



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias
Médicas, Odontológicas y de la Salud

División de Estudios de Posgrado e Investigación
Instituto de Física

NANOESTRUCTURA DE LA DENTINA HUMANA

Tesis que presenta

C.D. María Isaura Cortés García

para optar por el Grado de Maestra en Ciencias
Odontológicas

Directora: Dra. Maricela Garcés Ortiz
Asesor: Dr. José Reyes Gasga

México, D. F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Doy gracias a nuestra máxima casa de estudios, Universidad Nacional Autónoma de México, por darme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado en ella.

Gracias a la Facultad de Odontología, en particular a la División de Estudios de Posgrado e Investigación, que me brindó la oportunidad de realizar mi especialización en Odontopediatría y continuar mis estudios de posgrado.

Un agradecimiento con mucho cariño para mi tutora, Dra. Maricela Garcés Ortiz, por brindarme conocimientos, asesoría, y guía, gracias por su confianza y apoyo.

Agradezco al Instituto de Física, en el Departamento de Materia Condensada, que nos abrió las puertas para la realización de esta tesis.

Un agradecimiento especial al Dr. José Reyes Gasga por su asesoría, apoyo y enseñanzas.

Gracias al honorable jurado, Dr. Raúl Luis García Aranda, Dr. Luis Felipe Jiménez García, Dra. Teresa I. Fortoul Vander Goes, porque con sus comentarios y sugerencias contribuyeron a enriquecer este trabajo.

Gracias al Dr. Ramiro García García, por su confianza y apoyo en la elaboración del estudio.

Gracias a la Mtra. Jacqueline Cañetas, así como a los técnicos Carlos Flores, Pedro Mexía y Roberto Hernández, por su ayuda y asesoría en el procesamiento de muestras.

A todos, gracias...

DEDICATORIA

... a mis profesores de Maestría por mostrarme el camino del conocimiento...

... a mis maestros de especialización en Odontopediatría porque con sus enseñanzas me mostraron que había elegido la especialidad correcta, gracias por haberme animado siempre a seguir adelante...

... a mi tutora de investigación, Dra. Maricela Garcés Ortiz por confiar en mí, como alumna y como ser humano, gracias por brindarme siempre su apoyo y su confianza...

... al Dr. José Reyes Gasga por escucharme y asesorarme siempre que lo he necesitado...

... a mis maestros J. Antonio Fragozo Ramírez† y Javier Hernández Palma†, ejemplos de vida, quienes fueron parte muy importante de mi formación como especialista...

...a mis padres Adán y Haydée Hilda por haberme apoyado siempre y quienes con su amor y ejemplo me han dado la fuerza para seguir mis proyectos...

...a mis hermanas Haydée Guadalupe y Claudia, quienes siempre me apoyan, me animan y me consienten, brindándome siempre su amor incondicional...

...a mis sobrinos Domingo Alejandro, Claudia Haydée y Lara Marian, porque con su amor y alegría, siempre me reaniman, aún en los peores momentos...

...a mi tío Evaristo[†] (quien compartió su alegría hasta el último momento), a mi tía María de los Ángeles, a mis tíos y primos, por su amor, lealtad y confianza, con un recuerdo especial para José Ángel[†] quien siempre me brindó su ayuda y me animaba...

...a mis muy buenos amigos, compañeros y camaradas...

...a la Dra. Patricia López Morales, maestra, colaboradora y amiga, gracias por creer siempre en mí...

NANOESTRUCTURA DE LA DENTINA HUMANA

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
ANTECEDENTES	4
ESTRUCTURA DE LA DENTINA HUMANA.....	4
PROPIEDADES DE LA DENTINA.....	4
Piezoelectricidad de la dentina.....	7
Composición química de la dentina.....	7
Odontoblastos.....	9
Permeabilidad dentinaria.....	10
DENTINOGENESIS	11
Odontogénesis.....	11
Estadio de campana tardío diferenciación en odontoblastos.....	13
Matriz dentinaria.....	13
Dentina del manto.....	14
Dentina primaria.....	15
Dentina secundaria.....	15
MINERALIZACIÓN DE LA DENTINA	15
Colágena tipo I.....	15
Proteínas no colágenas.....	15
Vesículas matriciales.....	17
Frente de mineralización.....	17
Dentina peritubular y dentina intertubular.....	18
Estados iniciales de la mineralización de la dentina.....	19
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	24
OBJETIVOS	24
OBJETIVO GENERAL.....	24
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
HIPÓTESIS	25
JUSTIFICACIÓN	25
CAPÍTULO I	
TÉCNICAS DE OBSERVACIÓN Y ANÁLISIS	26
MICROSCOPIA ÓPTICA.....	26
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.....	27
MICROSCOPIA DE BARRIDO.....	28
ANÁLISIS QUÍMICO POR RAYOS X CARACTERÍSTICOS (EDS).....	29
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.....	29
MICROESPECTROSCOPIA INFRARROJA TRANSFORMADA DE FOURIER.....	31
CAPÍTULO II	
METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	32
Preparación de muestras para el microscopio electrónico de barrido.....	32
Preparación de muestras para el microscopio electrónico de transmisión.....	32
Preparación de muestras para el análisis infrarrojo.....	34

CAPÍTULO III	
RESULTADOS	35
Análisis por Microscopia Electrónica de Barrido.....	35
Análisis por Microanálisis por espectrometría de dispersión de energía de rayos X característicos. EDS.....	39
Análisis por Microespectrometría de infrarrojos transformada de Fourier. FTIRM.....	40
Análisis por Microscopia Electrónica de Transmisión.....	43
CAPÍTULO IV	
DISCUSIÓN	49
CONCLUSIONES	53
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

