corriente eléctrica y por efecto de la emisión termoiónica se provoca el desprendimiento de electrones. La forma y material del filamento es determinante para la resolución del microscopio. Para la formación de imágenes, la columna del microscopio electrónico de transmisión debe estar al alto vacío y los electrones son enfocados por medio de lentes electromagnéticas (bobinas) que son los que forman y amplifican la imagen, hasta un millón de aumentos. La imagen producida por la lente objetiva sirve como objeto para la

lente intermedia, la cual producirá una segunda imagen, que a su vez es amplificada por la lente proyectora, siendo ésta la que se observa en la pantalla.

De los electrones que atraviesan la muestra algunos siguen una dirección incidente sin ser desviados y se conocen como transmitidos. Los que se desvían son llamados difractados. Estos electrones transmitidos y difractados son los utilizados por la lente objetiva enfocando el plano-imagen para formar la primera imagen dando información acerca de las características estructurales del material; pero si se enfoca el plano focal se observan puntos luminosos en un arreglo que se conoce como patrón de difracción; el arreglo geométrico depende del arreglo atómico de la muestra. Mediante el análisis del patrón de difracción se analiza la estructura atómica del material (26).

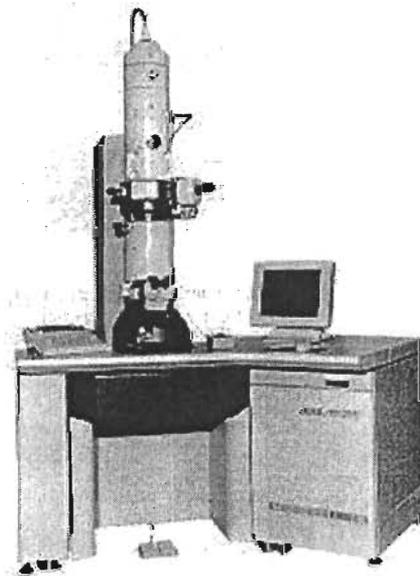


FIGURA 8
Microscopio Electrónico de Transmisión

Las imágenes que se pueden obtener entonces son campo claro, campo oscuro y patrones de difracción. Sin embargo, cuando los electrones interactúan con la muestra produce diferentes tipos de señales como son: los electrones retrodispersados, los secundarios, absorbidos, Auger y rayos X. Los de Auger y los rayos X nos permiten hacer su análisis de

la composición química. Los electrones secundarios y retrodispersados dan la conformación sobre la morfología de la superficie de la muestra.

Estos fueron los antecedentes del microscopio electrónico de barrido (Figura 9), que forma imágenes con electrones retrodispersados, los cuales provienen de regiones a 0.5 micrómetros por debajo de la superficie y los secundarios que solo penetran de 5 a 10 nm. Fue construido por el físico alemán Manfred Von Ardenne en 1938 y diseñado para estudiar la superficie de los objetos al igual que el fotónico, con la diferencia que el de barrido posee una resolución y profundidad de foco mayores, lo que determina la calidad de la imagen.

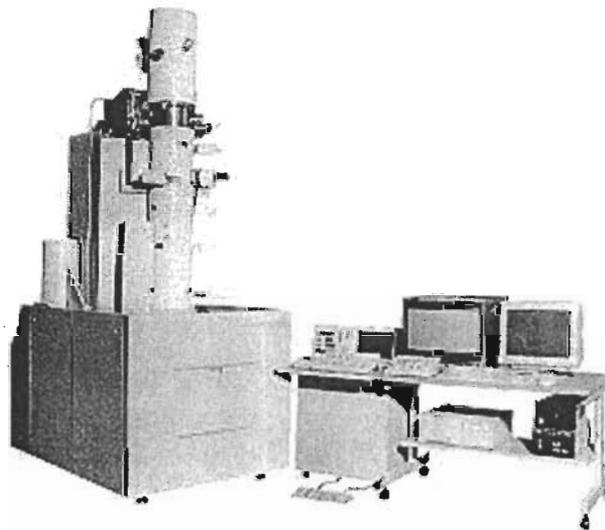


FIGURA 9
Microscopio Electrónico de Barrido

Debido a la interacción de los electrones con los sólidos permite obtener información más específica acerca de la estructura. Además, a diferencia del fotónico, da una impresión de tridimensionalidad, siendo muy útil para estudiar características morfológicas y topográficas de la muestra, pudiendo también adaptarsele detectores para hacer uso de las técnicas analíticas de rayos X.

Los rayos X en microscopía electrónica permiten realizar un análisis químico del material. Los electrones de los átomos de la muestra puede ser que sean sacados de una capa interna por un electrón del haz incidente y que regrese a su estado base por dos caminos distintos: que un electrón de la capa superior ocupe un nivel inferior emitiendo un fotón, o rayos X en otro electrón de la capa superior. En el caso de la emisión de rayos X, si el haz electrónico tiene la energía suficiente para excitar los electrones de otros niveles a la órbita K, el resultado son los rayos X "K". Los rayos X "L" resultan de la transición de electrones de otros niveles al nivel L y así sucesivamente.

El microscopio electrónico equipado con un detector de rayos X del tipo de análisis de la distribución de energía (EDS) permite hacer un microanálisis de la composición química de la muestra. Los "mapeos químicos" detectan la distribución superficial de los elementos presentes en la muestra. Este modo de operación del EDS es de mucha utilidad, debido a que obtenemos esquemas de distribución en diferentes regiones de lo que se está analizando, dependiendo de la cantidad del elemento presente.

En un equipo de difracción de rayos X (Figura 10), por otro lado, nos permite obtener información cristalográfica del material en un espectro donde se grafica intensidad contra el ángulo 2θ . Esta información es complementaria a la obtenida por microscopía electrónica.

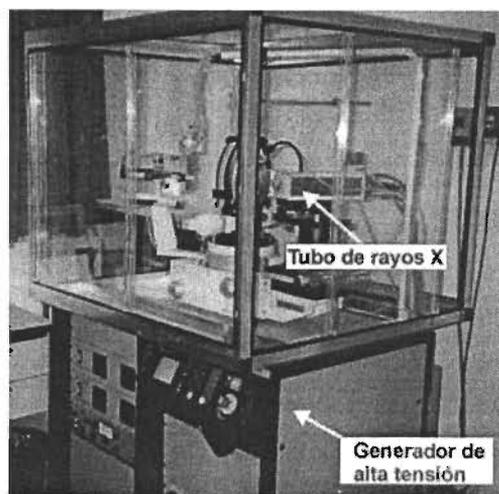


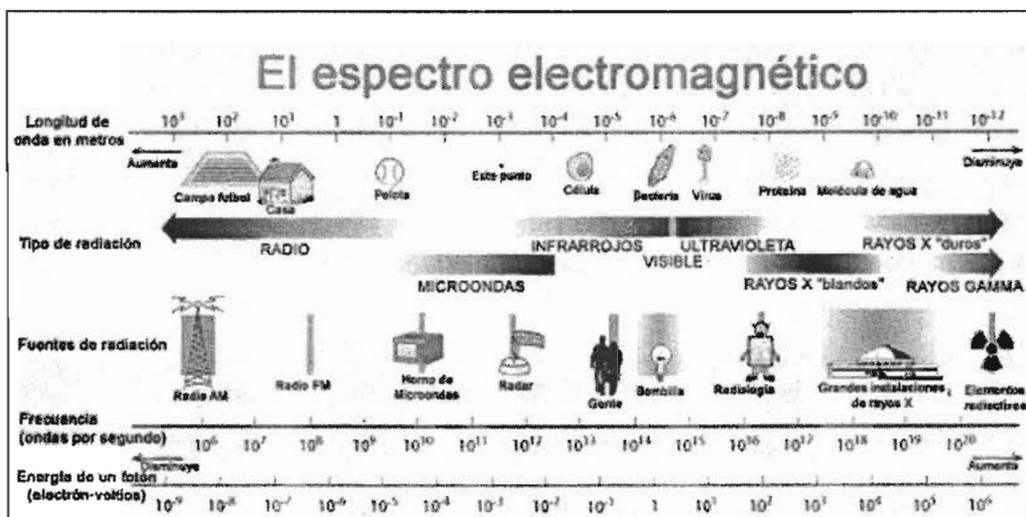
FIGURA 10
Difractómetro de Rayos X

ESPECTROSCOPIA INFRA-ROJO

Esta técnica tiene su origen en 1800 cuando William Herschel, un astrónomo inglés de origen alemán, colocó un termómetro de mercurio en el espectro obtenido por un prisma de cristal con el fin de medir el calor emitido por cada color: descubrió que el calor era más fuerte al lado del color rojo del espectro, un lugar donde no había luz (la región del infra-rojo). John Herschel continuó con los trabajos de su padre en el estudio de la estructura y dinámica de las moléculas empleando como herramientas la absorción, emisión y/o dispersión de luz.

El análisis por espectroscopia de Infra-Rojo está basado en la detección de la energía que se requiere para alterar los electrones del átomo. La eficacia de la espectroscopia se basa en que cada compuesto tiene un comportamiento único frente a un haz de infra-rojo. La información que se registra es a nivel molecular, los cuales se mantienen unidos mediante energía vibracional y otra de tipo rotacional; ésta última es menor, así que solo se registra la primera. Esto es debido a que las moléculas se encuentran dentro de un campo eléctrico que es direccional, de arriba hacia abajo en una direccionalidad vertical, y un campo magnético, que es de izquierda a derecha en dirección horizontal. Si cualquiera de las dos se mueve a una velocidad rápida, presenta una longitud de onda corta (λ =corta), pero si el movimiento es lento tendrá una longitud de onda mayor (λ =grande). Otro punto importante es que las moléculas van a vibrar con una energía característica siempre en la misma frecuencia (ν).

El espectro de IR (Esquema 2) tiene una λ de 3000 y una ν de 10^{13} . Este espectro ocurre únicamente para cada movimiento (vibraciones y rotaciones) y están relacionadas en una alteración del momento dipolo de la molécula en cuestión, para cada molécula dipolo se necesita un dipolo permanente. Las moléculas diatómicas homonucleares, como O₂, H₂ y N₂ son excluidas por no tener un dipolo eléctrico permanente.



ESQUEMA 2

Longitud de onda, frecuencia y energía del espectro electromagnético.

Con el análisis IR se obtienen medidas de longitud de onda, la estructura molecular y el análisis cuantitativo, mediante el estudio de moléculas diatómicas, separadas de las poliatómicas (Teoría del Espectro Molecular); captando las alteraciones de energía en las especies atómicas o moleculares las cuales producen el espectro, esto es:

- Detecta los movimientos vibracionales de los componentes de un enlace químico que tiene frecuencias naturales dentro de un rango de frecuencias infrarrojo. Si partimos del espectro electromagnético, los IR están entre los 10 a los 14 000 cm^{-1} y se divide en IR lejano (de 10 a 650 cm^{-1}), el IR medio y el más importante (de 650 a 4000 cm^{-1}) y el próximo (de 4000 a 12500 cm^{-1}).
- Las oscilaciones inducidas por ciertos modos vibracionales pueden provocar que cuando un haz de radiación infrarrojo incide sobre la materia, si las frecuencias están en resonancia, se produzca un intercambio de energía entre el haz y las moléculas constituyentes.
- Los tipos atómicos, el entorno químico y la concentración de los enlaces presentes tienen un comportamiento característico (27).

Las posibilidades de captar rápidamente la energía por una molécula son:

- La energía del electrón E_e

- La energía de vibración E_v
- La energía de rotación E_r

Prácticamente todos los compuestos moleculares pueden manifestar una serie de bandas de absorción y cada una corresponderá con un movimiento de vibración de un enlace dentro de una molécula, lo que constituye la huella dactilar del compuesto. Cada una es un estado de energía y una alteración en estas origina un espectro específico. Debido a que están en distintas regiones, los cambios de energía se relacionan con la emisión o absorción de la radiación.

En un análisis de IR (Figura 11), se mide la Intensidad del haz antes de que interaccione con la muestra (I_0) y después de que interaccionó con la misma (I), expresándolo en función de la frecuencia de la luz incidente. Los espectros los podemos obtener de dos formas; con gráficas del % de Transmitancia contra cm^{-1} o gráficas del % de Absorbancia contra cm^{-1} , siendo una complementaria de la otra. Así es como de esta forma se incide la luz IR sobre la muestra, donde las moléculas captan la energía necesaria desde el menor nivel para pasar al siguiente nivel además de que cada molécula requiere diferente energía y se han identificado zonas típicas en IR. Algunas constantes de energía son los O-H (3600), N-H (3400), C-H (3000), $\text{C}\equiv\text{N}$ (2250), $\text{C}\equiv\text{C}$ (2150), C=O (1715), C=C (1650), C-O (1100).

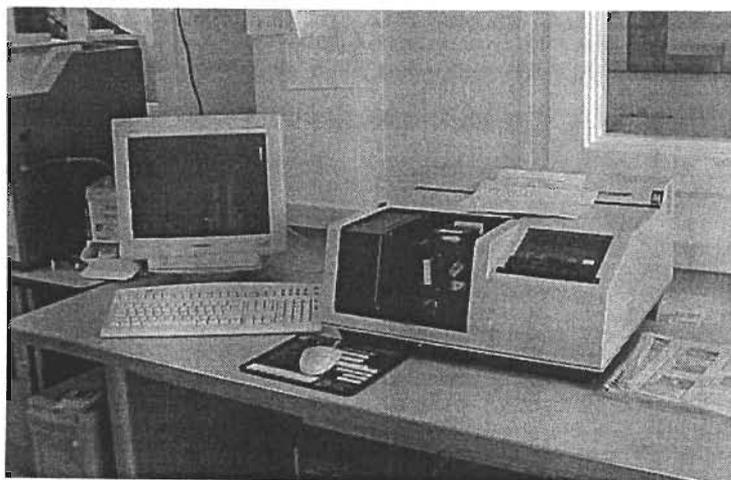


FIGURA 11
Espectroscopio de radiación Infra-Rojo.

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Después de conocer las bases y características de las técnicas a utilizar para el estudio descriptivo de la UED, el siguiente paso es la preparación de muestras. Hay que seleccionar la metodología y las condiciones adecuadas que optimicen los resultados en cada una de las técnicas. En éste capítulo se describe el desarrollo experimental que se llevó a cabo en cada análisis, las modificaciones que se hicieron durante el procesamiento de las muestras así como los equipos necesarios para cada uno de ellos. La obtención de los dientes es el mismo en todos los casos, por lo que éste paso es detallado antes de describir la metodología empleada (Microscopía Fotónica [MF], Microscopía Electrónica [ME], Rayos X [RX], Espectroscopia Infra-Rojo [IR] y Microscopía de Fluorescencia). Es importante mencionar que en la sección de Microscopía Electrónica (ME) se hace referencia de algunos antecedentes de MEB y MET que dieron la pauta para modificar la preparación de las muestras, haciendo énfasis en la importancia que tiene la fijación para conservar la matriz orgánica. Este paso fue determinante para favorecer los resultados en ésta investigación.

OBTENCIÓN Y CRITERIOS DE SELECCIÓN DE MUESTRAS.

Las piezas dentarias que se utilizaron para este estudio eran en su mayoría terceros molares incluidos en maxila o mandíbula extraídos mediante cirugía (Figura 12). Algunos otros

fueron extracciones indicadas de premolares, tanto superiores como inferiores, para realizar tratamientos de ortodoncia. También hubo algunos casos de dientes tanto anteriores como posteriores que perdieron soporte por enfermedad periodontal y sin posibilidad de tratamiento. Estas intervenciones se realizaron en la clínica de Cirugía Maxilofacial de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología.

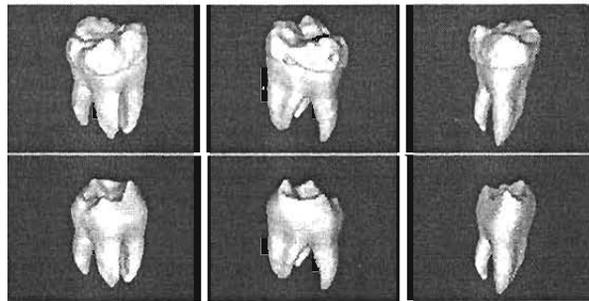


FIGURA 12

Selección de dientes, principalmente terceros molares y premolares con extracción indicada por tratamiento de ortodoncia, todos sin caries.

La selección de los dientes fue sencilla, solo se verificaba que no se presentaran ningún tipo de caries y que preferentemente no tuvieran alguna fractura coronaria. Primeramente se procedió a realizar la limpieza del diente con agua destilada, eliminando restos de sangre, sarro, fibras periodontales y periostio mediante curetas o cepillos dentales.

METODOLOGÍA PARA MICROSCOPIA FOTÓNICA.

Los cortes de los dientes se realizaron en una cortadora modelo “Jean Wirtz”, mediante un disco de diamante, cuenta con un sistema de lubricación y enfriamiento. El espesor del corte es controlado mediante un tornillo micrométrico, los cuales previamente se incluyeron en acrílico para facilitar su control al momento de manipularlos. De los cortes obtenidos, se utilizaron solamente los que tenían presente la UED (Figura 13), ya sea en la región oclusal, medio o cervical, tanto en sentido longitudinal como en sentido transversal.

Posteriormente las muestras fueron pulidas a espejo y después grabadas con ácido fosfórico al 40% y otras con ácido nítrico al 5% durante un minuto, para una mejor exposición de las estructuras, al final se lavaron con agua destilada.

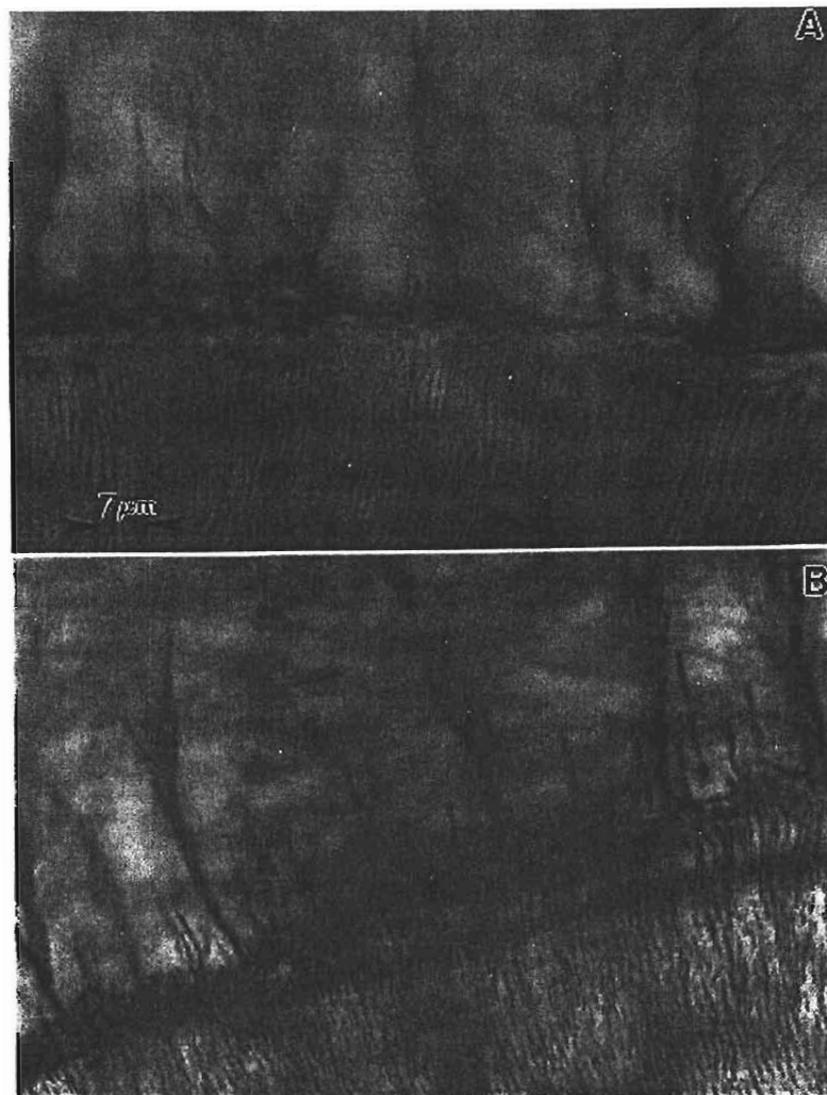


FIGURA 13

Imagen de la UED en Microscopía Fotónica.