FIGURAS

Figura	1	Corte longitudinal del diente.....	4
Figura	2	Túbulos dentinarios cortados transversalmente.....	8
Figura	3	Dentina intratubular o peritubular y dentina intertubular.....	8
Figura	4	Odontoblastos vistos con microscopio de luz.....	9
Figura	5	Localización y distribución de varios tipos de dentina.....	14
Figura	6	Colágena y túbulos dentinarios.....	15
Figura	7	Defectos dentinarios hereditarios aislados.....	20
Figura	8	Fusión de las partículas nanométricas.....	22
Figura	9	Estado de coalescencia.....	23
Figura	10	Muestra para MEB.....	32
Figura	11	Ion Mill.....	33
Figura	12	Microscopio electrónico de transmisión.....	33
Figura	13	Túbulos dentinarios y odontoblastos. MEB 800 ×.....	35
Figura	14	Corte longitudinal de dentina humana que muestra túbulos dentinarios y su sistema de ramificaciones internas. MEB 5000 ×.....	36
Figura	15	Túbulos dentinarios, sus ramificaciones parecen ser el soporte interno. MEB 5000 ×.....	36
Figura	16	Procesos odontoblásticos y ramificaciones. MEB 2000 ×.....	36
Figura	17	Proceso odontoblástico con múltiples ramificaciones. MEB 5000 ×.....	37
Figura	18	Corte longitudinal de túbulo dentinario mostrando el proceso odontoblástico y sus ramificaciones. MEB 5000 ×.....	37
Figura	19	Túbulo dentinario y proceso odontoblástico. MEB 5000 ×.....	37
Figura	20	Proceso odontoblástico con múltiples ramificaciones. MEB 5000 ×.....	38
Figura	21	Procesos odontoblásticos con múltiples ramificaciones, preentina en corte transversal en la unión con el tejido pulpar. MEB 3500 ×.....	38
Figura	22	Proceso odontoblástico cargado de microvesículas (A), microvesículas en espacios intertubulares (B) y en la pared del túbulo dentinario (C). MEB 10000 ×.....	38
Figura	23	Corte transversal de un túbulo dentinario y dentina peritubular. MET	43
Figura	24	Imagen en campo claro de las fibras de colágena. MET	43
Figura	25	Imagen en campo oscuro de las fibras de colágena. MET	44
Figura	26	Imagen en campo claro de las fibras de colágena y cristales de hidroxiapatita. MET	44
Figura	27	Imagen en campo oscuro de fibras de colágena y cristales de hidroxiapatita. MET.....	45
Figura	28	Imagen en campo oscuro de las fibras colágenas y cristales de hidroxiapatita. MET.....	45
Figura	29	Imagen en campo claro y de alta amplificación de los cristales de hidroxiapatita. MET	46
Figura	30	Figura 30. Imagen en campo claro y de alta amplificación de los cristales de hidroxiapatita. MET	46
Figura	31	Imagen de MET de alta resolución de hidroxiapatita. Eje [100].....	47
Figura	32	Imagen de MET de alta resolución de hidroxiapatita. Ejes [002] y [101].....	47

ESQUEMAS

Esquema	1	Complejo pulpo – dentinario.....	6
Esquema	2	Odontoblasto.....	9
Esquema	3	Presión osmótica entre los túbulos dentinarios.....	10
Esquema	4	Señalización epitelio-mesénquima durante el desarrollo del diente.....	11
Esquema	5	Modelo en cascada de la determinación de región dentaria.....	12
Esquema	6	Expresión de numerosas señales durante la odontogénesis.....	12
Esquema	7	Efecto de inductores e inhibidores durante el desarrollo de las cúspides.....	13
Esquema	8	Desarrollo de los odontoblastos.....	13
Esquema	9	Expresión diferencial de los genes de las proteínas de la matriz dentinaria.....	16
Esquema	10	Vesículas matriciales.....	17
Esquema	11	Diferentes etapas de la formación de dentina.....	17
Esquema	12	Niveles de secreción propuestos por Linde.....	18
Esquema	13	Niveles de secreción propuestos por Linde.....	18
Esquema	14	Mecanismo de la formación de cristal biológico con OCP.....	22
Esquema	15	Obtención clásica de imágenes reales y virtuales por lentes convergentes.....	26
Esquema	16	Microscopio electrónico de barrido.....	28
Esquema	17	Dispersión elástica.....	29
Esquema	18	Proceso de formación de imágenes en un microscopio electrónico de transmisión.....	30
Esquema	19	Esquema de la formación de patrón de difracción e imagen de una muestra cristalina.....	30

CUADROS

Cuadro	1	Propiedades mecánicas de la dentina.....	5
Cuadro	2	Comparación de propiedades nanomecánicas usando varias pruebas.....	5
Cuadro	3	Velocidades de sonido longitudinal en esmalte y dentina normales y cariados.....	6
Cuadro	4	Velocidad de sonido longitudinal en diferentes capas de dentina obtenidas con USD-KB....	6
Cuadro	5	Media y desviación estándar de dentina en espesor de μm y edades de los dientes.....	7
Cuadro	6	Composición química de la dentina.....	7
Cuadro	7	Análisis EDS de predentina.....	39
Cuadro	8	Análisis EDS de dentina.....	39
Cuadro	9	Análisis EDS de dentina de la unión amelodentinaria.....	39
Cuadro	10	Tarjeta de rayos X, Powder Diffraction File of the International Tables for X-ray crystallography.....	48

GRÁFICAS

Gráfica	1	Análisis por FTIRM de dentina.....	40
Gráfica	2	Análisis por FTIRM de dentina de la unión amelodentinaria.....	41
Gráfica	3	Análisis por FTIRM del esmalte en unión amelodentinaria.....	41
Gráfica	4	Análisis por FTIRM del esmalte.....	42

RESUMEN

La dentina es un material compuesto heterogéneo que contiene túbulos de diámetro micrométrico rodeados por dentina peritubular altamente mineralizada y embebida en una matriz de colágena parcialmente mineralizada. El componente inorgánico corresponde a la hidroxiapatita y el componente orgánico a colágena Tipo I. En este trabajo se analizaron cortes de predentina, dentina y unión amelodentinaria, con FTIR, MEB, EDS y MET. El MEB reveló que los túbulos dentinarios contienen un sistema de ramificaciones internas por medio de las cuales se unen y comunican entre sí. Los odontoblastos se encuentran alineados en número de cuatro y presentan un intrincado sistema de unión a través de finas ramificaciones. Mediante análisis EDS se determinaron las concentraciones de Ca y P en la predentina, la dentina y la unión amelodentinaria, encontrándose que la concentración de P aumenta en los tejidos más mineralizados, en tanto que la concentración de Ca disminuye. Los resultados de los análisis con FTIR indican que la dentina es una apatita carbonatada. Se observaron picos del dominio PO_4 entre 1145 y 1090 cm^{-1} . El dominio CO_3 se observa entre 1550 y 1400 cm^{-1} . Se encontraron bandas de amida I y III típicas de colágena. El análisis de la dentina cercana a pulpa muestra que la amida I vibra entre 1670 y 1680 cm^{-1} , en tanto que el dominio de amida III muestra bandas con frecuencias de 1420 cm^{-1} . Estas vibraciones son difíciles de determinar en la unión amelodentinaria y desaparecen en las muestras de esmalte. El MET revela que la dentina es un biomaterial de carácter policristalino. Se observaron granos nanométricos de hidroxiapatita dentro de una matriz de material orgánico.

ABSTRACT

Dentin is a heterogenic compound material which contains tubules of micrometric diameter surrounded by peritubular dentin highly mineralized, embedded in a collagen matrix partially mineralized. The inorganic component corresponds to hidroxiapatite, the organic component is collagen type 1. In this study dentin slices were analyzed, pre-dentin and enamel-dentin joint with FTIR, MEB, EDS, and MET. MEB showed that dental tubules contain an internal ramifications system by which they are jointed and communicated among each other. Odontoblasts are alienated in number of four and they show a complicated union system of thin ramifications. EDS analysis determined the Ca and P concentrations in pre-dentin, dentin and enamel-dentin joint, showing that P concentration increases in more mineralized tissues, while Ca concentrations decrease. Results of the FTIR analysis indicate that dentin is a carbonated apatite. Ranges of the domain PO_4 were observed between 1145 and 1090 cm^{-1} . The CO_3 domain was observed between 1550 and 1400 cm^{-1} . Amide I and III bands, typical of the collagen, were observed. Analysis of dentin next to the pulp shows that Amide I vibrates between 1670 and 1680 cm^{-1} , while domain Amide III shows bands with frequencies of 1420 cm^{-1} . These vibrations are difficult to determine in the enamel-dentin junction and disappear in the enamel cuts. MET reveals that dentin is a biomaterial with polycrystalline characteristics. Nanometric grains of hidroxiapatite were founded inside a matrix of organic material.

INTRODUCCIÓN

La dentina es un tejido conectivo mineralizado, que forma el eje estructural del diente¹⁻³, proveyéndolo de la forma y rigidez necesaria para funcionar efectivamente durante la masticación,¹ por ende es una parte primordial del mismo. Facilita con su grado de elasticidad que el esmalte quede protegido de los distintos impactos masticatorios.^{2,3} Además, la estructura tubular de la dentina provee conductos para el paso de solutos y solventes a través de la misma. Sin embargo, pese a su importancia, son pocos los estudios que versen sobre la nanoestructura de los cristales de la dentina humana; la mayoría de los estudios al respecto se han realizado en dientes de animales y por lo mismo son pocos los conocimientos que se tienen sobre los cristales de hidroxiapatita de la dentina humana.

Los estudios de los tejidos calcificados tales como hueso y diente son importantes en el desarrollo de biomateriales. Los fosfatos de calcio (Ca-P) son de interés especial en biología y medicina oral debido a: (a) su ocurrencia en condiciones normales (esmalte, dentina, cemento, hueso) y patológicas (Ej. cálculo dental, cálculos salivales); (b) a su asociación con la formación, progresión y arresto de la caries en esmalte y dentina, y (c) a su uso en odontología preventiva y restaurativa.

Alrededor de 1926, usando difracción de rayos X y análisis químicos, la fase mineral del esmalte, dentina y hueso fue identificada como un fosfato de calcio con una estructura de apatita, idealizada como $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, HA. Existen investigaciones y varios puntos de vista sobre la estequiometría y la asociación de numerosos elementos traza y menores con las apatitas biológicas.⁴ Después de décadas de estudios, la composición y estructura de estos minerales biológicos permanecen poco caracterizadas a nivel molecular. La principal dificultad es que el desorden estructural es comúnmente encontrado en tejidos biológicos duros y por consiguiente la utilidad de las técnicas de difracción es muy limitada.⁵

ANTECEDENTES

ESTRUCTURA DE LA DENTINA HUMANA

La dentina forma el eje estructural del diente, en la corona está cubierta por el esmalte y en la raíz por el cemento, en el centro se encuentra la cámara pulpar, la cual contiene al órgano pulpar (Figura 1).^{1,2,6} Dentina y pulpa se originan de la papila dental y son consideradas como un único desarrollo y unidad funcional, llamada complejo pulpodentinal^{1,3,6,7} (Esquema 1).

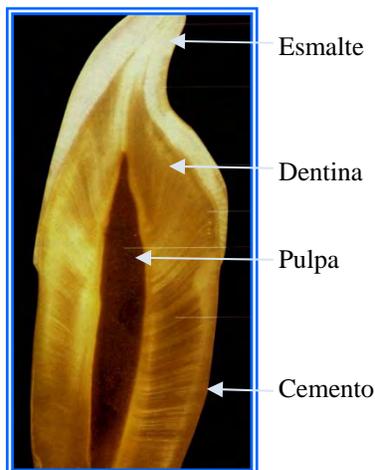
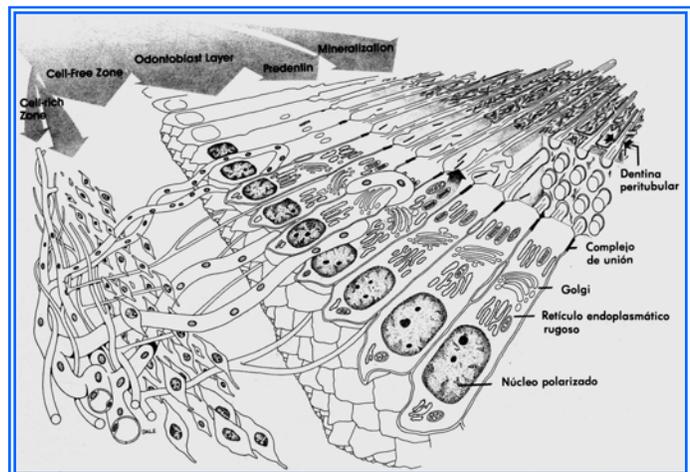


Figura 1. Corte longitudinal del diente³



Esquema 1. Complejo pulpo – dentinario.⁸

PROPIEDADES DE LA DENTINA

La dentina es resiliente o ligeramente elástica,⁸ es más compresiva y tiene más esfuerzo de tensión que el esmalte.^{2,6}

Heargraves, después de una amplia revisión bibliográfica, publica en 2002 las propiedades mecánicas de la dentina en el siguiente cuadro,² debido a que la dentina no es homogénea, por la variación en la estructura microscópica, los valores están dados en rangos (Cuadro 1).