A. La UED con luz reflejada y B. La UED con luz transmitida.

El equipo usado fue un Microscopio Fotónico “Zeiss” modelo Axiotech que cuenta con un sistema fotográfico integrado y objetivos de 5, 10, 20, 50 y 100x También se usó un Microscopio Invertido “Zeiss” modelo Axiovert 25, con objetivos de 10, 20, 50 y 100x con sistema fotográfico (IFUNAM).

METODOLOGÍA PARA FLUORESCENCIA.

Para poder observar la muestra mediante la lámpara de fluorescencia, los cortes fueron histológicos, es decir, descalcificaron con ácido fórmico, se fijaron y se incluyeron en cera, para después obtener cortes micrométricos y teñirlos. Se obtuvieron algunas imágenes (Figura 14) sin embargo, debido al ácido fórmico usado diluyó casi todo el esmalte y por lo tanto la UED. Esta técnica no proporcionó resultados relevantes de la UED.

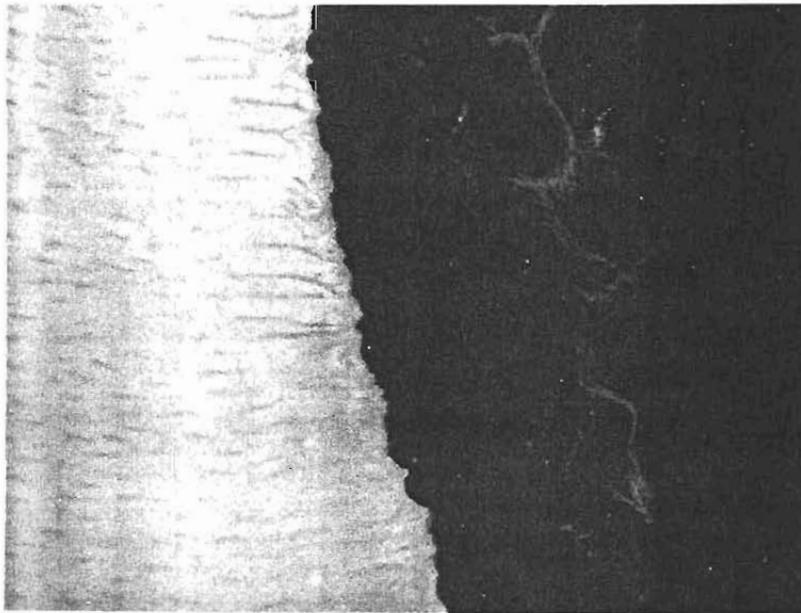


FIGURA 14

Imagen de un corte histológico de diente, visto con cámara de Fluorescencia.

Para las preparaciones histológicas se utilizó un Microtomo (Div. de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología, Depto: Patología Experimental) y el Microscopio Óptico Leica de MLS con Lámpara de Fluorescencia adaptada, obteniendo imágenes mediante un software Leica IM100V1.20 (Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía).

METODOLOGÍA PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.

Las condiciones que requiere la muestra para estudiarla mediante microscopía electrónica son más elaboradas. Los dientes también se incluyeron en resina-acrítica, se hicieron los cortes y fueron pulidos a espejo mediante lijas de diferente grosor de grano (desde 320 hasta 4000) y paños, Posteriormente se montaron en portamuestras para barrido con plata líquida, y finalmente se grabaron con ácido fosfórico y recubiertos de carbón para al final observarlos en Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), como se observa en la Figura 15.

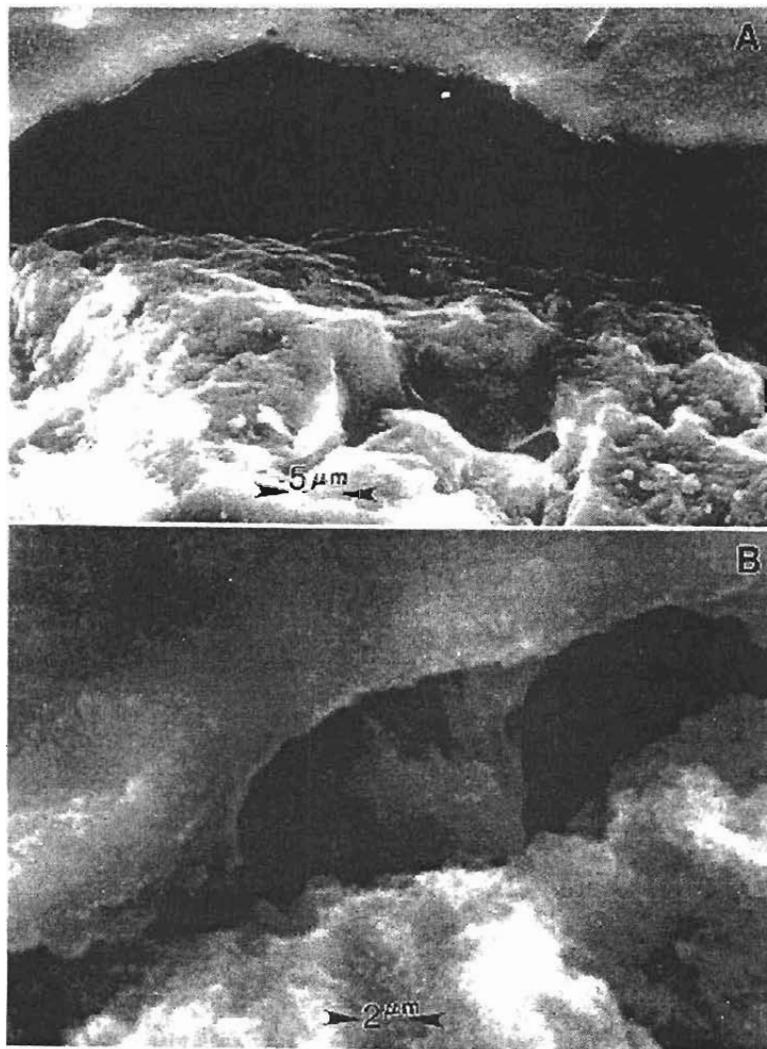


FIGURA 15

Imágenes de la UED por Microscopía Electrónica de Barrido

Los equipos usados fueron: una Cortadora modelo “Jean Wirtz”, con sistema de enfriamiento, un microtomo para obtener cortes de dimensiones exactas y el disco de diamante que garantiza un corte fino de la muestra, una Plancha térmica “Thermolyne”, una Pulidora “Buehler”, modelo Minimer, una Cámara de vacío “Sputter” o Evaporadora y el Microscopio Electrónico de Barrido Jeol 5200 con resolución de 3 nm. (IFUNAM).

Debido a que por el procesamiento de la muestra se eliminaba el material orgánico, éste se modificó de tal forma que empleando la fijación de la muestra se permitiera conservar el material orgánico presente en la UED. Por ésta razón, se buscaron métodos para la fijación del material, optando por una fijación química mediante glutaraldehído.

IMPORTANCIA DE LA FIJACIÓN CON GLUTARALDEHÍDO.

Este procedimiento era fundamental en todos los dientes ya que sin la fijación de la estructura no se lograba observar esta zona. La fijación tiene por objetivo estabilizar la estructura del tejido y alterar lo menos posible su composición. La fijación puede ser química, mediante aldehídos, o física, que se basa principalmente en el congelamiento de la muestra. En este estudio se llevó a cabo la fijación química basado en que la literatura reporta que “La fijación Química es el método más adecuado y el que generalmente se emplea para la conservación del material biológico, implica el uso de glutaraldehído y/o de formaldehído, seguidos a veces por un tratamiento de tetraóxido de osmio, llamado postfijación ” (28). Las muestras fueron fijadas con glutaraldehído, al 2.5% disuelto en una solución acuosa amortiguadora a base de fosfatos, en PBS (Phosphate Buffer Saline) a un pH que variaba entre 7.3 y 7.4. Este proceso se llevó a cabo en una campana de extracción. En sí la acción de la fijación está dada en parte por el aldehído y en parte por el solvente. El aldehído es el que reacciona con grupos químicos de los aminoácidos y se une en forma covalente con las proteínas (la mayoría de las cuales se desnaturalizan y pierden parcial o totalmente sus funciones). Por lo tanto se anulan las actividades hidrolíticas de las enzimáticas endógenas que podrían alterar las estructuras después de la detención de los

procesos vitales. En el caso del diente, al ser extraídos pierden la irrigación vascular, por esto es que la fijación tiene que ser lo más inmediatamente posible después de la extracción y de la limpieza que se le hace al diente. Una ventaja del glutaraldehído es que fija casi al instante.

Al usar glutaraldehído, como las uniones son covalentes, no se da tan fácil la hidrolización como ocurriría con el formaldehído (utilizado para hibridación *in situ* de ácidos nucleicos). La razón es que el glutaraldehído es un dialdehído, es decir, tiene dos funciones carbonilo y por lo tanto se puede combinar con dos lugares de la misma proteína (su cadena es de cinco átomos de carbono por esta razón es capaz de polimerizarse, permitiendo que los carboxilos de sus dos extremos reaccionen con aminoácidos situados a diferentes distancias, produciéndose entonces una gran cantidad de uniones covalentes, mejorando la conservación de la estructura, a diferencia del formaldehído que tiene un solo átomo de carbono, con una sola función carbonilo). Una vez estabilizado el material orgánico a estudiar, la muestra podía ser ya procesada, para después observar la UED. Después de fijar la muestra, encapsularla en acrílico, realizar el corte, el pulido y el montaje de la muestra, se hizo un ataque con ácido nítrico a diferentes intervalos de tiempo: 2, 5, 10, 15 y 25 minutos. Además como se requiere en microscopía electrónica, la muestra no debe emitir vapores y tiene que ser conductora por lo que se evapora una película delgada de algún material conductor. En este caso se recubrió con una capa fina de oro (Figura 16).

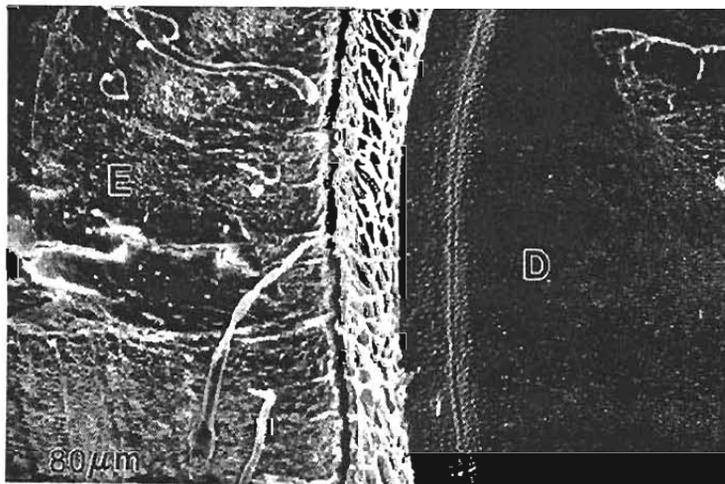


FIGURA 16

Unión Esmalte-Dentina en MEB después de fijar la muestra.

Tomando como base la metodología antes descrita, se llevaron a cabo algunas variantes o modificaciones en la técnica de procesamiento de muestras, las cuales se describen a continuación:

-En un tercer molar se realizaron cortes pequeños en la superficie del esmalte, y con pinzas se separó mecánicamente el esmalte tratando de dejar la dentina expuesta. Así se observó la UED, con una zona de esmalte como referencia de los tejidos (Figura 17).

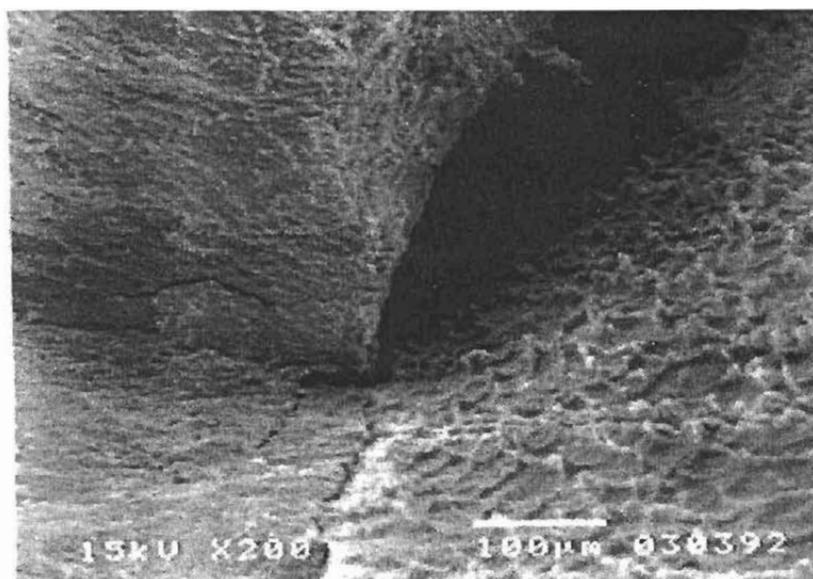


FIGURA 17

Exposición de la UED por separación mecánica del esmalte dejando una referencia del mismo; visto en MEB.

-Para obtener visible la zona de la UED, otra metodología fue desgastar el esmalte con ácido nítrico al 5%. Para determinar éste proceso se tuvieron que hacer diferentes pruebas con intervalos de tiempo diferentes. El tiempo máximo fue de 48 horas observando casi la destrucción total del órgano dentario. A 36 horas había eliminación del esmalte pero al observarlo en el microscopio la zona de la unión también había desaparecido, solo quedaba la dentina (Figura 18).

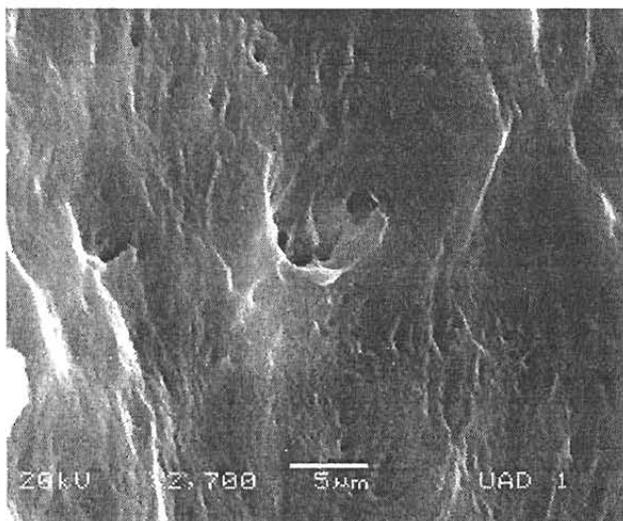


FIGURA 18

Imagen del desgaste por ácido nítrico en MEB, donde se observa también la eliminación de la UED. Solo queda dentina.

-El tiempo en que se logró ver la zona de la UED fue entre 24 y 30 horas (Figura 19). Así es como se procesaron diferentes muestras dejando los dientes en ácido nítrico, después de las 24 horas se elevaba el diente aproximadamente 1.5mm. del nivel a donde llegaba el ácido, por lo que el tercio cervical ya no se seguiría desgastando. El ataque continuaba en el tercio medio y oclusal por otras 3 horas y se volvía a elevar el diente 1.5mm. Esto dejaba también libre el tercio medio. El desgaste por 30 horas solo se observó en la zona oclusal.



FIGURA 19

Desgaste del diente con ácido nítrico, a diferentes intervalos de tiempo para el tercio oclusal, medio y cervical; visto en MEB

-Otro método que se probó para remover el esmalte fue hacer un corte en el esmalte hasta la UED y dejar los dientes durante siete días en ácido fosfórico al 40% y en ácido nítrico a una concentración menor a la que se había utilizado regularmente, es decir de 2.5%. Al observarlos en MEB, el diente atacado con ácido fosfórico había removido mucho tejido (Figura 20), eliminando la UED y dejando expuestos los túbulos dentinarios. El diente en ácido nítrico formó cristales sobre la superficie que se había ranurado como referencia. (Figura 21).

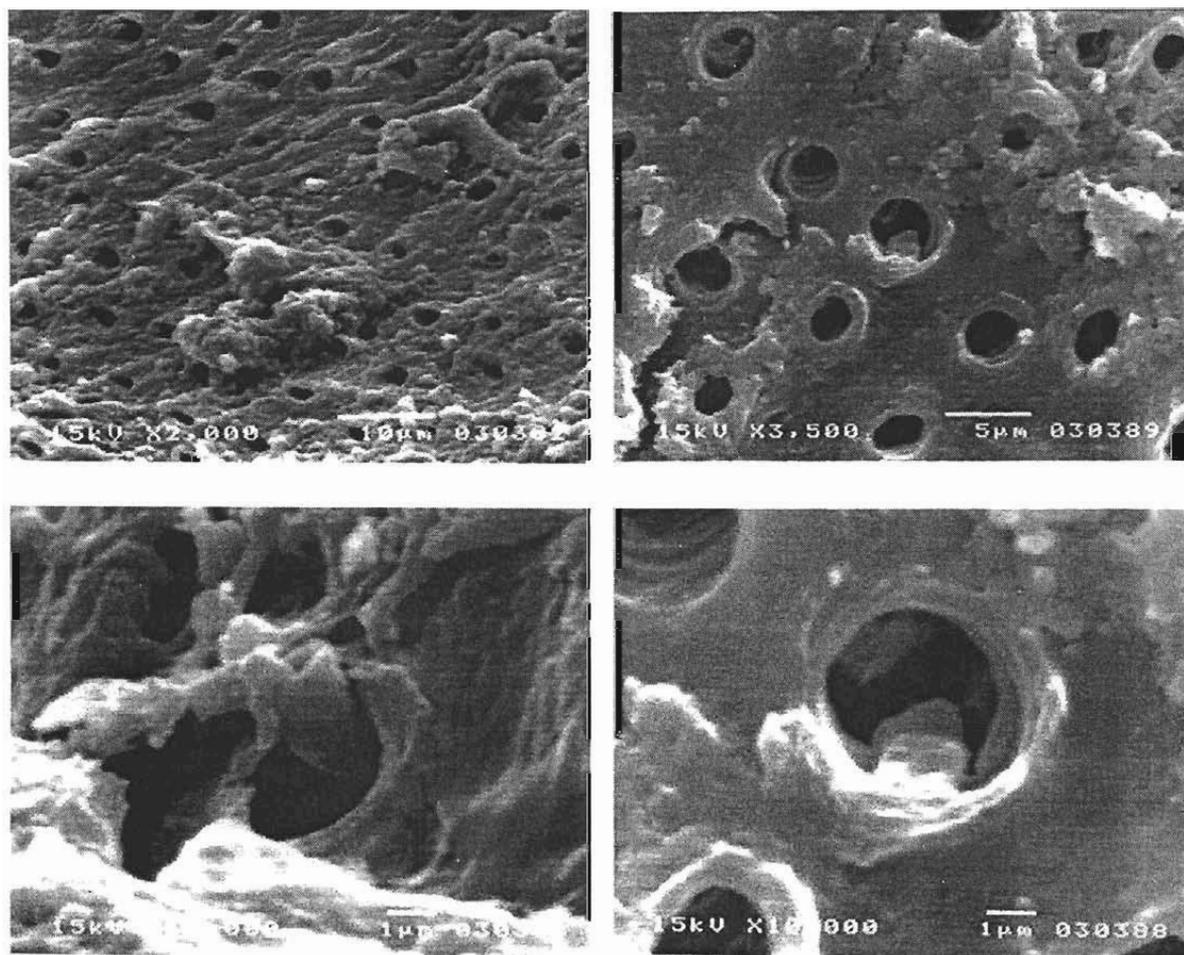


FIGURA 20

Muestra desgastada con ácido fosfórico, vista en M. Electrónica de Barrido.

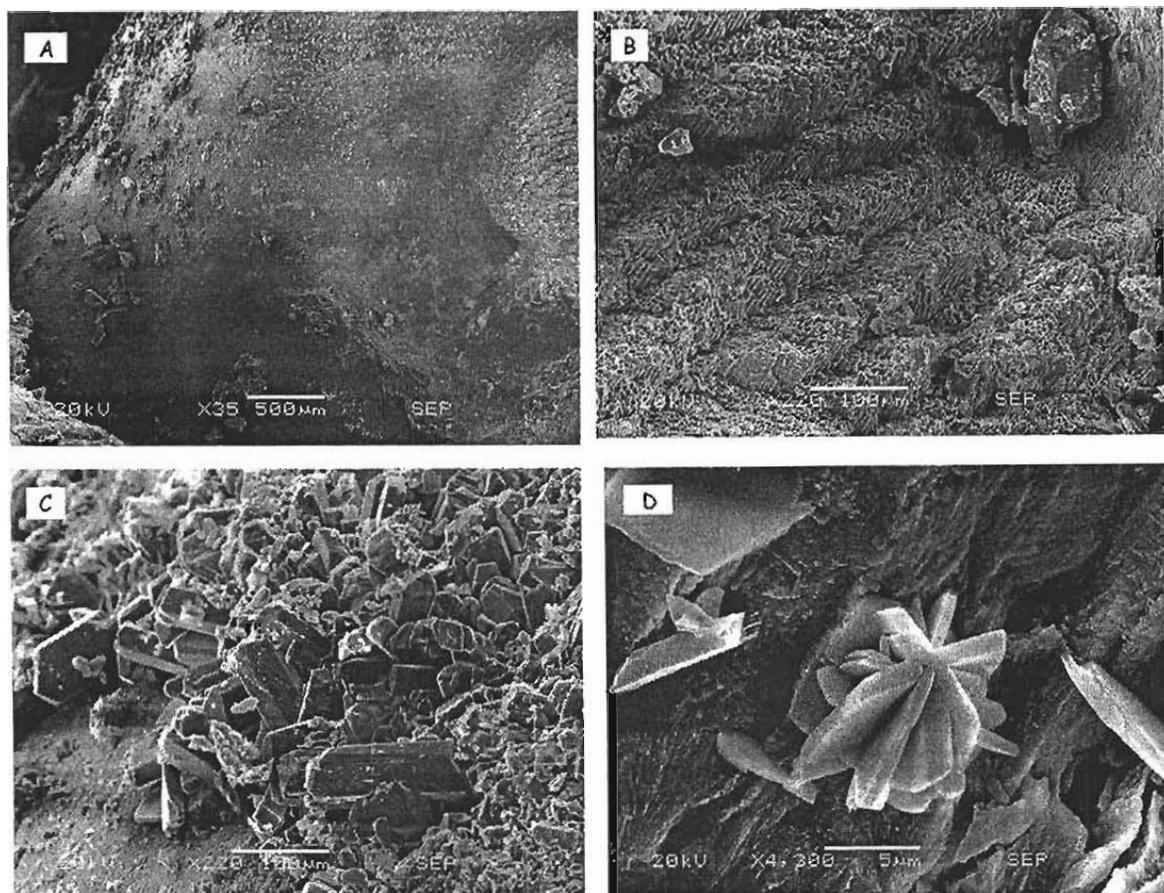


FIGURA 21

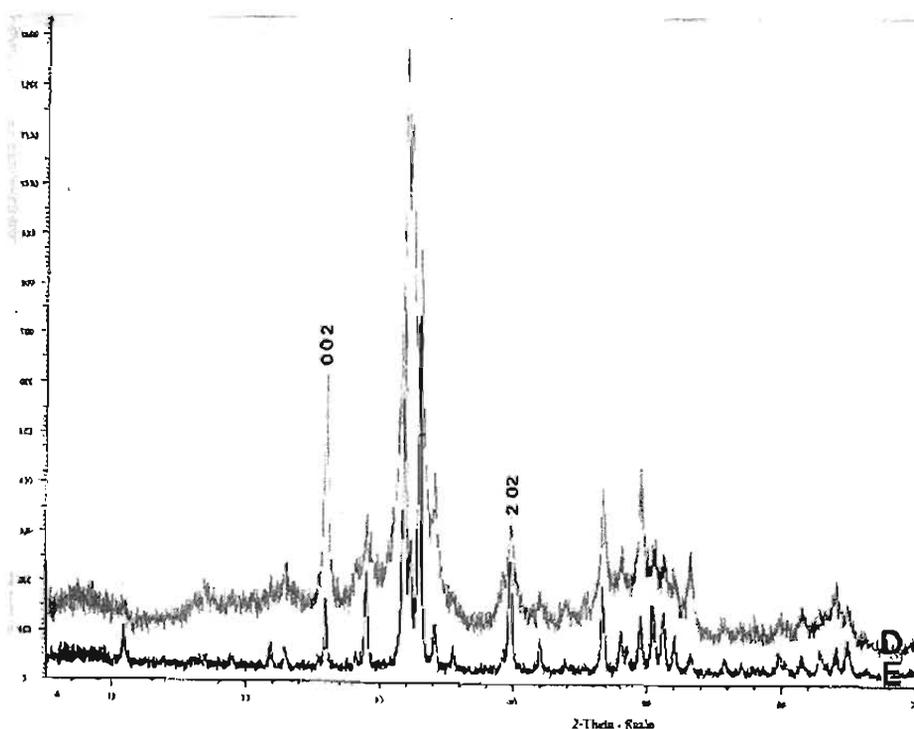
Imágenes de la muestra desgastada con ácido nítrico al 2.5% por siete días, vista en MEB.

Al observar las muestras procesadas, como resultado de la metodología antes mencionada, no se obtuvo información acerca de la UED. Esto es porque el diente se dejó por mucho tiempo en los ácidos (nítrico y fosfórico) que, aunque se decreció la concentración de los mismos, desmineralizaron el esmalte y eliminaron el material orgánico de la UED. Esta metodología no fue útil, para el objetivo perseguido, por lo que no forma parte de los resultados, sino exclusivamente de las metodologías que se experimentaron.

La Microscopía Electrónica de Barrido proporciona muchas ventajas ya que además de las imágenes, se obtiene el análisis por EDS. Esto permite conocer los elementos que se encuentran presentes y la distribución de los mismos en la muestra por medio de los mapeos químicos.

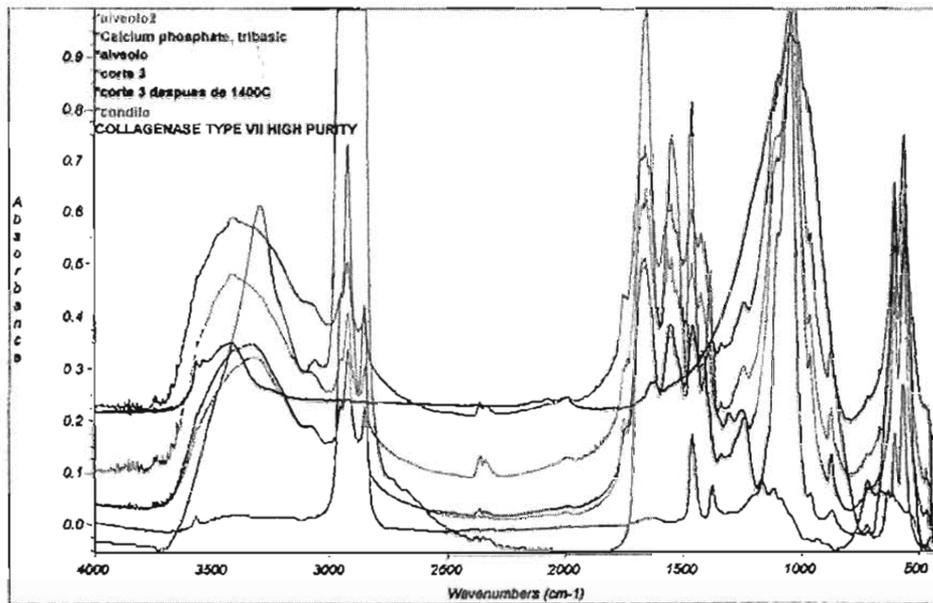
METODOLOGÍA PARA RX Y ESPECTROSCOPIA IR.

Para utilizar éstas dos técnicas las muestras se prepararon de la misma forma. Era necesario obtener polvo de la zona de la UED, por lo que primero se tenían que hacer pequeñas ranuras guías sobre la corona del diente, abarcando únicamente el esmalte, y después separarlos mecánicamente, con el objetivo de que quedara expuesta la zona de la UED y rasparla de la superficie de ambos tejidos. Esta fue una técnica que no en todos los casos resultó, por la dificultad de que se separaran exactamente en la unión. Después de obtener el polvo en cantidad considerable de dientes, era tamizado. Para tener puntos de comparación se realizó lo mismo con dentina y del esmalte por separado (Espectro 1 y 2).



ESPECTRO 1

Espectros de rayos X donde se identifican que tanto el esmalte (E) como la dentina (D) tienen hidroxapatita como base inorgánica



ESPECTRO 2

Imagen de espectros de absorbancia, obtenidos por Infra-Rojo de tejidos como cóndilo y alveolo, solo como referencia.

El Equipo de Rayos X utilizado de marca Bruler (IFUNAM) y el equipo de Espectroscopía Infra-Rojo que se empleó es modelo Nicolet FT-IR 710 (COMEX).

CAPITULO IV

RESULTADOS

En este capítulo se presentan los resultados que proporcionan los elementos para resolver el objetivo de esta investigación. Se muestran, entonces, un conjunto de resultados que permiten integrar nuevos elementos para completar más argumentos sobre la UED y la estructura altamente organizada que presenta. Como se reportó anteriormente, en la preparación de la muestra se puso gran atención en conservar el material orgánico que conforma ésta unión.

Uno de los primeros resultados se muestra en la Figura 22. En éste caso la preparación de la muestra no fue la ideal, la fijación del material no se observó uniforme y también está alterado por la disolución del material inorgánico que se realizó con ácido nítrico antes de fijarlo. Sin embargo, esto representó un buen principio porque sí se observó la UED (Figura 22A), solo que se mostró de forma irregular. Además se apreció del lado de la dentina una zona rugosa que marca los túbulos dentinarios y del lado del esmalte se identifican los prismas. En la Figura 22B (amplificación de la figura anterior) se observó mas detallada la UED; mientras que en la 22C se alcanzan a identificar algunos cristales del esmalte, que se observan como contraste de la superficie y que son los cristales que conforman los prismas. Aquí se ilustra también lo que se ha reportado como festoneado en la “unión”, dado por proyecciones que emergen de la dentina hacia el esmalte. Esto fue una observación general, en todas las muestras de la UED. Finalmente en la Figura 22D se mostró con mayor amplificación el contacto que tiene el esmalte con la dentina, mediante otro material. Porque no es un contacto directo, sino que está dado por la presencia de prolongaciones orgánicas, y que se indica con una flecha. Todo esto nos indicó la necesidad de modificar la técnica para obtener más información sobre la estructura de la UED en las siguientes muestras.

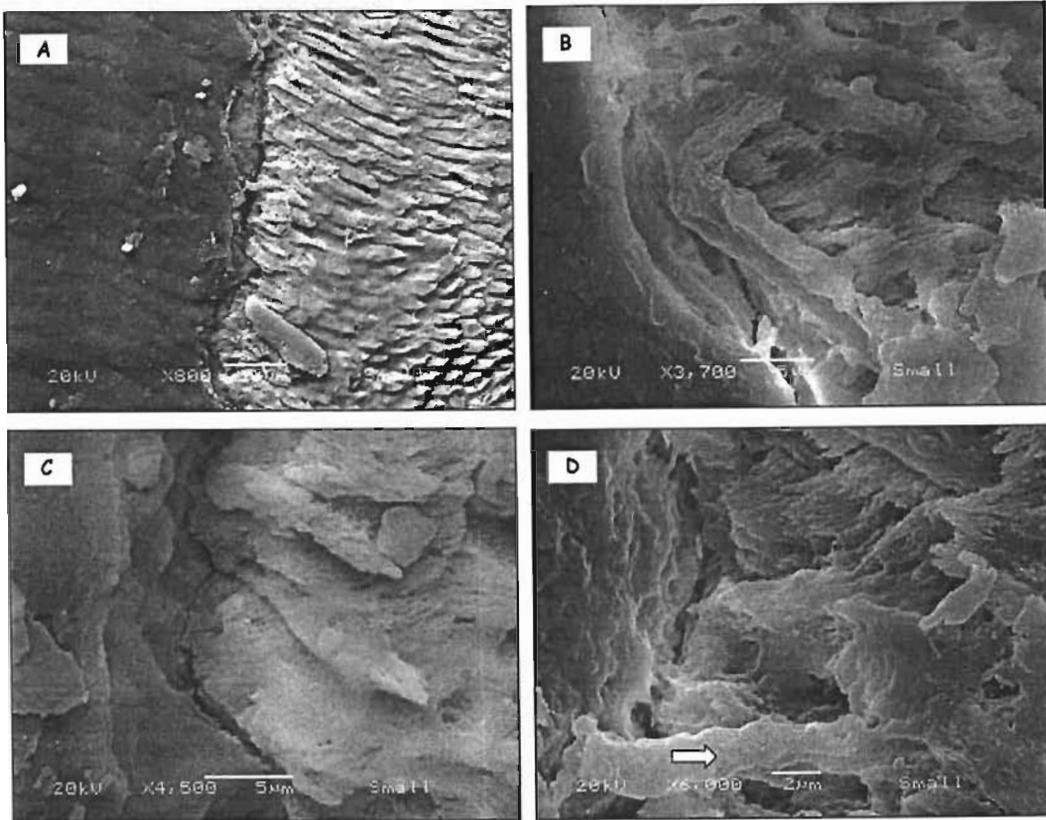


FIGURA 22

Imagen de MEB de la UED con una muestra procesada con ácido nítrico al 5% antes de ser fijada. En A, se observa la característica festoneada de la UED. En B y C se ven con detalle algunas zonas de la UED (ver texto). En D se muestra una prolongación que une a los dos tejidos, aunque entre ellos no exista contacto directo.

Se trabajaron simultáneamente preparaciones histológicas. Los resultados obtenidos de esas muestras para ser vistas en un microscopio fotónico con lámpara de fluorescencia se presentan en la Figura 23. En estas primeras imágenes se observa la superficie de la dentina. Sin embargo, en la Figura 23A no hay presencia del esmalte debido a que el diente es desmineralizado con ácido fórmico. Como se muestra en la Figura 23B también hay ausencia total de la UED. Lo que si es posible determinar es el perfil de la superficie, que es irregular y el recorrido que llevan los túbulos dentinarios.

En la Figura 24 además de observar la dentina y su unidad estructural que, son los túbulos dentinarios, se evitó la desmineralización total del esmalte y se logra observar la presencia del esmalte, tanto en la Figura 24A como en la 24B. La UED se observa festoneada como ha sido reportada en diferentes ocasiones en la literatura.

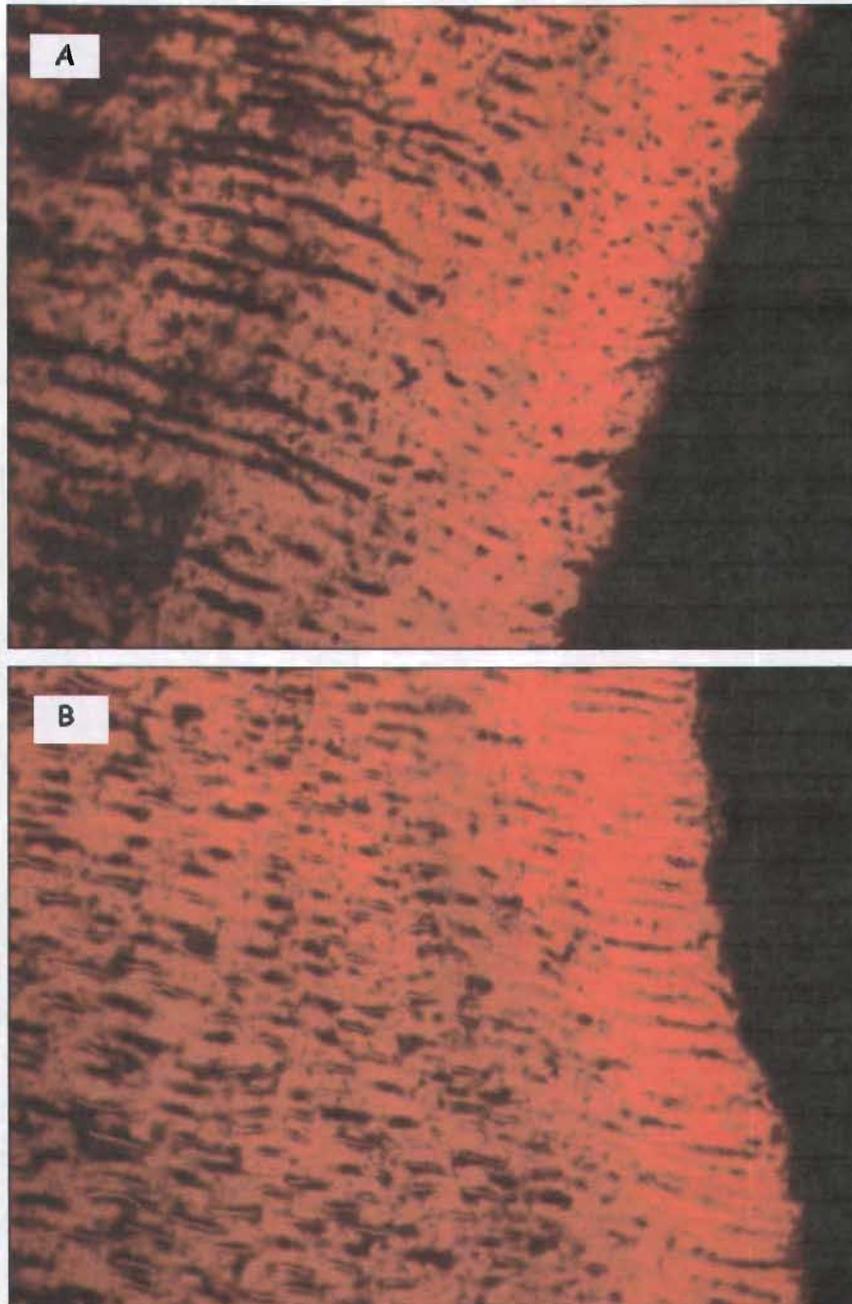


FIGURA 23

Imágenes de fluorescencia de la zona cercana a la UED. Debido al procesamiento de la muestra (corte histológico), en éste caso solo se observan los túbulos dentinarios. El esmalte y la UED fueron disueltos por completo.

Las últimas imágenes obtenidos mediante ésta técnica se presentan en la Figura 25A, en las que finalmente se logró observar el espesor de la UED, y con más claridad en la Figura 25B determinando presencia de material en la zona de unión y contacto con el esmalte. Sin embargo, es necesario mencionar que éstos resultados tienen ciertas

limitaciones debido a que aunque sí es posible observar la UED no se obtiene información mayor acerca de la estructura de la UED, como en el caso de la Microscopía Electrónica de Barrido. Por lo tanto, para continuar con el trabajo de tesis se utilizó principalmente MEB.