Propiedades mecánicas	Dentina		
		Dentina peritubular	Dentina Intertubular
Esfuerzo de compresión (MPa)	217 – 300	–	–
Módulo de Young (GPa)	11 – 19.9	29.8 – 30	16 – 21
Fuerza de ruptura (MPa)	45 – 132	–	–
Esfuerzo de tensión (MPa)	31 – 106	–	–
Microdureza (Kg/mm-2)	40 – 70	–	–
Nanodureza (GPa)	–	2.2 – 2.5	0.12 – 0.52

Sin embargo, Balooch cita a Craig y Powers quienes reportan un esfuerzo de compresión de 20.8 MPa. En este contexto, Balooch *et al.* reportan una nueva técnica usando un microscopio de fuerza atómica y un transductor de desplazamiento de fuerza para estudiar simultáneamente la superficie topográfica y mapear las propiedades topográficas de las uniones (esmalte-dentina, dentina peritubular-intertubular) y tejidos duros adyacentes. Posteriormente comparó sus resultados con otras técnicas. (Cuadro 2)

Tipo de prueba	Carga	Tamaño del intervalo	Anchura de la DEJ	Módulo de elasticidad del esmalte (GPa)	Módulo de elasticidad de la dentina peritubular (GPa)	Módulo de elasticidad de la dentina intertubular (GPa)	Anchura de PIJ (µm)
Microindentación Vickers	147 mN	50 µm	27 – 100				
Nanoindentación Berkovich	1 mN	> 2 µm	15 – 25				
Nanoindentación Cube Corner	500 µN	1 – 2 µm	10 – 13	72.7 – 87.5	28 – 32	17.7 – 21.1	
Espectroscopio micro-raman		1 µm	6 – 8				
Nanorayado esférico	300 µN	40 nm	1 – 3				
AFM – transductor de desplazamiento de fuerza	2.5 µN	30 nm	2 – 3	60 – 70	40 – 50	17 – 23	0.5 – 0.8

La disminución del módulo de Young de la dentina intertubular, comparada con esmalte y dentina peritubular, es debida a la alta concentración de fibras colágenas en la matriz dentinaria; como resultado la dentina intertubular es más viscoelástica que el esmalte y la dentina peritubular. La disminución del módulo hace a la dentina menos propensa a la fractura.⁹

Las propiedades elásticas son anisotrópicas (no es la misma en todas direcciones); los métodos sónicos detectan una anisotropía hexagonal, aunque esta magnitud parece ser pequeña. La dentina tiene un límite de fatiga para la tensión normal de masticación, ~ 30 MPa, una dentina libre de fisuras aparentemente no falla. Sin embargo, una aproximación basada en el rango de desarrollo de fracturas indica que

si hay una fisura de tamaño suficiente ($\sim 0.3 - 1.0$ mm), puede resultar catastrófico en proporción con cargas cíclicas con tensión menor a 30 MPa.¹⁰⁻¹²

Maev *et al.* (2002) estudiaron las propiedades físico-mecánicas de los tejidos dentarios humanos con microscopio acústico, y observaron que la dentina no es uniforme; la dentina del manto y la peripulpar tienen menor impedancia comparada con la mayoría de la dentina (Cuadros 3 y 4).

Tipo de tejido	Total de muestras medidas	C_L m/s
Esmalte normal	7	5 900 \pm 300
Puntos blancos en esmalte	3	4 900 \pm 200
Esmalte en el área de cavidad cariada	3	5 500 \pm 700
Dentina normal	7	3 900 \pm 200
Dentina translúcida	5	4 500 \pm 400
Dentina destruida en el área de cavidad cariada	3	3 600 \pm 200

Muestra	C_L m/s		
	Dentina del manto cercana a esmalte	Dentina	Dentina cerca de la cámara pulpar
N° 1 premolar	3490 \pm 250 (33)	3770 \pm 210 (56)	3240 \pm 230 (41)
N° 2 premolar	3450 \pm 190 (32)	3550 \pm 160 (23)	2980 \pm 210 (10)
N° 3 premolar	3240 \pm 130 (11)	3870 \pm 240 (19)	3260 \pm 260 (9)
N° 4 molar	3950 \pm 320 (10)	4270 \pm 210 (32)	3650 \pm 200 (21)
Valor medio	3530 \pm 300	3870 \pm 300	3200 \pm 290

El número entre paréntesis indica cuantas mediciones fueron hechas en la misma zona

Maev cita a Lees, quien reporta que la impedancia acústica y la velocidad de sonido se incrementan proporcionalmente con el desarrollo de la concentración de un componente inorgánico en tejidos duros simulados.

Asimismo, Maev *et al.* (2002), concluyen que las imágenes acústicas de la superficie reflejan propiedades fisicomecánicas de los tejidos en concordancia con la distribución de los valores locales de velocidad de sonido y pueden ser usadas para evaluación cualitativa preliminar. La velocidad de sonido longitudinal también proporciona un dato importante en las propiedades fisicomecánicas de diferentes estructuras de los dientes, las cuales pueden ser de una importancia significativa como un criterio de evaluación no destructiva de la condición de los tejidos mineralizados.¹³

Senawongse *et al.* (2006), no identificaron el efecto de la edad en la dureza y módulo de elasticidad de la dentina primaria, sin embargo, demostraron los efectos de estas propiedades en tipos específicos de dentina. En la dentina del manto, la dureza y

módulo de elasticidad de la dentina madura son mayores que en la dentina joven. La dentina reaccionaria en el diente maduro y la dentina secundaria recientemente desarrollada en los dientes jóvenes demostraron menor módulo de elasticidad y dureza que la dentina circumpulpar. Módulo de elasticidad y dureza relativamente bajos se observaron en la zona entre dentina secundaria y reaccionaria.¹⁴ Tesch y Kinney, en sus respectivos trabajos reportaron que la dureza y módulo de elasticidad se incrementan con el contenido mineral existiendo una correlación no lineal entre el contenido mineral y la microdureza^{15,16} (Cuadro 5).

Dentina	Diente joven	Diente maduro
Dentina del manto	196 \pm 32	144 \pm 38
Dentina globular	126 \pm 121	72 \pm 75
Dentina primaria y secundaria	2148 \pm 411	3056 \pm 602
Dentina reaccionaria	0	548 \pm 284
Espesor de dentina total	2470 \pm 409	3820 \pm 852
Edad	22 \pm 2.7	61 \pm 6.0

Piezolectricidad de la dentina

Los tejidos mineralizados exhiben piezolectricidad. Inicialmente se pensaba que el mineral hidroxiapatita causaba el fenómeno, sin embargo, ahora se sabe que la estructura no-centrosimétrica de la molécula de colágena es responsable de la conducta de piezolectricidad. Habelitz *et al.* encontraron piezolectricidad en la matriz de la dentina intertubular, mientras que la dentina peritubular permaneció sin respuesta. La piezorespuesta de las fibras colágenas depende de la orientación de las mismas; el desplazamiento de iones adyacentes en direcciones opuestas causa la generación de un campo eléctrico.¹⁷

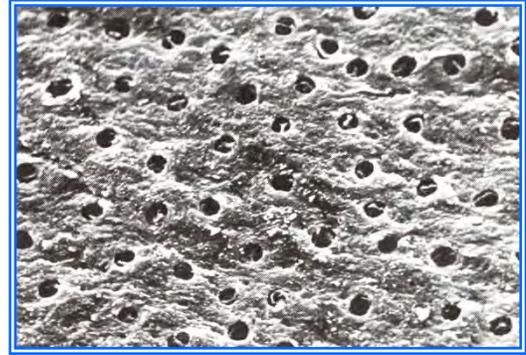
Composición química de la dentina

La dentina está compuesta de alrededor del 70 % de material inorgánico, 20 % de material orgánico y 10 % de agua.^{6,8} El principal componente inorgánico es la hidroxiapatita, en cuyos cristales se puede encontrar fluoruro o carbonato^{1,6} (Cuadro 6).

	Mineral Peso % (vol %)	Orgánico Peso % (vol %)	Agua Peso % (vol %)
LeGeros	70 (47)	20 (30)	10 (21)
Kinney <i>et al.</i>	60 (45)	35 (48)	- (7)
Frank <i>et al.</i>	70 (47)	20 (32)	10 (21)

Como se observa en la figura dos, la dentina es un material compuesto heterogéneo que contiene túbulos de diámetro micrométrico rodeados por dentina peritubular altamente mineralizada (95 % de la fase mineral) embebida en una matriz de colágena parcialmente mineralizada (dentina intertubular - 30 % de la fase mineral),^{1,2,6,8,18}

Figura 2. Túbulos dentinarios cortados transversalmente¹⁹



El componente orgánico de la dentina es colágena Tipo I (comprendiendo 90 % de la matriz), con proteoglicanos entre las fibras. También se encuentran proteínas no colágenas. Con excepción de las proteínas plasmáticas, las proteínas se encuentran ausentes en la predentina no calcificada de la superficie pulpar. Los lípidos comprenden aproximadamente 1.7 % de la matriz orgánica dentinaria.²⁰

Las fibras colágenas tienen alrededor de 50 a 100 nm de diámetro, están orientadas en un plano perpendicular a la dirección de la formación de la dentina¹⁰ dentro del plano del frente de mineralización y perpendicular a los túbulos,²¹ formando bloques de fibras colágenas ordenadas a lo largo de los túbulos.²² El mineral ocupa dos sitios entre la malla de colágena: intrafibrilar (en las zonas espaciadas en la fibra colágena) y extrafibrilar (entre las fibras). Entre el 70 y 75 % del mineral puede ser extrafibrilar.¹⁰

En la dentina primaria el diámetro de la dentina peritubular es mayor cerca de la unión con la dentina secundaria, o de la cavidad pulpar que con el esmalte. El mayor desarrollo de la dentina peritubular es más localizado cerca de la unión con pulpa, en tanto que la dentina intertubular es poco notable entre las áreas de dentina peritubular. La matriz peritubular es menos abundante que la intertubular, pero también está compuesta de colágena, la cual es más hidratada²⁰ (Figura 3). Fibras de colágena se distribuyen entre las paredes de los túbulos dentinarios formando una malla fibrilar de colágena con pequeños cristales de hidroxiapatita ricos en carbonato y deficientes en calcio.^{2,3}

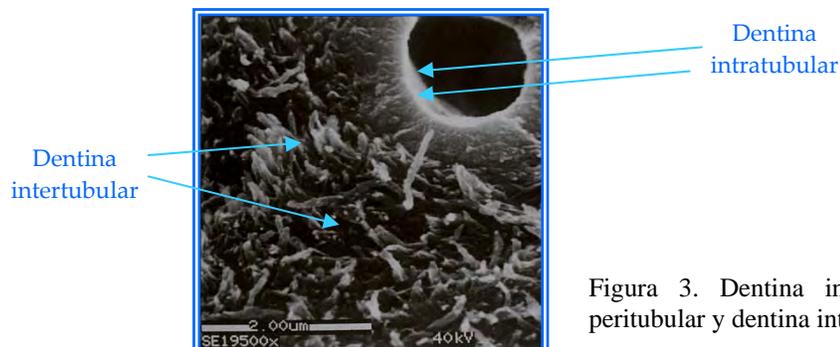


Figura 3. Dentina intratubular o peritubular y dentina intertubular.²

Odontoblastos

Los odontoblastos son células altamente diferenciadas que forman la matriz dentinaria tubular, producen los precursores de la colágena Tipo I y las glucoproteínas que forman la dentina;^{1,6} después de que la dentina primaria ha sido formada, continúan formándola durante toda la vida del diente,^{1,6,8} en consecuencia forman la dentina y la mantienen.^{1,6} (Figura 4)