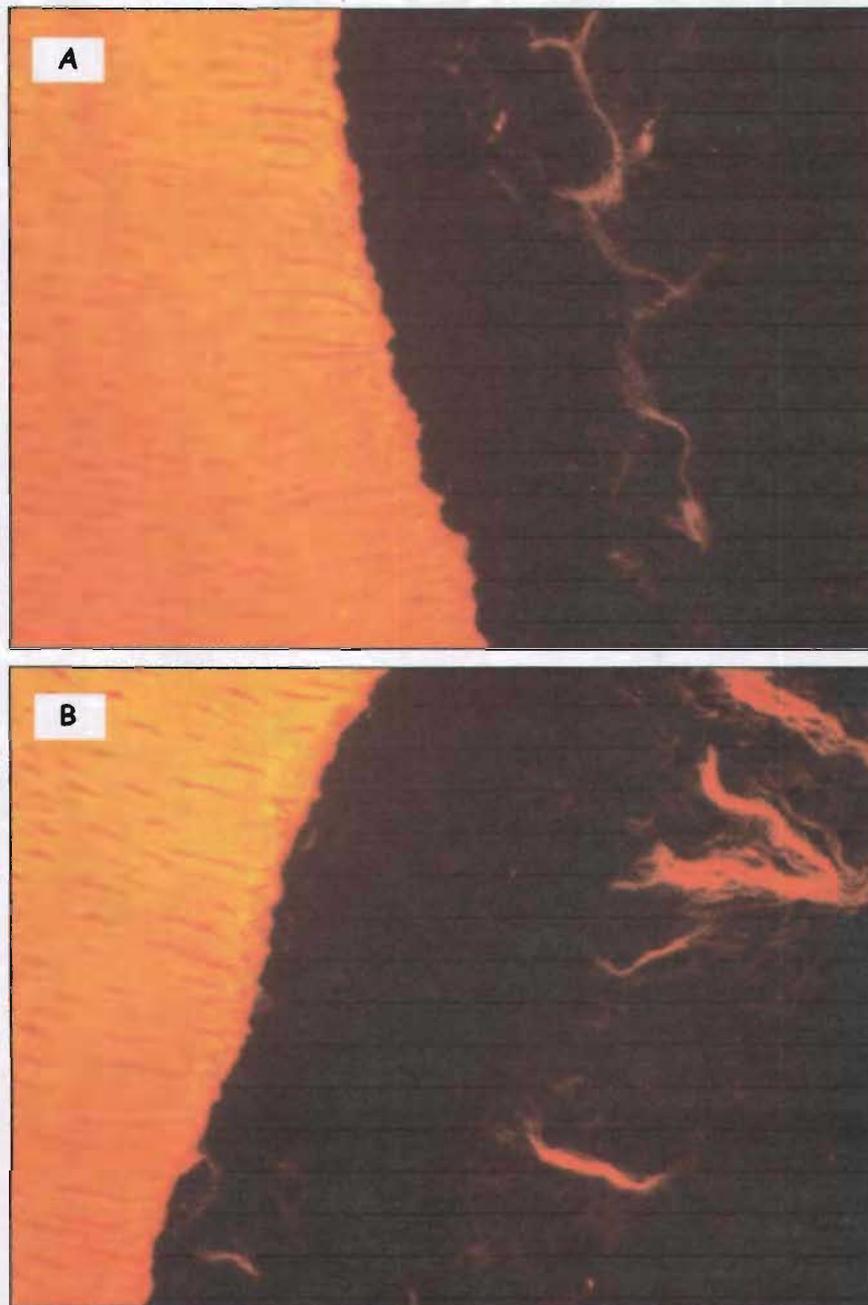


FIGURA 24

Imágenes de fluorescencia de la UED. En este caso se observa la dentina (trayectoria tubular), se aprecia el esmalte y el borde de la UED próximo a la dentina.

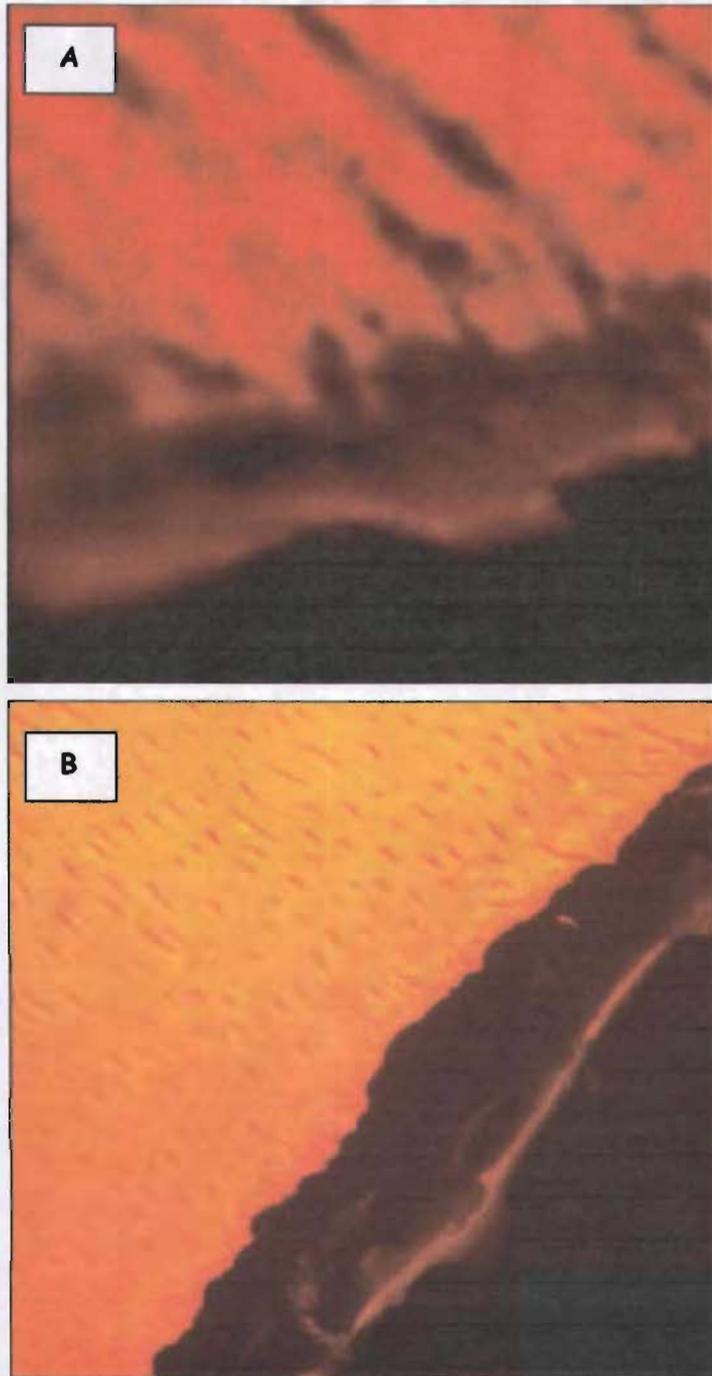


FIGURA 25

Imágenes de fluorescencia de la UED. Ahora si se observan los dos tejidos. Sin embargo, no contienen información que permita comentar algo sobre la estructura.

El interés por observar con más detalles la zona de contacto tanto de la dentina y sus unidades estructurales, que son los túbulos dentinarios, como del esmalte y los característicos prismas, resultó de la Figura 26. En esa muestra se puso especial atención

en la estructura del esmalte con el fin de identificar de forma más clara el cómo se insertan cada una de esas proyecciones que emergen de la dentina (Ver también Figura 24) y se incrustan en la zona del esmalte. Aquí se observaron también las dimensiones de los prismas respecto a las escalas obtenidas en el MEB, y se pueden comparar con las dimensiones que tiene cada una de las concavidades que dan lugar a la forma festoneada de la UED. Es fácil determinar que las dimensiones entre las terminaciones que emerge de la dentina no coinciden con los extremos de esa concavidad y con el espacio interprismático de cada prisma, sino que abarca varios de éstos. Esto es posible observarlo en la Figura 26A y 26B. En ésta última, la barra de la escala representa 10 μm . En la Figura 26C y 26D se aprecia que parte del material inorgánico ha sido diluido, exponiendo la forma de ojo de cerradura de los prismas. Además de que la vaina, que es la parte que cubre los prismas, aparece como una protuberancia, como se señala en la 26D con una flecha.

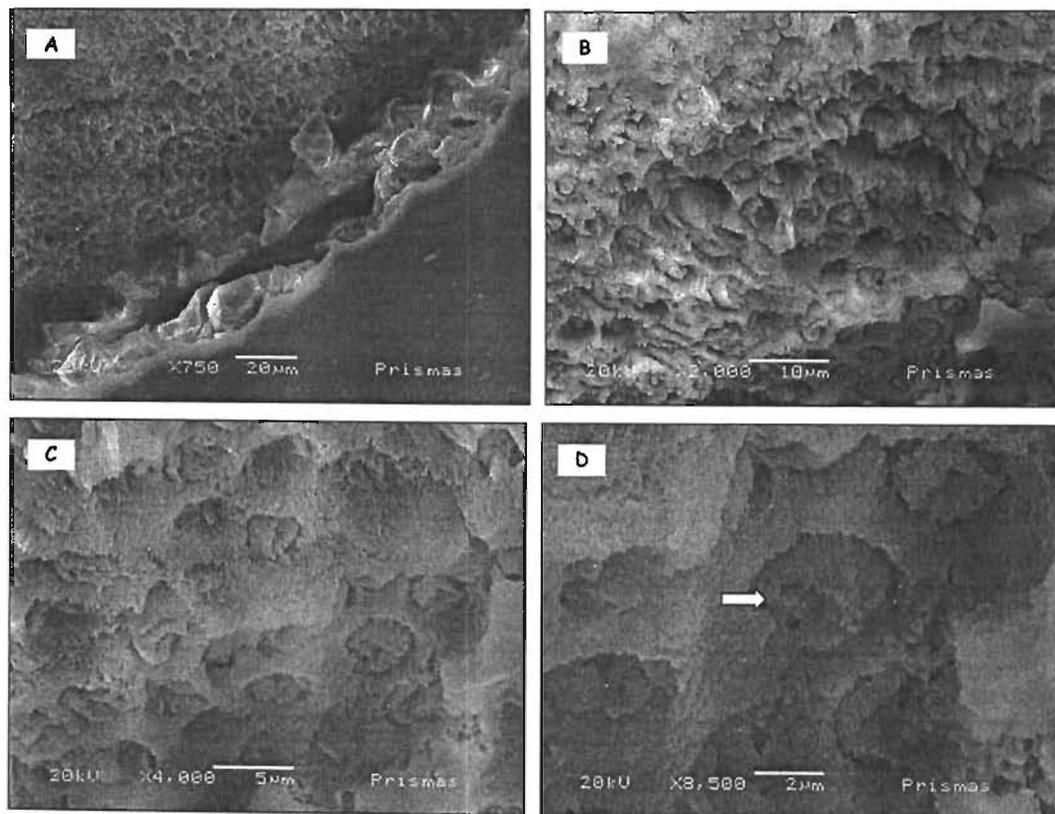


FIGURA 26

Imágenes de MEB de la UED con un procesamiento de la muestra mediante ácido nítrico y la fijación previa con glutaraldehído. Obsérvese el ataque preferencial que se ha dado a los prismas del esmalte y que dio como resultado la eliminación de material inorgánico

Este resultado indica que el procesamiento experimental de la preparación de la muestra va siendo cada vez más favorable porque los componentes orgánicos están visibles en ésta muestra mientras que parte del componente inorgánico ha sido diluido.

Una vez que se observó el esmalte, lo que corresponde ahora es ver la superficie de contacto de la dentina, que al parecer es la que determina en mayor parte la estructura que tiene la UED. Ahora la muestra, a la que se le hizo un corte en la superficie del esmalte, estuvo sumergida por unas horas en ácido nítrico, logrando que se separara una pequeña porción del esmalte, y permitiendo visualizar lo que es la zona de contacto entre los dos tejidos. Esto se observa en la Figura 27. En 27A solo se muestra la zona en donde se hizo el corte, y en la 27B ya se aprecia la porción de esmalte que se desprendió. Entonces en la Figura 27C se muestra una amplificación y está presente lo que sería la UED, caracterizada por protuberancias o extensiones de material orgánico. Una mayor amplificación se muestra en la Figura 27D. Esto se puede traducir en que la UED es más visible sobre la superficie de la dentina que en el esmalte debido a que esas extensiones que están presentes son de origen orgánico. Por lo contrario, si su base estuviera en el esmalte (que tiene mayor contenido de material inorgánico), al momento de separarse los tejidos, permanecerían del lado de éste. Pero la zona de contacto del esmalte sólo se aprecia rugosa. Una vez obtenido éste resultado, ahora es necesario saber si ésta red de material orgánico se presenta en toda la superficie del diente, porque las observaciones anteriores solo fueron en la zona oclusal.

Con esta aportación acerca de la conformación de la UED, observada en la superficie oclusal, el siguiente paso es identificar si esa misma estructura orgánica está presente en toda la interfase esmalte-dentina. Por lo tanto se preparó la siguiente muestra con un método que permitiera la separación ya no solo de una porción del esmalte, sino de toda la corona. Así, después de la fijación de la muestra se realizaron cortes guías en el esmalte hasta la UED y se desprendió mecánicamente con unas pinzas dejando solo una pequeña porción de esmalte para tenerlo como referencia de los tejidos a observar. Las imágenes se presentan en la Figura 28, en donde ciertamente es la superficie de la dentina con una textura que aparenta una red. En la Figura 28A se muestra parte del diente sin esmalte y otra en la que se dejó el esmalte. En él incluso se alcanza a ver el contraste dado por los prismas y también se observa la exposición de la dentina que contacta con el esmalte, unidos por medio de esa red de UED que de alguna manera los mantiene unidos, abarcando toda la corona del diente. Para conocer más acerca de la estructura de esta red

en la Figura 28B se presenta una ampliificación de la misma zona (cerca de la región cervical). Sin embargo no se alcanza a distinguir si ésta red presenta las extensiones que sobresalían de la superficie dentinaria como se mostraba en la figura anterior. Esto explica que esas prolongaciones tienen mayor altura en la superficie oclusal que en la cervical; lo que se traduce que están dadas por la fisiología natural del diente, es decir, que en la superficie oclusal que es la zona donde las fuerzas de masticación son muy fuertes, también es la zona que requiere más estabilidad. Además esas “concavidades” parecen ser de mayor área entre cada retícula. Esto también se ve influido por el grosor del esmalte, que en la región cervical es más delgado que en cualquier otra zona de la corona del diente.

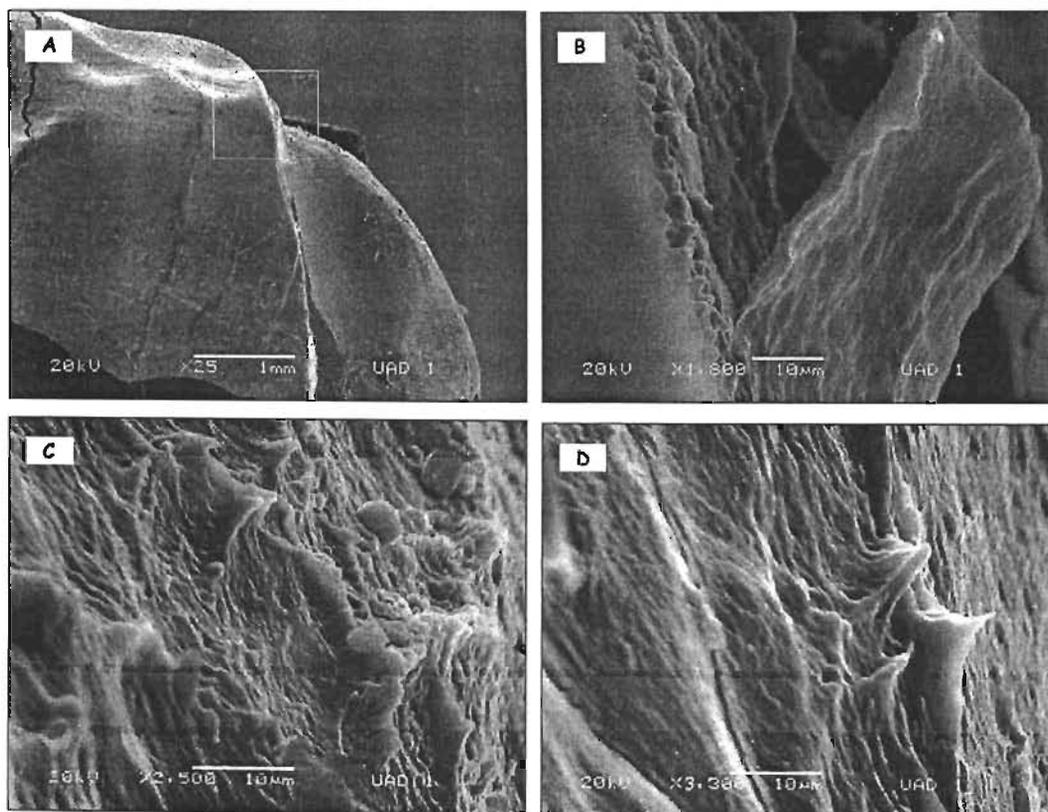


FIGURA 27

Imagen de MEB donde se aprecia la zona de contacto de parte de la dentina (B). Se observan aquí protuberancias o extensiones que presenta el material orgánico. En (D) se muestra una mayor ampliificación de (C).

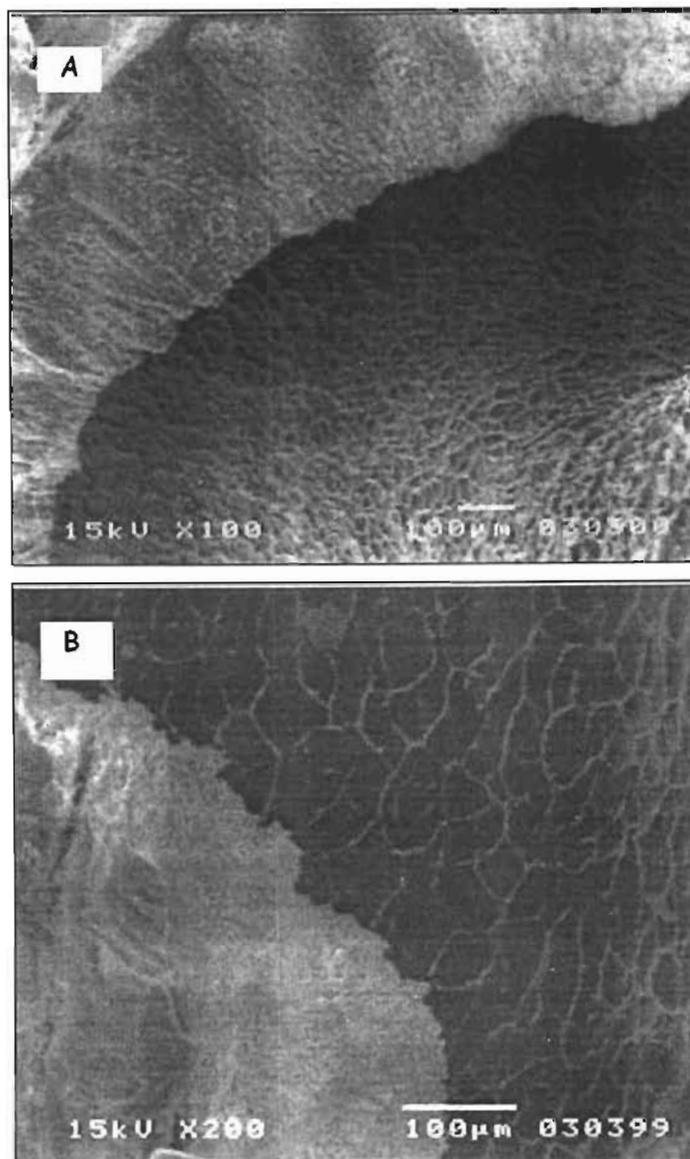


FIGURA 28

Imagen de MEB de la UED en la zona de contacto con la dentina. En este caso la muestra fue procesada después de la fijación mediante cortes en la superficie del esmalte hasta la UED y separado mecánicamente dejando una porción de esmalte. Obsérvese el arreglo reticular del material orgánico.

Con la preparación de las muestras siguiendo la misma metodología que se llevó a cabo en los resultados de la Figura 28, se obtienen los resultados que se muestran en la Figura 29A, pero en ésta ocasión se observó la superficie oclusal con la finalidad de corroborar si en ésta zona, que sería la zona de trabajo principalmente, las terminaciones que emergen de la dentina son extensiones más significativas que las que se observaron en cervical. En la Figura 29A se observa el mismo arreglo reticular que en la Figura 28, pero

a mayor amplificación en el caso de las Figuras 29B y 29C. Se puede apreciar aquí que el entrecruzado reticular es más pequeño. Además, las extensiones de material orgánico o prolongaciones presentan una altura considerablemente mayor que las vistas en la región cervical. Estas prolongaciones que emergen de la dentina, conforman la UED y se organizan de tal forma que se introducen en ciertas zonas interprismáticas del esmalte. La estructura reticular, se observa en oclusal de mayor altura y más estrecha, esto se debe a que el diente requiere estabilidad y el soporte en el área donde se lleva a cabo la masticación sin que los tejidos se separen o se dañen. Aunque la unión parecería ser uniforme en toda la corona del diente, en el tercio cervical existe la unión pero con variaciones morfológicas dependientes de la función.