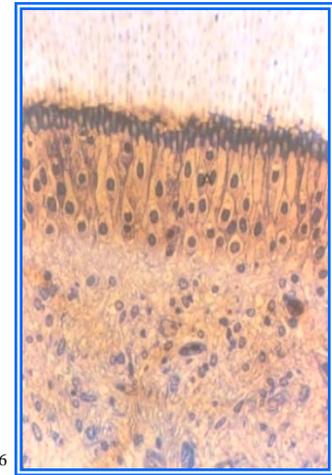
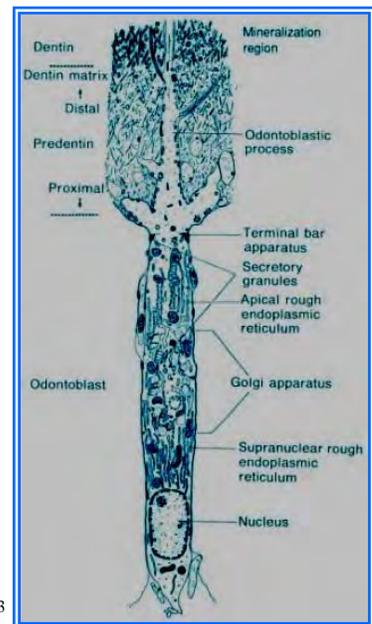


Figura 4. Odontoblastos vistos con microscopio de luz⁶

Los cuerpos celulares de los odontoblastos permanecen en la cámara pulpar, en tanto las extensiones protoplásmicas (procesos odontoblásticos) se encuentran en la predentina y la matriz mineralizada, de esta forma cada túbulo dentinario está ocupado por un proceso odontoblástico, éstos son extremadamente largos comparados con el tamaño del cuerpo celular y están rodeados por una membrana celular.^{1-3,6,8} Los procesos alcanzan varios milímetros de largo, pero tienen aproximadamente un micrómetro de diámetro.¹⁷ En la dentina calcificada se observan los procesos odontoblásticos que contienen microtúbulos, microfilamentos, y vesículas responsables del transporte y descarga de materiales en el espacio periodontoblástico^{1,6} (Esquema 2).



Esquema 2. Odontoblasto²³

Los túbulos dentinarios tienen múltiples ramificaciones principalmente en la unión pulpodentinaria.^{1,6} Los procesos odontoblásticos están embebidos en la matriz extracelular y permanecen en ella durante y después de la mineralización, creando los característicos túbulos en la dentina.¹⁷ Las variaciones morfológicas en la luz de los túbulos dentinarios, debido a la obliteración gradual de la luz tubular, influyen en los cambios de presión en el interior de los mismos.^{2,3}

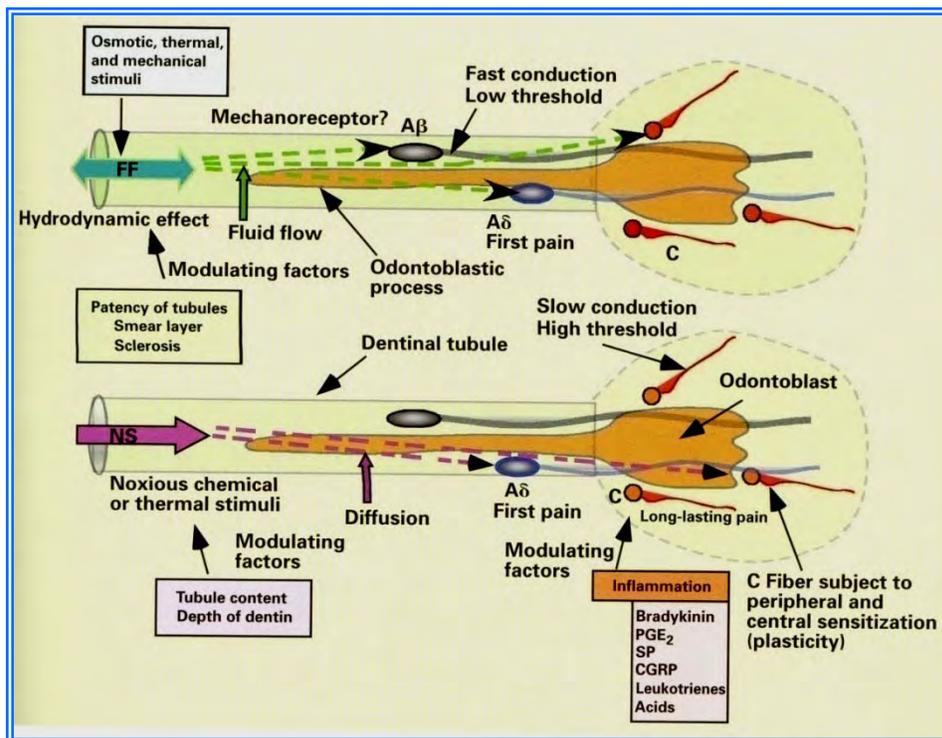
Si la capa de odontoblastos es retirada, los procesos odontoblásticos son removidos de los túbulos no mineralizados de predentina, la matriz dentinaria no se mineraliza; se observan aberturas de 3 μm de diámetro cuando la matriz de la dentina peritubular no ha sido formada y pozos de fibras colágenas de aproximadamente 100

nm de diámetro. Cuando la pre dentina es removida se observa la matriz dentinaria mineralizada subyacente en forma de calcosferitas.²

El fluido dentinario se encuentra en el espacio periodontoblástico (espacio entre la pared del túbulo y el proceso odontoblástico). Este fluido proviene de la sustancia intercelular de la pulpa dental, contiene un producto con iones de fosfato y calcio y diversas formas de fosfato de calcio que tiende a formar depósitos minerales en los túbulos dentinarios. El proceso odontoblástico y el fluido dentinario son los responsables de la vitalidad de la dentina.^{2,3}