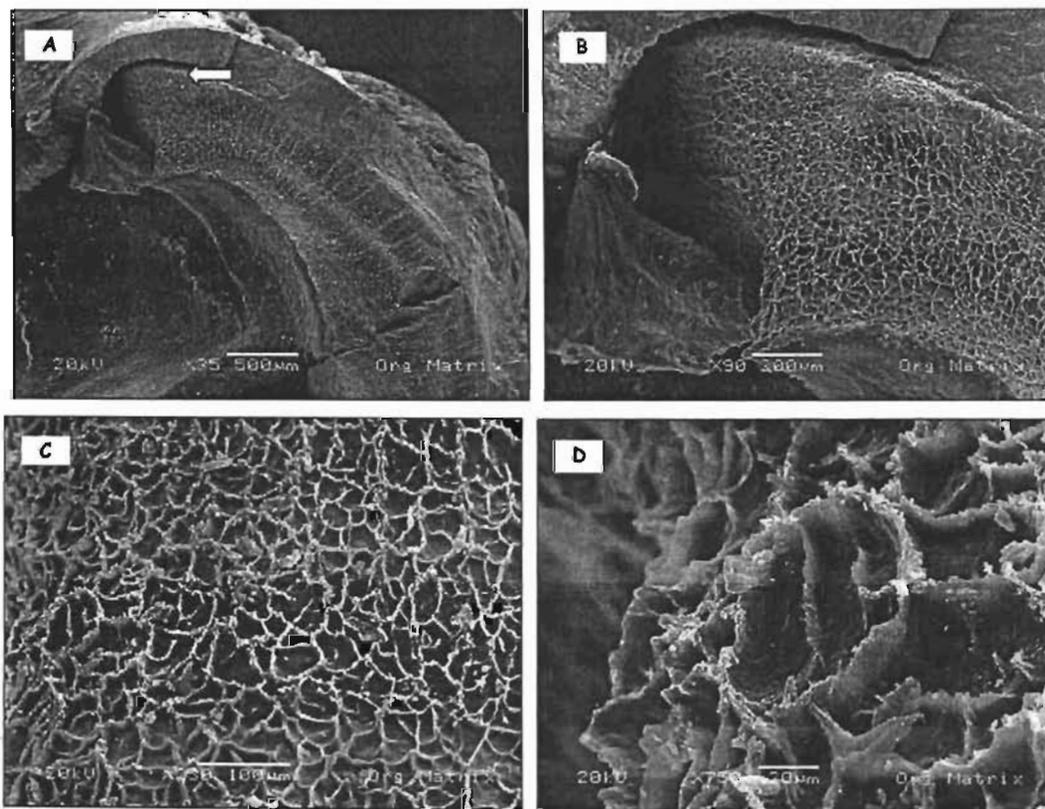


FIGURA 29

Imagen de MEB de la UED viendo la superficie de la dentina que contacta con el esmalte en la zona oclusal. El arreglo reticular del material orgánico y las dimensiones varían con respecto a la zona cervical (ver la figura anterior).

Continuando con el estudio de la estructura orgánica de la UED, las imágenes mostradas en la Figura 30 presentan con mayor detalle la forma y dimensiones de la estructura que asemeja una red. En este caso, además de ver la forma en que se organizan esas extensiones que emergen de la dentina, se hicieron mediciones de la altura que tienen en

oclusal, y estas corresponden al rango de los 10 y 17 μm . Esta estructura reticular es, entonces, lo que está produciendo la unión del esmalte y la dentina, y se ha organizado de acuerdo a las características físicas que tiene cada tejido, adaptándose a las estructuras de tal forma que no se separen.

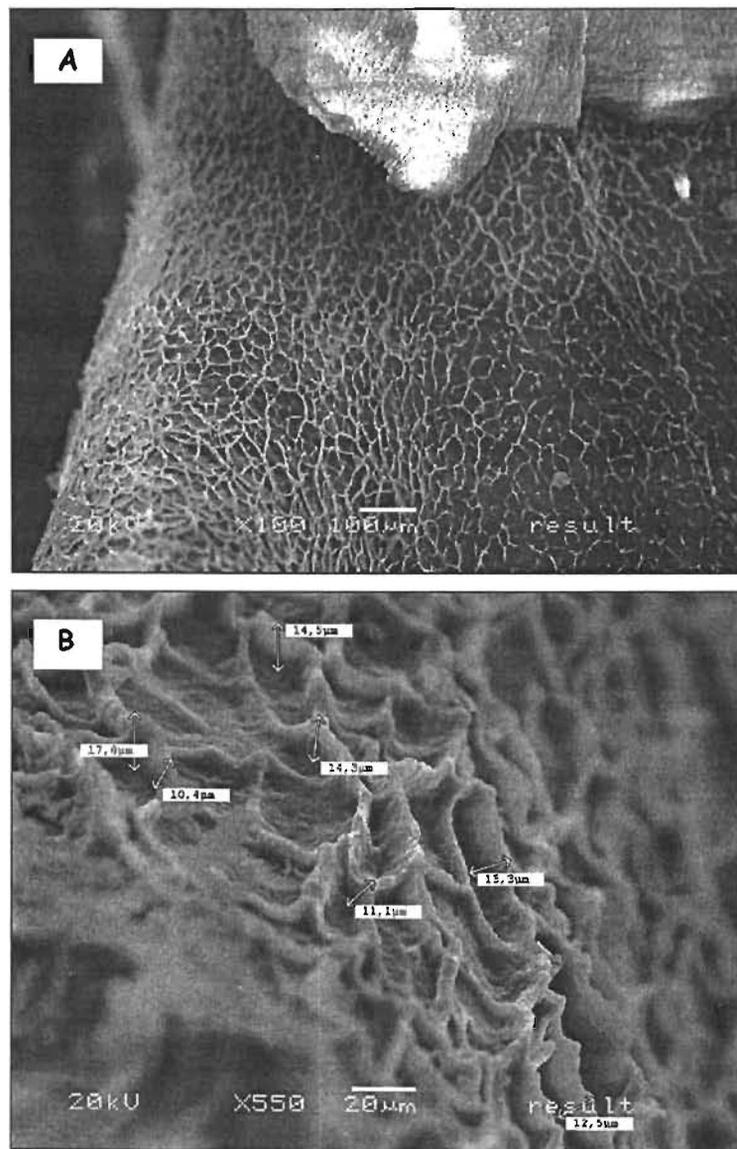


FIGURA 30

Imagen de MEB de la estructura orgánica reticular de la UED. Obsérvese en este caso las dimensiones de la red orgánica que se presenta.

En la Figura 31 se muestra y demuestra que ciertamente esas extensiones de material orgánico son propiamente la UED y que su conformación es la ideal para mantener la unión de dos tejidos distintos. Esto implica que también las características de las

superficies de contacto tanto del esmalte como de la dentina tienen gran funcionalidad. Esto es, las prolongaciones que se han descrito, forman un arreglo reticular y en el centro de cada una de las retículas existen áreas en las que parecería que ahí no hay ningún material de unión. Sin embargo, como se muestra en la Figura 31B, en la que se hace un acercamiento del centro de la concavidad de la red, se observa ausencia del material que hasta ahora se ha identificado. Pero las características de ésta superficie de alguna manera también contribuyen y son parte importante en ésta unión. Esto se deduce de la rugosidad que presenta ésta superficie. Lo mismo se observa del lado del esmalte. Si éstas fueran superficies lisas, entonces no existiría un mecanismo completo de unión que se registra en ésta zona.

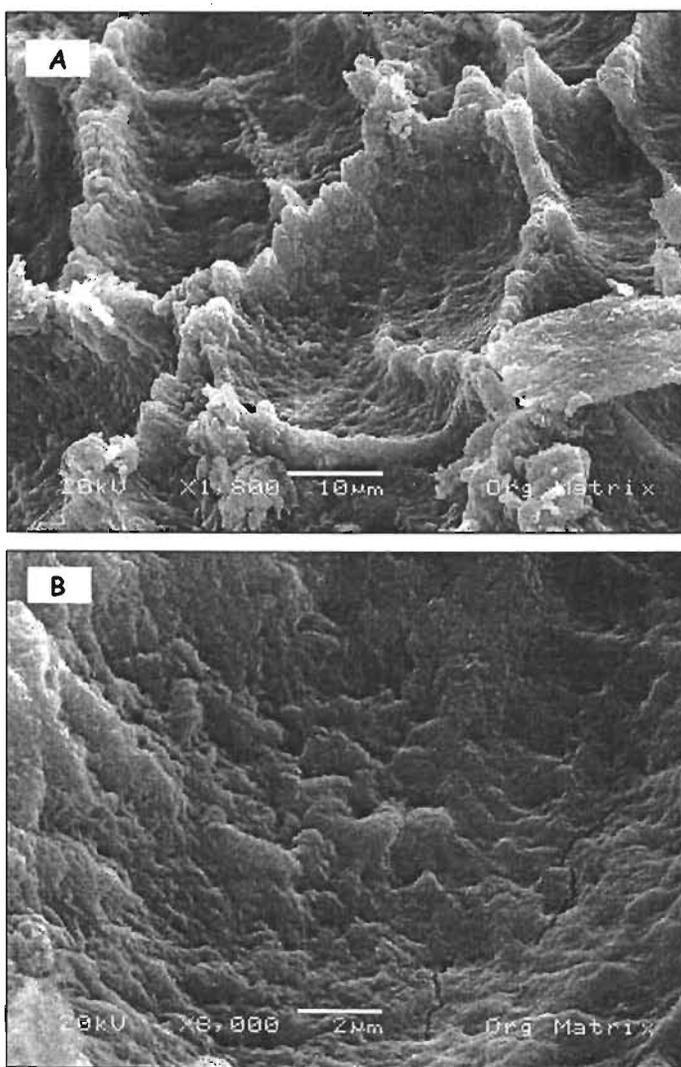
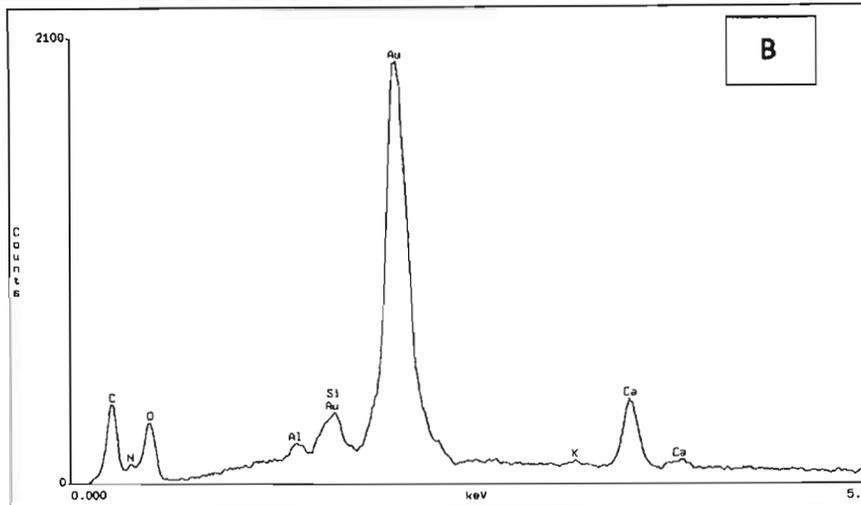
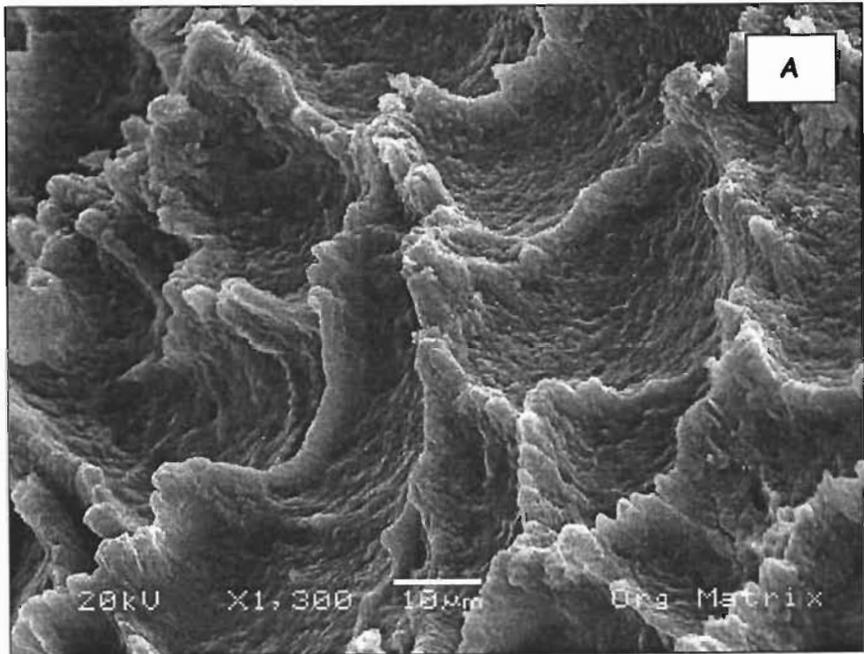


FIGURA 31

Imagen de MEB de la superficie de contacto de la UED sobre la dentina. Nótese la rugosidad de la zona.

Una vez que se tiene conocimiento de la estructura orgánica de la UED, el siguiente paso es conocer su composición química. Para esto fueron analizadas las zonas de contacto de la UED por microanálisis de rayos X característicos (EDS) en MEB y los resultados se presentan en la Figura 32. El análisis de EDS se hizo del área que se muestra en la Figura 32A, y los resultados se exponen en el espectro de la Figura 32B (Esquema 3). La composición química corresponde principalmente a carbono (C), oxígeno (O) y nitrógeno (N), además de calcio (Ca) y un pico de oro (Au). Este último elemento está presente por el recubrimiento que se le realizó a la muestra, como ya se describió en la metodología, con el objetivo de que sea conductora. El porcentaje de la composición química, tanto en peso atómico como en peso molecular, se presenta en la tabla de la Figura 32C. Aquí se observa que el porcentaje mayor corresponde a carbón en un 41.36%, el oxígeno en un 30.13%, y el nitrógeno en un 16.23%. Éstos son los componentes principales de materiales orgánicos. Por lo tanto, éstos resultados confirman que esas protuberancias que se han estado observando en las imágenes anteriores sí corresponden a material orgánico, que permanece entre dos tejidos inorgánicos con la finalidad de mantenerlos en contacto. Esto es lo que conforma a la UED principalmente.

En la Figura 33 se presenta igual que en los resultados de la Figura 32, un análisis EDS del área de la UED. La diferencia en este caso radica en que en esta muestra no se hizo el recubrimiento de oro con la finalidad de observar si es que la película conductora estuviera interfiriendo con algún elemento y modificara los resultados del estudio químico. Esto fue visto en un MEB de Bajo Vacío, que mediante electrones retrodispersados permite la observación de muestras sin recubrimiento. El resto del proceso de la preparación de la muestra fue el mismo y se hizo el análisis químico del área que se muestra en la Figura 33A. El espectro de EDS resultante es el que está en la Figura 33B (Esquema 4). Los resultados que se obtuvieron son similares al anterior. Se observaron picos de los elementos carbono (C), oxígeno (O) y nitrógeno (N); además de sodio (Na), magnesio (Mg), aluminio (Al), silicio (Si), fósforo (P), cloro (Cl) y calcio (Ca). El calcio y el fósforo están presentes porque, como ya se mencionó durante las características de la dentina, éste tejido presenta una base inorgánica que corresponde a hidroxiapatita. Al observar el porcentaje atómico de la Figura 33C es importante destacar que principalmente se registran las concentraciones de carbono (C) y oxígeno (O). Una vez más, son los que tienen mayor concentración en esta zona ya que son los característicos del material orgánico.

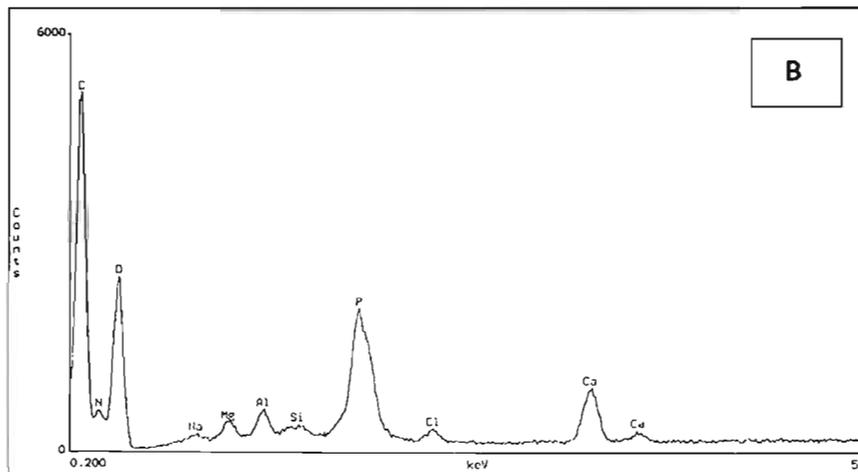
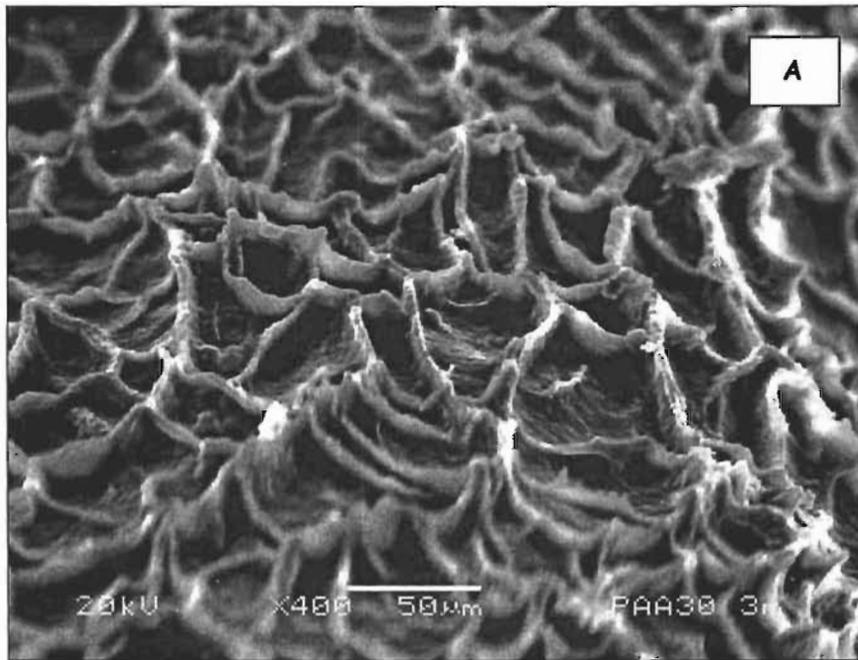


ESPECTRO 3

Element	k-ratio (calc.)	ZAF	Atom %	Element Wt %
C -K	0.0526	3.212	41.36	16.88
O -K	0.0296	5.537	30.13	16.39
Al-K	0.0024	1.604	0.43	0.39
Si-K	0.0075	1.310	1.03	0.98
K -K	0.0015	1.374	0.15	0.21
Ca-K	0.0284	1.260	2.63	3.58
Au-L	0.4007	1.344	8.04	53.85
N -K	0.0133	5.817	16.23	7.73
Total			100.00	100.00

FIGURA 32

Análisis de EDS (B) del área mostrada en la imagen de MEB de la estructura orgánica en (A). El porcentaje de cada elemento en el espectro se presenta en la tabla (C) tanto en porcentaje atómico, como en porcentaje en peso. Superficie recubierta con una película delgada de oro (Au) para su observación por MEB.



ESPECTRO 4

Element	k-ratio (calc.)	ZAF	Atom %	Element Wt %
C -K	0.1870	2.116	47.61	39.57
O -K	0.0777	5.730	40.21	44.52
Na-K	0.0000	2.954	0.00	0.01
Mg-K	0.0028	2.080	0.34	0.58
Al-K	0.0043	1.699	0.39	0.73
Si-K	0.0033	1.420	0.24	0.47
Cl-K	0.0043	1.219	0.21	0.52
Ca-K	0.0242	1.143	1.00	2.76
R -K	0.0121	7.715	9.67	9.57
P -K	0.0000	1.321	0.00	0.00
Total			100.00	100.00

FIGURA 33

Análisis de EDS (B) del área mostrada en la imagen de MEB de la estructura orgánica en (A). El porcentaje de cada elemento mostrado en (B) se presenta en la tabla (C), tanto en porcentaje atómico como en peso. Esta superficie no presenta cubierta de Au como en el caso de la Figura 32.

Para corroborar los resultados de EDS obtenidos se hizo un mapeo químico mediante el cual se va a identificar la distribución de cada elemento sobre la superficie de la zona de contacto de la UED. Esto se muestra en la Figura 34, en donde se identifican las áreas en las que están presentes el carbono (C), oxígeno (O), nitrógeno (N), calcio (Ca), fósforo (P) y potasio (K). En caso del carbono, éste proviene principalmente de las zonas que conforman la red, lo mismo ocurre con el oxígeno.

Se ha señalado con una flecha una de las zonas donde están algunas de las extensiones de la estructura orgánica y se observan así de una forma más clara los elementos que la conforman. El fósforo y calcio están sobre la superficie dentinaria, mientras que el potasio se observa con una distribución uniforme aunque es muy pobre la señal, por lo que no sería una contribución importante.

Un detalle que se muestra en la imagen de electrones secundarios es que se puede observar restos de esmalte, que pudieron haberse quedado unidas durante la separación del esmalte ya que se hizo mecánicamente. Estos restos de polvo muestran mayor concentración de calcio (Ca), fósforo (P) y oxígeno (O). El polvo se ha marcado también con una flecha. Esto confirma una vez más que el material de unión es principalmente orgánico a diferencia del esmalte y la dentina.

Se realizaron otros mapeos de diferentes zonas de la UED y de otros dientes. Como se muestra en la Figura 35, de la misma forma que los resultados anteriores, se corrobora la presencia del carbono (C), oxígeno (O) y nitrógeno (N), componentes del material orgánico que constituye la unión entre esmalte y dentina. También en éste caso se identificó sodio (Na) y magnesio (Mg), en la cual se observan las extensiones que emergen de la dentina y que los elementos que están presentes en estas estructuras constituyen una matriz orgánica, aunque el sodio (Na) y el magnesio (Mg) presentan siempre una distribución uniforme. También está el calcio (Ca), que a diferencia del sodio y el magnesio, se concentra en algunas zonas fácilmente localizables debido a la presencia de las partículas de esmalte que permanecieron en la muestra.

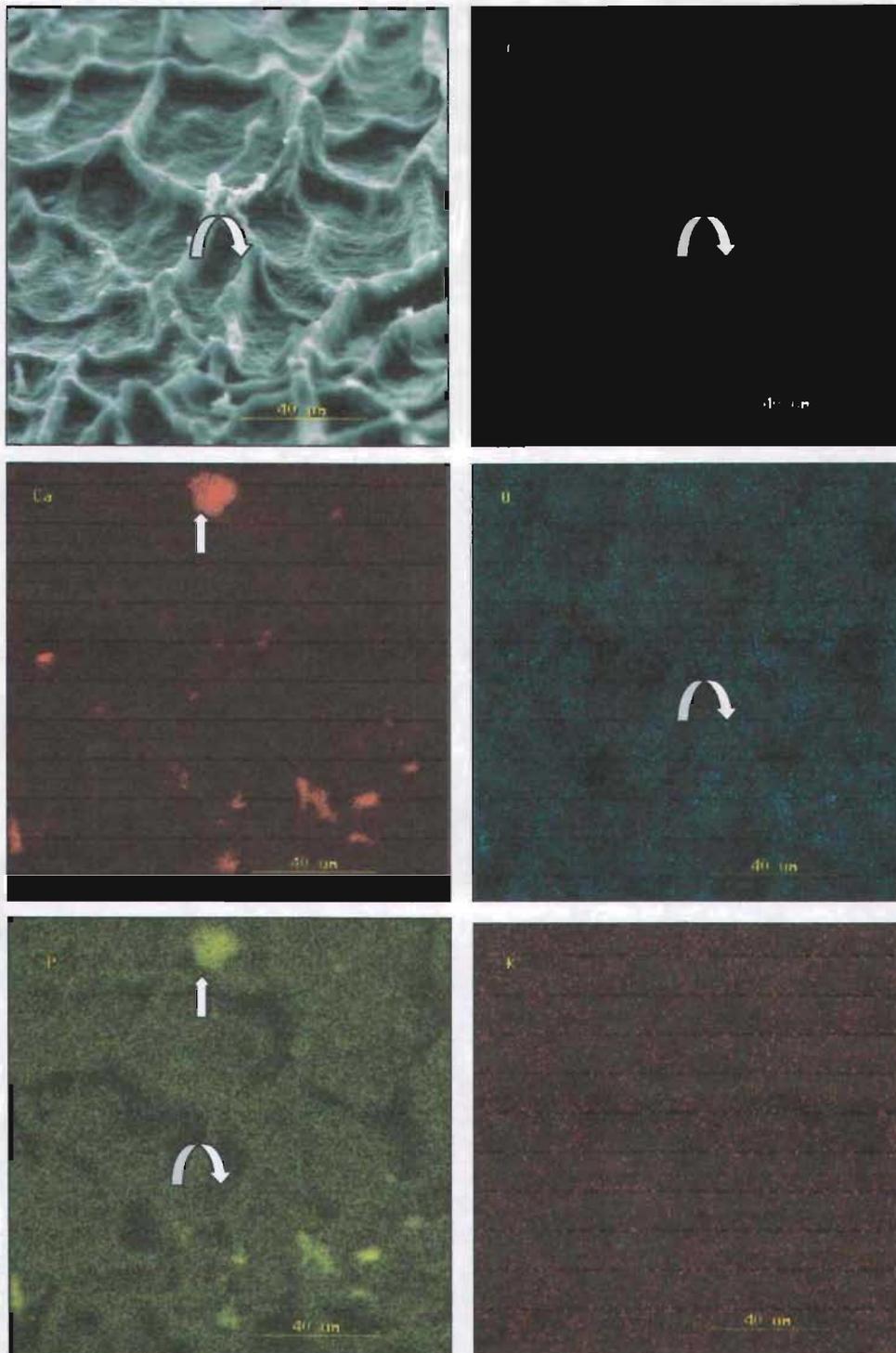


FIGURA 34

Mapeo químico de los elementos registrados en los análisis mostrados en las Figuras 32 y 33. Además de mostrar la imagen de MEB de electrones secundarios, se muestran los mapeos para C, Ca, O, P, y K de la zona. Nótese la presencia de partículas de polvo de esmalte.

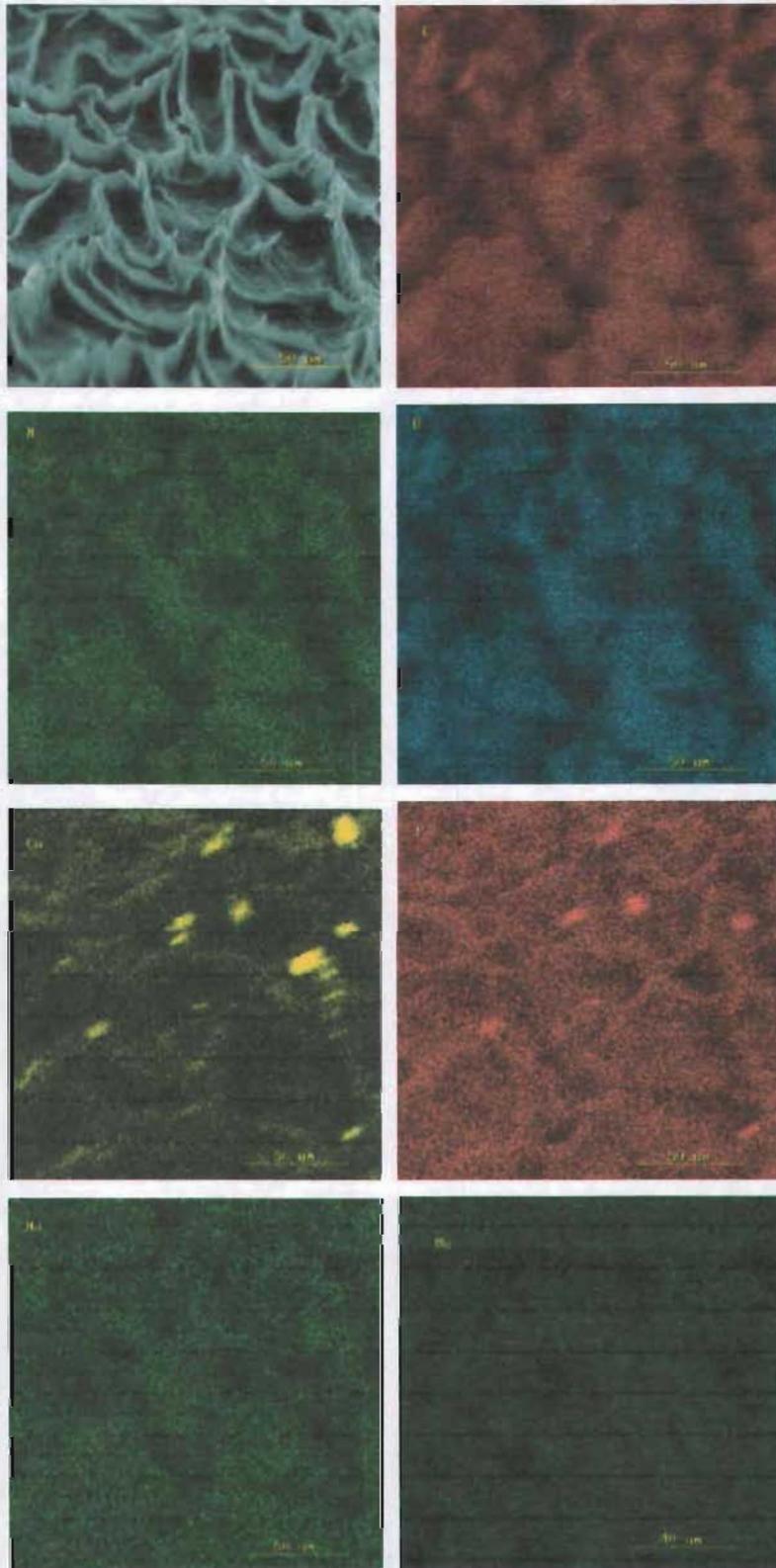


FIGURA 35

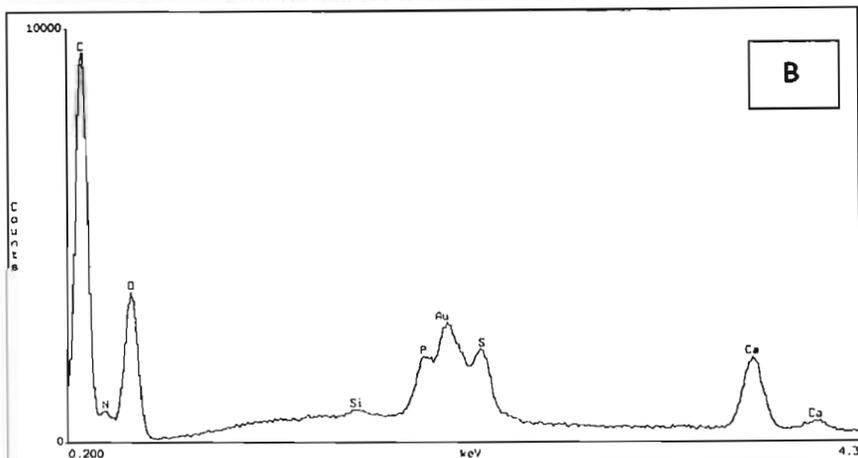
Mapeo químico por EDS de los elementos C, N, O, Ca, P, Na y Mg de la estructura de la zona de contacto mostrada en la imagen de MEB. Nótese el polvo de esmalte en éstas imágenes (claramente identificado en el mapeo del Ca).

Continuando con el análisis estructural y químico de la UED, en la Figura 36 se muestran imágenes de las prolongaciones que constituyen dicha unión y el espectro del análisis químico que se le hizo a ésta zona. Su composición principal fue carbono (C), oxígeno (O) y nitrógeno (N), y como en ésta ocasión la muestra también fue recubierta para poder analizarla en MEB, se observa entonces la señal del oro.

Esa red de material orgánico que se observa en la UED es la que permite que se mantengan unidos el esmalte y la dentina, esto gracias a las propiedades químicas y estructurales que ya se identificaron. Sin embargo, esa unión también se da por la forma en que se organiza, de tal forma que también las prolongaciones, con origen en la dentina, sean prolongaciones odontoblásticas y lleguen hasta incrustarse en los espacios interprismáticos del esmalte. Así que también funcionan como una retención, o anclaje mecánico adicional que le da la estabilidad que se requiere al ejercer fuerzas masticatorias. Si no tuviera esta arquitectura en la cual participaron todos estos elementos de la red del material orgánico y los dos tejidos entre los que está presente, se separarían fácilmente.

Otro punto importante es que esa matriz orgánica, también presenta fibras que le confieren un mayor soporte mecánico entre esmalte y dentina completando de mejor manera la estructura de la UED. La red orgánica que conforma toda la zona de la UED presenta dimensiones variables, es decir, la estructura está dada respecto a la función.

Observándose en resultados previos que las prolongaciones de la red orgánica son más altas y la red es más estrecha en oclusal que en cervical. Lo mismo sucede con las fibras presentes. Esto es porque además de la retención, tienen la función de amortiguar las fuerzas, lo que da un efecto biomecánico que consiste en dispersar las cargas oclusales, para evitar la fractura del esmalte y, sobre todo, que pasen las cargas directamente a la dentina. Para poder observar dichas fibras, se prepararon también muestras de polvo de la zona de la UED, que lógicamente contenían cristales del esmalte y dentina, pero también había fibras.



ESPECTRO 5

Element	k-ratio (calc.)	ZAF	Atom %	Element Wt %
C -K	0.2367	1.863	52.25	44.12
O -K	0.0747	5.924	39.37	44.28
Ca-K	0.0372	1.143	1.51	4.25
Si-K	0.0013	1.375	0.09	0.18
S -K	0.0034	1.198	0.18	0.41
P -K	0.0038	1.296	0.23	0.49
N -K	0.0072	8.676	6.38	6.28
Total			100.00	100.00

FIGURA 36

Imagen de MEB de fibras observadas en la UED en la zona oclusal de un premolar (A). El análisis de EDS indica que están formados por material orgánico (B). La tabla en(C) de la concentración en porcentaje en peso, como en porcentaje atómico de los elementos.

En la Figura 37 se puede observar la red de aspecto fibrilar en la zona de contacto sobre la superficie dentinaria. En éste caso, la muestra se desgastó con ácido nítrico a diferentes intervalos de tiempo desmineralizando ligeramente el esmalte en cervical, determinando así un desgaste gradual y el tiempo en que veríamos la zona de la UED. Las observaciones de la zona de contacto fueron del tercio medio. En el tercio oclusal se desmineralizó todo el esmalte e incluso parte de la dentina. También se hizo el análisis químico y nuevamente se obtuvieron resultados que indicaban que se trata de material orgánico.

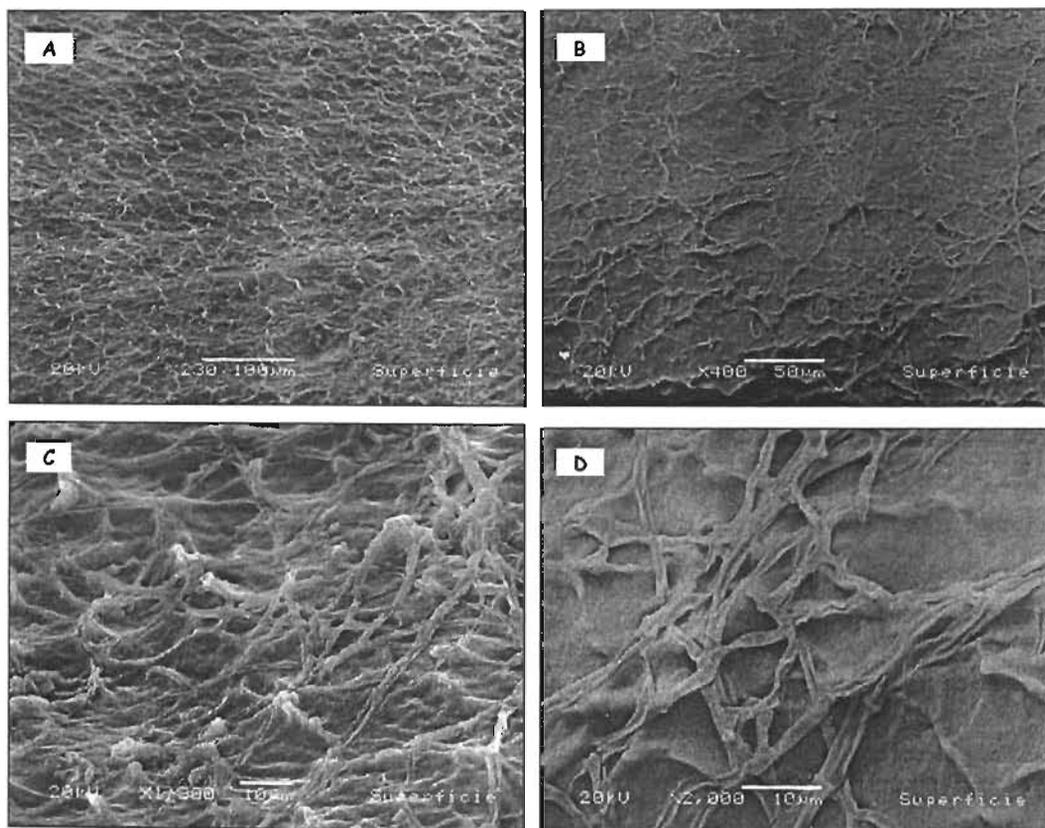
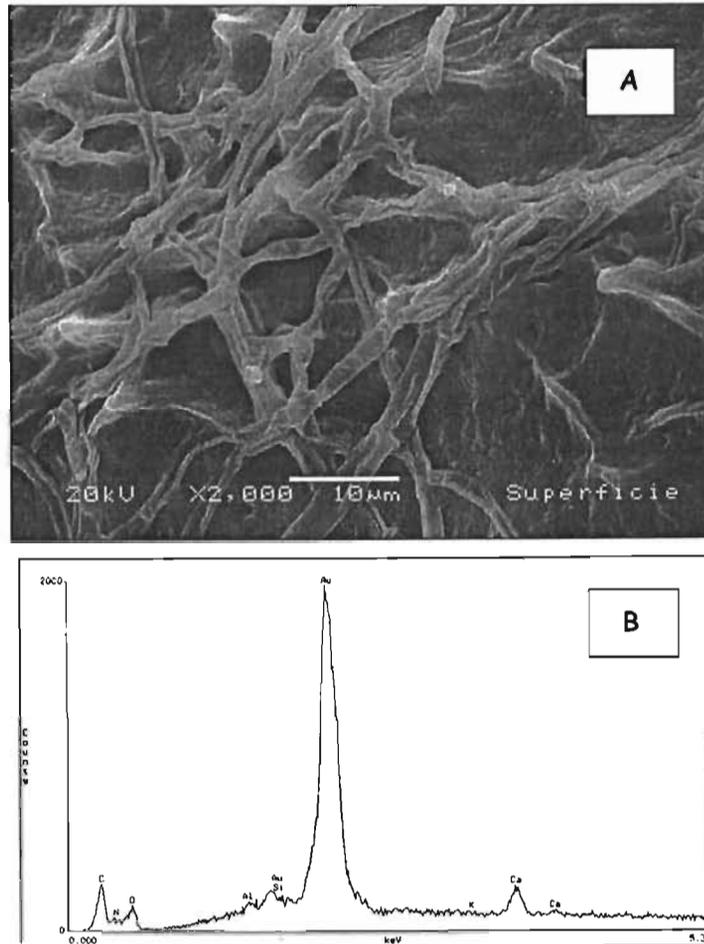


FIGURA 37

Imágenes de MEB de la red orgánica estructural de la UED, se observa un aspecto fibrilar. Estas imágenes corresponden al tercio medio del diente.

La Figura 38, es una imagen de MEB de la UED (38A) y su correspondiente espectro EDS de la zona (38B o Espectro 6). Además del porcentaje atómico mostrado en la tabla de composición química 38C, una vez más se demuestra que los principales contribuyentes son el C, O y N. Estos resultados (al igual que en todos los casos anteriores) se corroboró que la UED estructural y químicamente es material orgánico.