Permeabilidad dentinaria

Hay un movimiento transdental de sustancias a través de los túbulos dentinarios en respuesta a estímulos hidrodinámicos. Es a través del fluido dentinario de los túbulos que las sustancias químicas nocivas se difunden y producen reacciones pulpares: en corto tiempo, la pulpa responde a los estímulos químicos con una respuesta inflamatoria aguda, hay un movimiento hacia el exterior de fluidos y macrófagos.² A largo plazo el tejido pulpar produce dentina terciaria como una respuesta biológica para reducir la permeabilidad del complejo pulpodentinario y restaurar la obliteración natural de los túbulos. Por lo tanto el complejo pulpo-dentina funciona como unidad integrada.^{2,7} (Esquema 3)



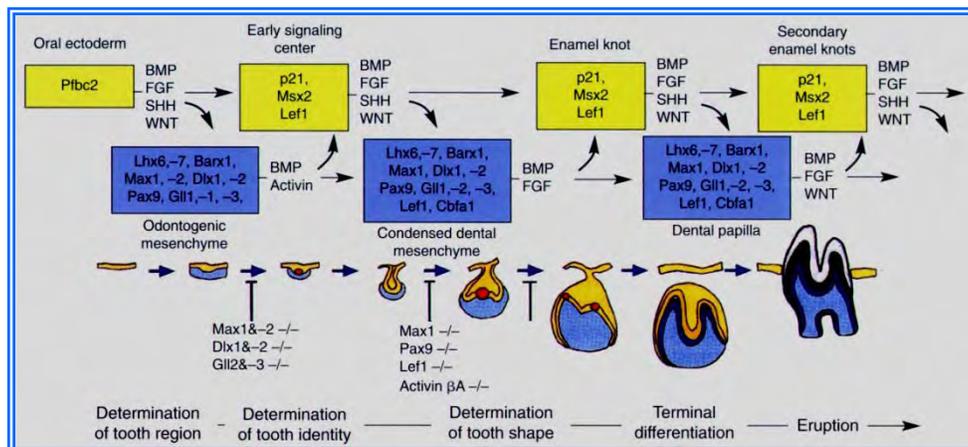
Esquema 3. La presión osmótica entre los confines de los túbulos dentinarios genera distorsión hidrodinámica en los fluidos en dentina y pre dentina. Cuando el movimiento externo del fluido dentinario es extremadamente doloroso se crean disturbios locales en la membrana axonal, provocando la activación de los canales iónicos sensibles a la tensión, se inicia la despolarización y genera el potencial de acción.²⁵

DENTINOGENESIS

Odontogénesis

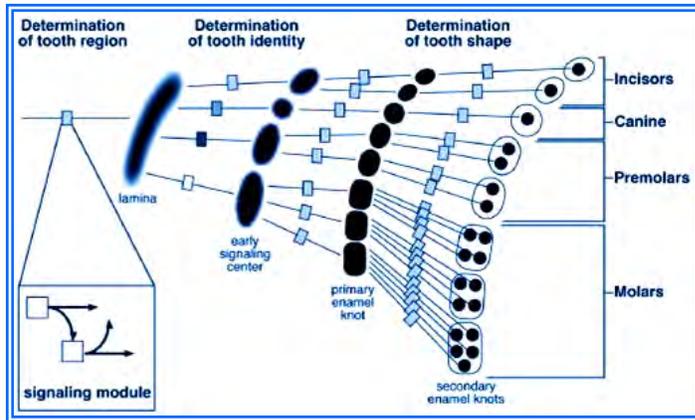
El desarrollo dentario (odontogénesis) inicia a partir de la 6ª semana de vida intrauterina; parece iniciarse o desencadenarse por células de la cresta neural craneal (ectomesénquima) derivada del neuroectodermo.^{2,26-36} Los experimentos de recombinación de tejidos indican que el epitelio dental inicial, y no la cresta neural, puede determinar el tipo de diente.^{29,30} La determinación sucesional de región dentaria, tipo de diente, base de la corona dentaria y cúspides individuales envuelve la activación diferencial de genes *homeobox* en el mesénquima; esta señalización diferencial puede permitir la divergencia evolutiva de forma dentaria entre los cuatro tipos de dientes.^{25,28-30,33,35} Estos genes regulan genes de factor de desarrollo, lo cual demuestra la complejidad de los lazos regulatorios genéticos relacionados en la odontogénesis³⁵⁻³⁸ (Esquema 4).

Módulos de señalización desde la iniciación hasta la formación de las cúspides



Esquema 4. Moléculas (factores de transcripción, factores de desarrollo y otras proteínas) envueltas en las interacciones de señalización epitelio-mesénquima durante el desarrollo del diente.^{2,28}

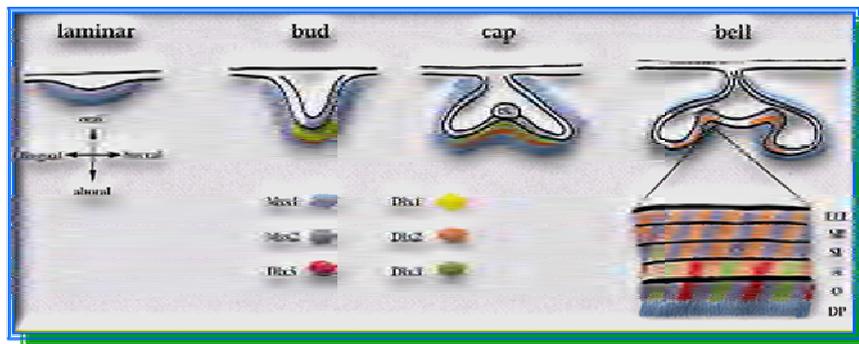
El requerimiento de diferentes genes en las redes de señalización son estado-dependientes.^{28,35} La odontogénesis es un proceso en cascada que provee un modelo molecular por el cual son controladas interacciones tisulares específicas;^{30,38} los estudios han revelado una señalización inductiva y jerarquizada en factores de transcripción *downstream*²⁸ (Esquema 5).



Esquema 5. Modelo en cascada de la determinación de región dentaria.²⁸

La interacción epitelio bucal-ectomesénquima estimula el desarrollo de un engrosamiento ectodérmico conocido como lámina dental, a partir de la cual se forman diez invaginaciones que son los esbozos de los dientes de la primera dentición.^{6,27-35}

Las señales del mesénquima regulan la formación de centros de señalización epitelial; después de señales recíprocas subsecuentes que son recibidas en los centros de señalización epitelial el mesénquima puede adquirir la máxima competencia para inducir el desarrollo dentario^{28,35-40} (Esquema 6).