ESPECTRO 6

Element	k-ratio (calc.)	ZAF	Atom %	Element	Wt %
C -K	0,0436	3,291	43,35	C	14,34
O -K	0,0161	5,508	20,15	O	8,88
Al-K	0,0015	1,571	0,31	Al	0,23
Si-K	0,0022	1,277	0,37	Si	0,28
K -K	0,0000	1,394	0,00	K	0,00
Ca-K	0,0153	1,269	1,75	Ca	1,94
Au-L	0,5239	1,257	12,14	Au	65,87
N -K	0,0154	5,511	21,93	N	8,46
Total			100,00	Total	100,00

FIGURA 38

Análisis químico por EDS de la red que se observa en la Figura 38A. Esta muestra fue recubierta con oro para su observación por EDS, de ahí la presencia del pico de Au en el espectro. Las concentraciones de C y O muestran que se trata de material orgánico.

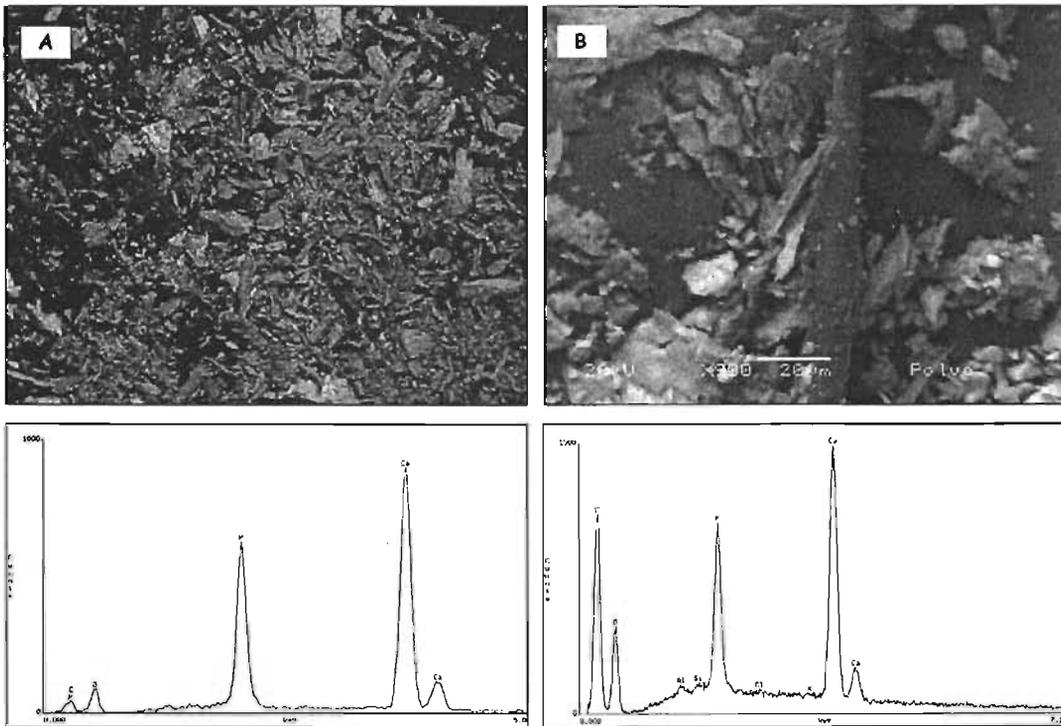
En la Figura 39 se muestran imágenes de MEB del polvo obtenido de la UED. Las partículas de polvo son los granos que se observan de forma irregular, esto es porque la muestra no fue tamizada. En las imágenes de mayor amplificación se alcanzan a observar una especie de fibras. Se realizó el análisis químico y se muestran sus espectros de EDS

en la Figura 39. En ésta figura se presenta el análisis por EDS del polvo y de lo que parece ser material fibrilar que podría ser material de la UED, con fines comparativos. Los resultados del EDS del polvo corresponde a calcio (Ca) y fósforo (P) principalmente. Esto es lógico porque la base inorgánica del esmalte y la dentina es hidroxiapatita. Los picos pequeños de carbón (C) y oxígeno (O) resultan porque el análisis EDS incluye residuos cristalinos de parte del esmalte y la dentina. En el espectro de EDS de la figura B, además de Ca y P, predominan otros elementos como C y O, lo que indica que es material orgánico conformando la UED.

Con la idea de obtener una mayor información sobre el material se obtuvieron espectros de Infra-Rojo. Mediante el análisis de polvo del esmalte, la UED y la dentina. Estos se muestran de forma conjunta en los Espectros 9.

Así mediante espectroscopia infra-roja se estudiaron los dos tejidos que se involucran en la UED, así como la UED propiamente. Al comparar los resultados que se muestran en los Espectros 9 con el de colágena pura y fosfato de calcio que se muestran en la imagen de los Espectros 10, se pueden establecer características comunes.

La aparición de bandas en 1090, 1052, 963, 602 y 572 cm^{-1} son típicos del radical fosfato. Asimismo se observan las bandas de OH estructural a 3571 y 572 cm^{-1} . Es cierto que los resultados mostrados en el Espectro 10 fueron obtenidos por absorbancia mientras que los del Espectro 9 se obtuvieron por transmitancia. Las señales son las mismas pero invertidas, por lo tanto se pueden comparar. El resultado es que ambas señales coinciden. Las bandas entre 1400 y 1500 cm^{-1} son provenientes de los carbonatos. En el caso del intervalo comprendido entre 1700 y 3000 cm^{-1} los materiales orgánicos presentan la contribución dominante de la colágena. Esto establece efectos en sus múltiples propiedades. Por lo tanto, los tres tejidos presentan los mismos componentes, pero en diferente concentración. Los tres presentan las bandas que corresponden a la base inorgánica (hidroxiapatita). Respecto a la banda de los OH que pueden ser de agua y de la proteína colágena es mayor en dentina, está presente también en la UED y muy pequeña en el esmalte tal y como se esperaba.



ESPECTRO 7

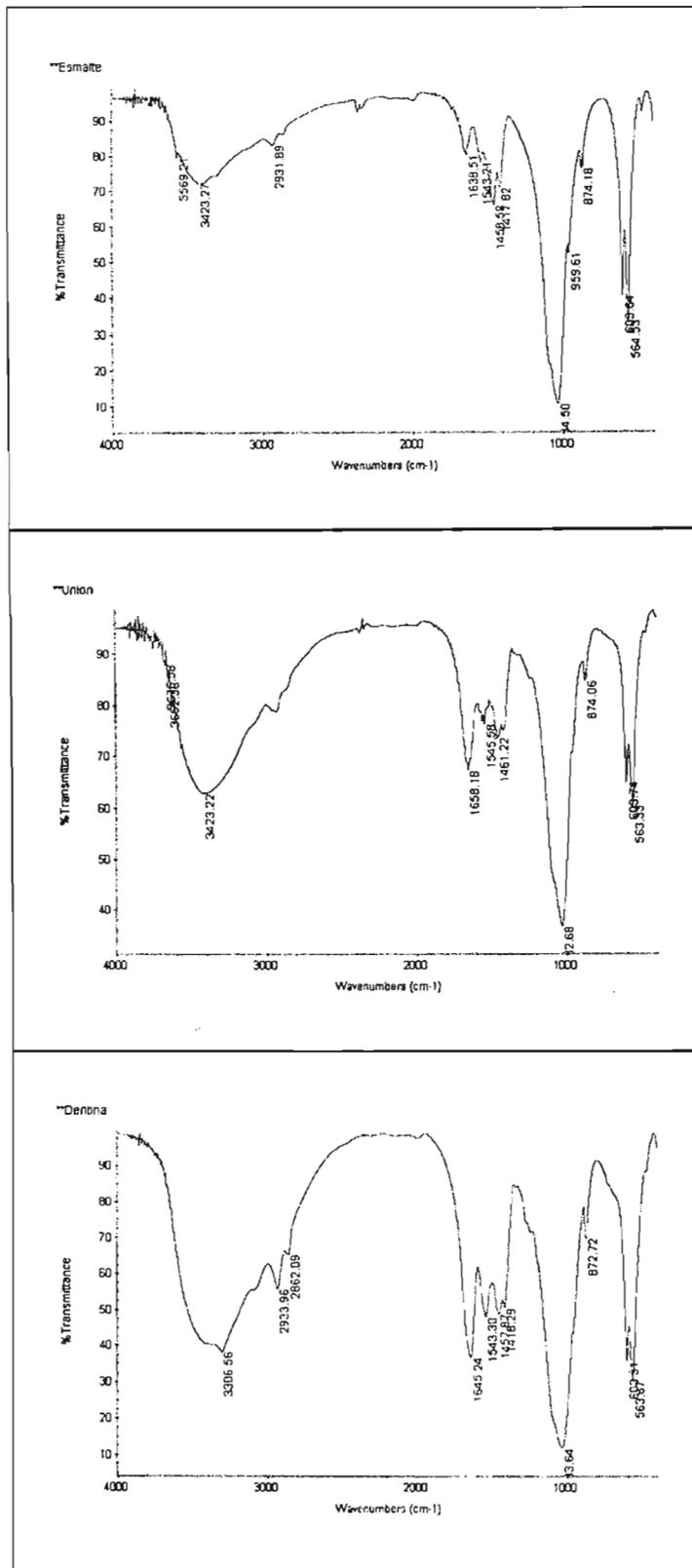
ESPECTRO 8

Element	k-ratio (calc.)	ZAF	Atom %	Element Wt %
C -K	0.0272	4.406	22.20	12.00
O -K	0.0384	8.219	43.85	31.58
Mg-K	0.0021	2.003	0.38	0.41
P -K	0.1265	1.228	11.15	15.54
Ca-K	0.3670	1.103	22.43	40.46
Total			100.00	100.00

Element	k-ratio (calc.)	ZAF	Atom %	Element Wt %
Al-K	0.0069	1.459	1.38	1.01
Si-K	0.0058	1.218	0.93	0.71
P -K	0.2179	1.154	30.06	25.15
K -K	0.0034	1.002	0.32	0.34
Ca-K	0.6774	1.066	66.67	72.18
Cl-K	0.0051	1.203	0.64	0.61
Total			100.00	100.00

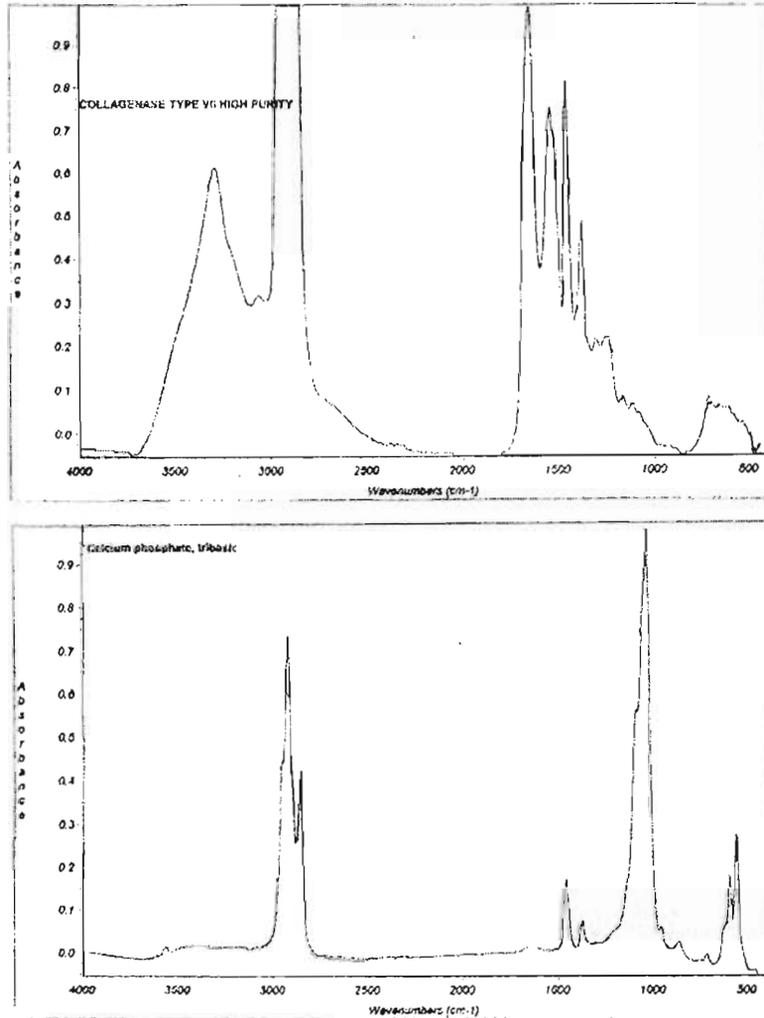
FIGURA 39

Análisis de EDS del polvo de la UED en general (A) y de una de las fibras observadas (B). Los picos de P y Ca provienen del esmalte y la dentina, mientras que C y O en su mayoría provienen del material orgánico que constituye a la fibra.



ESPECTROS 9

Espectros de transmitancia en Infra-Rojo del Esmalte, Dentina y UED demostrando que tienen los mismos componentes, pero en diferentes concentraciones.

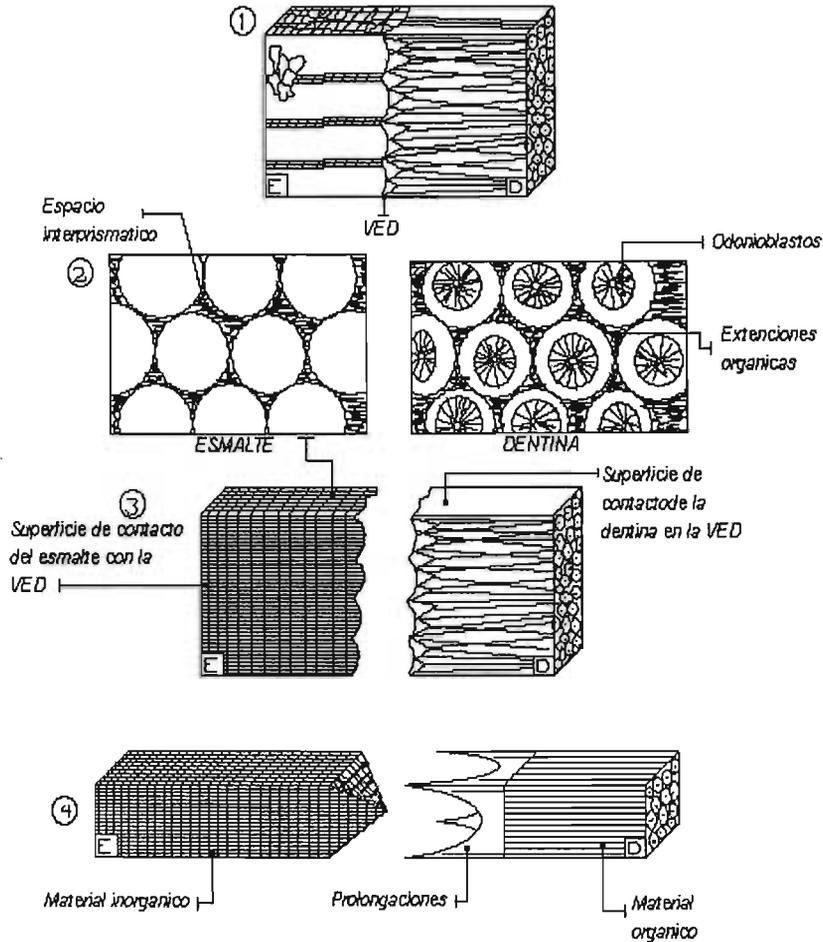


ESPECTROS 10

Espectros de absorbancia en Infra-Rojo de la colágena y del fosfato de calcio tribásico, que de forma invertida corresponden a espectros de transmitancia. Con la finalidad de identificar si se encuentran presentes en la composición de la UED.

Finalmente con los resultados obtenidos mediante las diferentes técnicas de observación y análisis, podemos identificar la estructura que tiene la UED, las características no solo físicas, sino también su composición química, que de forma conjunta le confieren propiedades específicas y adecuadas para llevar a cabo la fisiología del diente.

Todos los datos obtenidos nos permiten esquematizar la forma en que se organiza el material orgánico de la UED con los tejidos inorgánicos que está uniendo UED:

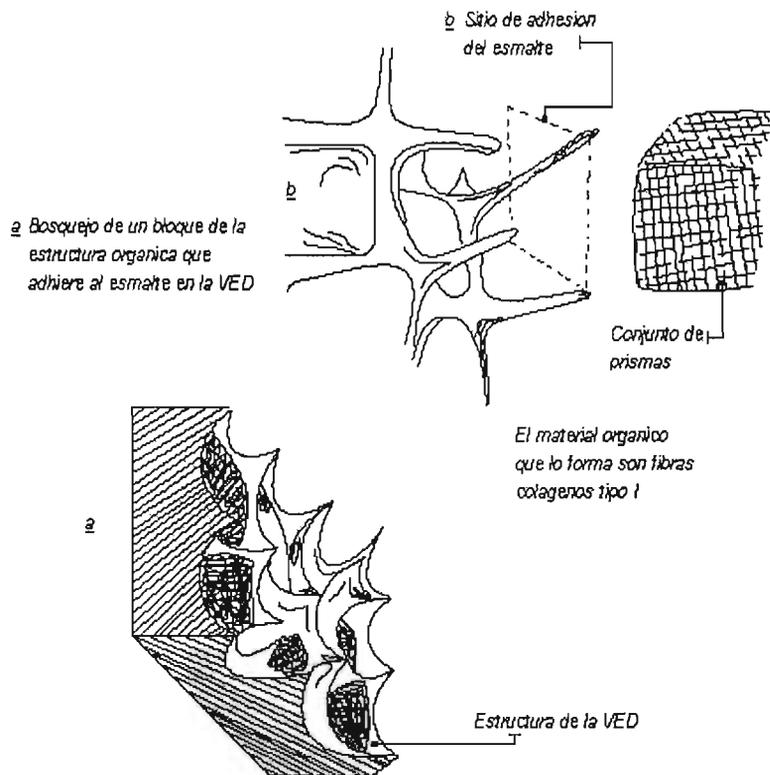


ESQUEMA 3

Esquema que representa la organización de la UED.

1) La UED caracterizada con una línea festoneada entre esmalte y dentina. 2) Esquema de cortes transversales del esmalte, en donde se observan los prismas y los espacios interprismáticos y de la dentina que se forma por túbulos dentinarios que dentro alojan las prolongaciones odontoblásticas. 3) Superficies de contacto de los dos tejidos. 4) Arreglo de las prolongaciones que forman la red y se insertan en espacios interprismáticos de un conjunto de prismas.

La UED, es resultado de la mineralización del esmalte y la dentina; por lo tanto es un material orgánico que contiene algunos residuos proteicos, como colágena. Se organiza sobre la superficie de la dentina y llega hasta los espacios interprismáticos, abarcando un bloque de prismas, tal y como se muestra en el esquema 4.



ESQUEMA 4

Esquema de la estructura y organización de la UED entre los tejidos inorgánicos.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

El estudio de la UED, como se ha mencionado anteriormente, involucra procesos biológicos y el funcionamiento coordinado de una serie de eventos que permiten el desarrollo del esmalte y dentina. Desde el inicio de la odontogénesis, los ameloblastos y los odontoblastos presentan interacciones celulares epitelio-mesenquimatosas estableciendo una relación estrecha mediante elementos fibrilares que, al finalizar la mineralización generan y dan lugar a la unión entre esmalte y dentina.

La UED inicia su formación mediante las fibras de Von Korff, en esa etapa es una unión amelodentinaria, porque une a los ameloblastos con los odontoblastos que forman la predentina en un inicio. Las células forman una matriz orgánica extracelular para que se lleve a cabo el depósito mineral mediante los procesos biológicos ya descritos, antecediendo la dentinogénesis a la amelogénesis. La matriz orgánica extracelular está dada por componentes de la expresión celular de los ameloblastos y odontoblastos; con una composición proteica y organización diferente dependiendo del tejido que se formará.

La matriz orgánica del esmalte está constituida mayormente por amelogenina, aunque también está presente la enamulina, tuftelina y lípidos; mientras que de parte de la dentina es la colágena tipo I, la cual provee el soporte físico y el medio favorable para el depósito mineral y otras proteínas no colágenas (PNC's) como son fosofoproteín dentina y sialoproteín dentina. La función proteica se centra en la regulación y mineralización de cada tejido y va a participar en la conformación del material orgánico, reconocido como UED. El depósito mineral para la formación de la dentina es previo al depósito mineral para

la formación del esmalte; aunque son procesos independientes, parecen llevar un orden secuencial. A pesar de que no hay relaciones entre los cristales de un tejido y otro, el esmalte necesita una plataforma dentinaria debido a que la organización de la matriz del esmalte se ve influenciada por la estructura de superficie de la dentina. Según Bordier (2), la orientación de las proteínas del esmalte está dada por los cristales de la dentina.

El desarrollo de los cristales determina también la organización del material orgánico. Desde los procesos iniciales de nucleación y la formación de partículas de tamaño nanométrico, seguido por la formación de cristales, se da una nucleación heterogénea de fosfato de calcio inorgánico o una matriz orgánica extracelular, controlados en ambos tejidos por la matriz orgánica y bajo controles celulares.

De ésta forma se va dando una organización del material orgánico en base al material inorgánico por parte del esmalte y de la dentina, conservando cada uno su estructura sin tener alguna relación cristalina. Sin embargo, Yoshihiko (29), en 1992 reportó que existe en algunas zonas de la UED una conexión directa de los cristales, revelado mediante una franja enrejada de los cristales de dentina penetrando y contactando directamente con los cristales del esmalte. En los resultados reportados en el presente trabajo de tesis, no se encontró relación cristalina, corroborando las observaciones de lo que fue reportado por P. Anderson y colaboradores (30).

La mineralización de la matriz orgánica dará como resultado la formación de los tejidos del esmalte y la dentina; los cuales, presentan unidades estructurales distintas. En el caso de la dentina, además de ser mineralizada en un 70% y tener 30% de material orgánico y agua, presenta actividad celular mientras el diente presente vitalidad pulpar. Su unidad estructural, son los túbulos dentinarios. Respecto al esmalte dental, está mineralizado en un 98%, y su unidad estructural son los prismas, y, a diferencia de la dentina, no tiene actividad celular después de finalizar la mineralización del esmalte.

Los dos tejidos presentan, por lo tanto, estructuras diferentes que se conservan aún en zonas cercanas a la UED. La similitud que tienen es que la base inorgánica es la misma

(hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$). Sin embargo, la organización de los cristales es distinta debido a que la biogénesis mineral se lleva a cabo mediante las matrices orgánicas, las cuales, a consecuencia lógica de ser originadas por líneas celulares diferentes, no tienen los mismos componentes proteicos. En estudios previos, se encontró que la organización cristalina del esmalte es de forma organizada, es decir, el tamaño de los cristales está bien definido y orientado. La organización de la dentina esta dada por cristales con orientaciones al azar y con una variedad de tamaños.

Es importante conocer la estructura de los tejidos debido a que son las que van a determinar la organización y estructura del material orgánico que conforma la UED. Podemos entonces decir que la Unión Esmalte-Dentina está constituida por material orgánico principalmente. Esto se basa en los resultados de EDS y sus mapeos químicos, los cuales muestran principalmente: carbono (C), oxígeno (O) y nitrógeno (N), elementos característicos de tejidos orgánicos. Dicho material orgánico seguramente son residuos de las matrices orgánicas extracelulares producidas por los ameloblastos y odontoblastos. Por lo tanto, la UED debe contener restos proteicos, como amelogenina y enamelinina, de parte del esmalte y colágena, sialoprotein y fosfoprotein dentin, de parte de la dentina.

La presencia de fibras las cuales se organizan insertándose directamente dentro del mineral del esmalte, en el espacio interprismático conforman la interfase del sistema fibrilar de la UED y pueden tener su base en la dentina. Por lo tanto se podría comentar a manera de nueva hipótesis que la proteína que más abunda en la UED es la colágena, esto está apoyado por algunos estudios reportados en la literatura (31).

Es necesario comentar aquí que esas proyecciones emergen de la dentina y llegan hasta el esmalte, algunos autores mencionan que no se extienden hasta el esmalte (6,32). Sin embargo, hay otras referencias de que sí son prolongaciones odontoblásticas las que emergen de los túbulos y llegan hasta el esmalte (33, 34, 35). Los resultados obtenidos en ésta investigación apoyan la hipótesis de que sí hay extensiones orgánicas desde la dentina y llegan hasta el esmalte. Esas prolongaciones tienen forma de red, como se observó en los resultados, pero no llegan a todos los espacios interprismáticos porque cada concavidad, y

por ende cada retícula de esa red, abarca varios prismas. Lo lógico es que se organicen en los espacios interprismáticos porque los cristales no pueden ser penetrados. Así esas posiciones que adoptan para alojar al material orgánico en los espacios interprismáticos es lo que se conocen como Estrías de Retzius que están dadas por las parazonas y diazonas (36).

Las protuberancias de la red formada difieren en altura dependiendo de la zona en que se observe: la red orgánica es más estrecha y más alta en regiones oclusales o incisales en el caso de los dientes anteriores y esa red parece ser más abierta y de menor altura en las regiones cervicales, demostrando con esto que ésta arquitectura está dado en base a las funciones del diente. Esto explica el por qué en oclusal (que es la zona que recibe las fuerzas de masticación) se requiere mayor soporte mecánico y amortiguación, evitando la fractura del esmalte, la separación de los tejidos y la exposición de la dentina. Todo esto está demostrando la interacción entre los tejidos y las fuerzas dentales (37) y que la estructura esta conformada de acuerdo a la función del tejido.

Así entonces, se describió la organización que tiene la UED la cual corresponde a una red orgánica, que consiste en proyecciones que emergen de la dentina y que llegan hasta el esmalte, abarcando varios prismas incrustándose en las zonas interprismáticas. Esta estructura orgánica es el resultado de los procesos biológicos necesarios para mineralizar el diente y que la UED es el inicio pero también el resultado de estos eventos. La UED está constituida por elementos orgánicos, como restos proteicos, principalmente colágena que se organizan de tal forma que ayudan a la resistencia mecánica y de amortiguación.

El arreglo reticular tiene dimensiones que dependen directamente de la función que realizan las diferentes partes del diente, produciendo las variabilidades en las dimensiones de esa red, porque como se mostró en la parte de los resultados, no se observa de forma regular en toda la superficie de contacto de la UED. Sin embargo, esta estructura reticular de material orgánico está organizada de tal forma que tiene la capacidad de mantener unidos a estos dos tejidos.

Podemos resumir que la estructura de la UED está conformada por un arreglo reticular de material orgánico diseñado de tal forma que mantiene unido a los tejidos del esmalte y la dentina. Esta red no coincide uno a uno, es decir una prolongación con un espacio interprismático, sino que ancla a un conjunto de prismas. La forma en que se une es por medio de las extensiones de la red que se incrustan en el esmalte, siendo en algunas zonas mayores y reforzadas por fibras, principalmente en oclusal e incisal. Esta estructura que se observa con concavidades entre cada retícula, es lo que da origen al festoneado con el que se ha caracterizado la UED.

CONCLUSIONES

1. Se identificó la presencia de material orgánico que constituye la UED con estructura reticular y que confiere la capacidad de mantener unidos a dos tejidos estructuralmente distintos. Por lo tanto no es precisamente una zona débil, aunque sí vulnerable al momento de procesar la muestra, además de ser una zona muy pequeña pero de gran importancia para que el diente pueda realizar sus funciones.
2. El sistema reticular, conforma una arquitectura con base en la dentina que consiste en proyecciones o protuberancias orgánicas que emergen de los túbulos dentinarios (por lo que también las prolongaciones odontoblásticas forman parte de ésta estructura) y se anclan en las zonas interprismáticas del esmalte. Esta red es el origen del festoneado de la UED.
3. La estructura reticular de la UED tiene dimensiones variables, dependiendo de la zona. En oclusal e incisal la altura es mayor y están más próximas cada una de las retículas que la red que se observa en cervical. Su estructura está dada de acuerdo a su función, porque presenta mayor resistencia mecánica en las zonas donde se llevan a cabo las fuerzas de masticación.
4. Los resultados de composición química por EDS e IR mostraron que la retícula es material orgánico, con estructuras fibrilares que podrían corresponder a colágena, sin embargo no fue posible identificarla como tal. Esto explica que quedan restos de la matriz proteica necesaria para el depósito mineral requerido en la formación de dentina y que se necesita un estudio de análisis más profundo.
5. El esmalte y la dentina conservan su estructura individual en la zona de contacto. Su unión es una consecuencia directa de los procesos biológicos formadores de esmalte (amelogénesis) y dentina (dentinogénesis) que se llevan a cabo de forma independiente. Esto crea un sistema de unión que se establece entre el material orgánico y los tejidos mineralizados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Marshall GW Jr, Balooch M., Gansky SA. MECHANICAL PROPERTIES OF THE DENTINOENAMEL JUNCTION: AFM STUDIES OF NANO HARDNESS, ELASTIC MODULUS, AND FRACTURE. *Journal Biomed. Material Research Jan. 54 (1) 87-95.* 2001
2. R.R. Gallagher, S.G. Demos, M. Balooch, G.W. Marshall, Jr., S.J. Marshall. OPTICAL SPECTROSCOPY AND IMAGING OF THE DENTIN-ENAMEL JUNCTION IN HUMAN THIRD MOLARS. *J. Biomed. Mater Res. Vol. 1;64(2) Págs. 372-7* 2003.
3. Sheila J. Jones, Alan Boyde. DENTIN AND DENTINOGENESIS, VOLUMEN I, CHAPTER 4: ULTRASTRUCTURE OF DENTIN AND DENTINOGENESIS. *Pag.81*
4. Arthur Veis, Joseph Barss, Thomas Dahl, Mohammed Rahima and Stuart Stock. MINERAL-RELATED PROTEINS OF SEA URCHIN TEETH: LYTECHINUS VARIEGATUS. *Microscopy Research and Technique No. 59 Págs. 342-351.* 2002.
5. Veerappan Girija, Hsu Chin-Ying Stephen. CHARACTERIZATION OF LIPPID IN MATURE ENAMEL USING CONFOCAL LASER SCANING MICROSCOPY *Journal of Dentistry No. 31 Págs. 303-311.* 2003
6. Ragazzoni E, Martignoni M, Cocchia D., THE MORPHOLOGICAL AND HISTOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF THE INTERPRISMATIC STRUCTURES AND THE HUMAN ENAMEL. A LIGHT MICROSCOPY STUDY. *Minerva Stomatologica July-August Volumen44 No.(7-8) Págs 376* 1995.
7. William T. Butler. DENTIN AND DENTINOGENESIS VOLUMEN II, CHAPTER 8: DENTIN COLLAGEN, CHEMICAL STRUCTURE AND ROLE IN MINERALIZATION. *Pag:37*

8. Jian Q. Feng, Xianghong Luan, John Wallace, Dai Jing, Tosió Ohshima, n Ashock B. Kulkarni, et al. GENOMIC ORGANIZATION, CHROMOSOMAL MAPPING, AND PROMOTER ANALYSIS OF THE MOUSE (Dsp) DENTIN SIALOPHOSPHOPROTEIN GENE, WHICH CODES FOR BOTH DENTIN SIALOPROTEIN AND DENTIN PHOSPHOPROTEIN. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 273 No. 16 April 17 Págs. 9457-9464. 1998
9. Anders Linde. DENTIN AND DENTINOGENESIS VOLUMEN II, CHAPTER 9, NONCOLLAGENOUS PROTEINS AND PROTEOGLYCANS IN DENTINOGENESIS. Pág.55
10. P. Bordier-Houllé, P. Steuer, J.M. Meyer, L. Bigeard. HIGH-RESOLUTION ELECTRON-MICROSCOPIC STUDY OF THE RELATIONSHIP BETWEEN HUMAN ENAMEL AND DENTIN CRYSTALS AT THE DENTINOENAMEL JUNCTION. *Cell Tissue Res.* 301 Págs. 389 - 395. 2000
11. Shroff B, Thomas HF. INVESTIGATION OF THE ROLE OF VON KORFF FIBERS DURING MURINE DENTINOGENESIS. *Journal of Biology Buccale* September Volumen 20 Number 3 Págs. 139-144 1992.
12. Spyros Doukoudakis, Nikos Kranias, Margarita Spanou, Minos Stavridakis. MORPHOLOGIC CHARACTERISTICS OF DENTIN AT THE DENTIN-ENAMEL JUNCTION AS VIEWED BY SCANNING ELECTRON MICROSCOPY. *Journal of Esthetic Dentistry* Vol.9 No.2 Pag. 94-99 1997.
13. M.J. Sigal, J.E. Aubin, and A.R. Ten Cate. AN IMMUNOCYTOCHEMICAL STUDY OF THE HUMAN ODONTOBLAST PROCESS USING ANTIBODIES AGAINST TUBULIN, ACTIN AND VIMENTIN. *Journal Dental Research* vol. 64 No. 12 Págs. 1348-1355 December. 1985.
14. Orban, Balint Joseph. HISTOLOGIA Y EMBRIOLOGÍA BUCAL. Edit. Ateneo, Buenos Aires, México Págs. 511.
15. Agematsu H, Sawada T, Watanabe H, Yanagisawa T, Ide Y. IMMUNO-SCANNING ELECTRON MICROSCOPE CHARACTERIZATION OF LARGE TUBULES IN HUMAN DECIDUOUS DENTIN. *Anat. Res. Jul* 248(3) 339-45 1997.
16. Thomas G.H., Diekwish, Brett J. Berman, Xochitl Anderton, Brian Gurinsky, Adam J. Ortega, Paul G. Satchell, Mia Williams, Chithra Arumugham, Akira Yamane. MEMBRANES, MINERALS, AND PROTEINS OF DEVELOPING VERTEBRATE ENAMEL. *Microscopy Research and Technique* No. 59 Págs. 373-395. 2002
17. Ichiro Sasagawa. MINERALIZATION PATTERNS IN ELASMOBRANCH FISH. *Microscopy Research and Technique* No. 59 Págs. 396-407. 2002

18. Toshihiko Inage, Takahisa Kasamo, Takahiro Yoshida, Toshikazu Suzuki, Tetsuo Sekiguchi and Takashi Takezawa. ULTRASTRUCTURAL LOCALIZATION OF ALKALINE PHOSPHATASE IN FISH ENAMEL ORGAN. *J Nihon Univ Sch Dent.* 26(3):187-201 1984
19. Meyer JM, Bodier-Houille P, Cuisinier FJ, Lesot H, Ruch JV. INITIAL ASPECTS OF MINERALIZATION AT THE DENTINO-ENAMEL JUNCTION IN EMBRYONIC MOUSE INCISOR IN VIVO AND IN VITRO: A TEM COMPARATIVE STUDY. *In vitro Cell Dev. Biol. Anim. Mar* 35(3) 159-68 1999.
20. Thomas G.H. Diekwish, Brett J. Berman, Steven Gentner, Harold C. Slavkin. INITIAL ENAMEL CRYSTALS ARE NOT SPATIALLY ASSOCIATED WITH MINERALIZED DENTINE. *Cell and Tissue Research No. 279* Págs: 149-167. 1995
21. J.P. Simmer and A.G. Finchman. MOLECULAR MECHANISMS OF DENTAL ENAMEL FORMATION. *Crit. Rev. Oral Biol. Med. Vol. 6 No. 2* Págs 84-108 1995
22. Mary MacDougall, Darrin Simmons, Xianghong Luan, Jasón Nydegger, Jian Feng and Ting Ting Gu. DENTIN PHOSPHOPROTEIN AND DENTIN SIALOPROTEIN ARE CLEAVAGE PRODUCTS EXPRESSED FROM A SINGLE TRANSCRIPT CODED BY A GENE ON HUMAN CHROMOSOME 4. (DENTIN PHOSPHOPROTEIN DNA SÉQUENCE DETERMINATION). *The Journal of Biological Chemistry Vol. 272 No. 2* Págs. 835-842 1997
23. J.D. Bartlett and J.P. Simmer. PROTEINASES IN DEVELOPING DENTAL ENAMEL. *Crit. Rev. Oral Biology Med. Vol.10 No.4* Págs. 425-441 1999.
24. Mayumi Iijima, Yutaka Moriwaki. EFFECTS OF IONIC INFLOW AND ORGANIC MATRIX ON CRISTAL GROWTH OF OCTACALCIUM PHOSPHATE; RELEVANT TO TOOTH ENAMEL FORMATION. *Journal of Crystal Growth Vol 198 No. 199* Págs. 670-676 1999
25. Malacara HD. MICROSCOPIA ÓPTICA *Segunda Edición* 586 págs.
26. Yacamán J, Reyes-Gasga J. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA, UNA VSIÓN DEL MICROCOSMOS *Consejo Nacional de la Ciencia y la Tecnología. Fondo de Cultura Económica* 143 Págs. 1998
27. Werner Brügel. AN INTRODUCTION TO INFRARED SPECTROSCOPY. *Great Britain, London and Colchester* 1962.
28. Vázquez-Nin G., Echeverría Olga. INTRODUCCIÓN A LA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA APLICADA A LAS CIENCIAS BIOLÓGICAS *Facultad de Ciencias UNAM Fondo de Cultura Económica, México.* 2000

29. Yoshihiko Hayashi. HIGH RESOLUTION ELECTRON MICROSCOPY IN THE DENTINO-ENAMEL JUNCTION. *Journal Electron Microscopy* 41 Págs. 387-391. 1992.
30. P. Anderson, J. C. Elliott, U. Bose and S. J. Jones. A COMPARISON OF THE MINERAL CONTENT OF ENAMEL AND DENTINE IN HUMAN PREMOLARS AND ENAMEL PEARLS MEASURED BY X-RAY MICROTOMOGRAPHY. *Archs. Oral Biology* Vol.41 No.3 pag. 281-290. 1990
31. Chun P. Lin, William H. Douglas and Stanley L. Erlandsen. SCANNING ELECTRON MICROSCOPY OF TYPE I COLLAGEN AT THE DENTIN-ENAMEL JUNCTION OF HUMAN TEETH. *Journal of Histochemistry and Citochemistry* Vol. 41 No. 3 Págs: 381-388 1993
32. Margaret R. Byers and Akira Sugaya. ODONTOBLAST PROCESSES IN DENTIN REVEALED BY FLUORESCENT Di-I. *The Journal of Histochemistry and Citochemistry* Vol.43 No.2 Págs. 159-168 1995
33. M.J. Sigal, J.E. Aubin, A.R. Ten Cate and S. Pitaru. THE ODONTOBLAST PROCESS EXTENDS TO THE DENTINOENAMEL JUNCTION: AN IMMUNOCYTOCHEMICAL STUDY OF RAT DENTIN. *The Journal of Histochemistry and Citochemistry*. Vol. 32 No.8 Pags.872-877. 1984
34. Sigal MJ, Aubin JE, Ten Cate AR. AN IMMUNOCYTOCHEMICAL STUDY OF THE HUMAN ODONTOBLAST PROCESS USING ANTIBODIES AGAINST TUBULIN, ACTIN, AND VIMENTIN. *Journal Dental R. Dec.* 64(12) 1348-55 1985
35. Sigal MJ, Aubin JE, Ten Cate AR A COMBINED SCANNING ELECTRON MICROSCOPY AND IMMUNOFLUORESCENCE STUDY DEMONSTRATING THAT THE ODONTOBLAST PROCESS EXTENDS TO THE DENTINOENAMEL JUNCTION IN HUMAN TEETH. *Anat. R. Nov* 210(3) 453-62 1984
36. Hanaizumi Y, Kawano Y, Ohshima H, Hoshino M, Takeuchi K, Maeda T. THREE-DIMENSIONAL DIRECTION AND INTERRELATIONSHIP OF PRISMS IN CUSPAL AND CERVICAL ENAMEL OF DOG TOOTH. *Anat. Rec. Nov* 252(3) Págs. 355-368 1998.
37. Xu HH, Smith DT, Jahanmir S, Romberg E, Kelly JR, Thompson VP, Rekow ED. INDENTATION DAMAGE AND MECHANICAL PROPERTIES OF HUMAN ENAMEL AND DENTIN. *J. Dental Research* Mar 77(3) Págs. 472-480 1998.

Autorizo a la Dirección de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Ivet Gil Chavazé

FECHA: 01-Marzo-2005

FIRMA: _____



**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**