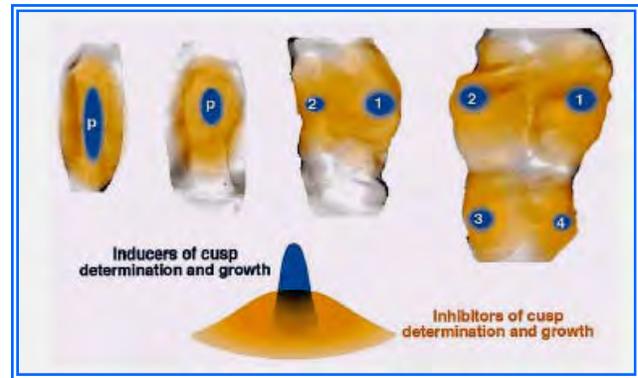


Esquema 6. Expresión de numerosas señales durante la odontogénesis⁴¹

La transición del estado de yema al estado de capucha parece ser un paso crítico en la morfogénesis dentaria y marca el inicio del desarrollo de la corona dentaria.^{28,30,31} El sitio en la punta de la yema dentaria donde inicia el plegamiento del epitelio, marca la formación del nudo del esmalte, un centro de señalización que expresa muchas de las mismas señales que el centro de señalización epitelial inicial. Como estos factores de transcripción son blancos para la señalización BMP, FGF y Wnt, la formación de la capucha del diente parece depender nuevamente de estas redes de señalización.^{28,31,41}

Las señales moleculares regulando posiciones relativas de las cúspides (nudos de esmalte secundarios) son activas inmediatamente después de la apoptosis del nudo del esmalte primario^{28,29,32} (Esquema 7)

Esquema 7. Efecto de inductores e inhibidores durante el desarrollo de las cúspides³⁶



La membrana basal dental interpuesta entre el epitelio dental y el mesénquima dental media las interacciones secuenciales esenciales epitelio-mesénquima para la morfogénesis y diferenciación dentaria; contiene isoformas de colágena tipo IV, laminina, nidogen/entactina, proteoglicano heparansulfato, fibronectina y colágena tipo I y III.⁴²

Estadio de campana tardío, diferenciación en odontoblastos

La diferenciación terminal de los odontoblastos ocurre en un patrón temporo-espacial específico entre cada diente.^{2,23,29,30,43} La diferenciación de odontoblastos inicia siempre desde la punta de las cúspides, por lo que es probable que algunas de las señales expresadas en los nudos de esmalte pueden actuar como inductores de la diferenciación de odontoblastos.⁴⁴ Esta diferenciación es marcada por la expresión de colágena tipo I.² Los odontoblastos jóvenes desarrollan sistemas de unión de tipo adherente y comunicante entre ellos. La célula se hace cilíndrica y el núcleo se desplaza hacia la zona distal³ (Esquema 8).



Esquema 8. Desarrollo de los odontoblastos²³

Matriz dentinaria

Durante la diferenciación de preodontoblastos en odontoblastos jóvenes, las células empiezan a secretar la matriz dentinaria, debido a que los preodontoblastos han adquirido las características de las células secretoras, en este momento, sintetizan colágena tipo I y III, así como fibronectina y glicosaminoglicanos.^{8,23} La formación de dentina siempre es precedida por la formación de predentina.^{8,23,29,30}

Dentina del manto

La dentina del manto es la primera dentina que depositan los odontoblastos recientemente diferenciados, localizada adyacente al esmalte, por lo tanto es la capa externa de la dentina primaria. Es una dentina circunferencial regular, menos mineralizada (cerca del 4 %), de 150 μm de ancho, los odontoblastos no están completamente diferenciados pero tienen un proceso odontoblástico relativamente corto.²

Cuando la pre dentina de la dentina del manto alcanza un espesor aproximado de 6 μm comienza la mineralización, los odontoblastos participan en el proceso de calcificación captando y almacenando calcio, elevando la concentración local de iones de fosfato mediante la fosfatasa alcalina, y formando vesículas nutricionales.³ La primera capa de matriz pre dentina actúa como una señal para las células del epitelio interno del esmalte a diferenciarse en ameloblastos y secretar la matriz del esmalte.

2,3,8,23,29,30

El odontoblasto se alinea en la superficie interna de la dentina y permanece metabólicamente activo a través de la vida del diente.²

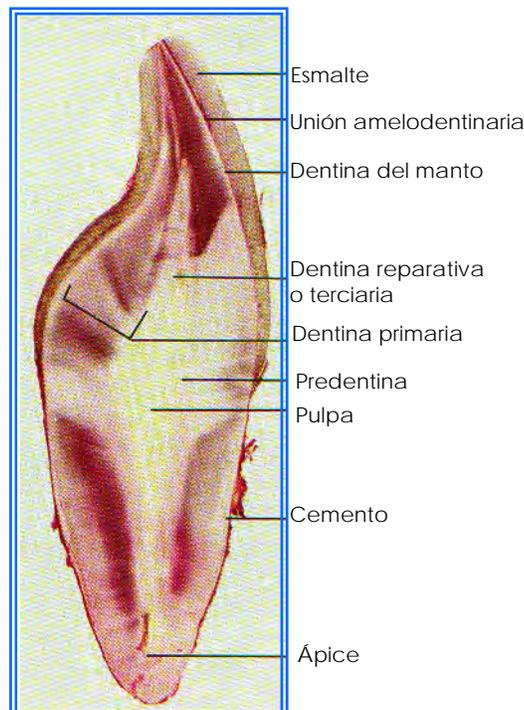


Figura 5. Localización y distribución de varios tipos de dentina⁸

Dentina primaria

Dentina tubular original, representa la mayor parte de la dentina, delimita la cámara pulpar de los dientes ya formados, y está formada por la dentina del manto y la dentina circumpulpar formada antes de la erupción del diente.^{1,2,3,6,8}

Dentina secundaria

Al igual que la dentina primaria ésta es dentina circumpulpar, pero se deposita después que se ha formado completamente la raíz del diente.^{1,2,6} La mayor diferencia entre la dentina primaria y la secundaria es que esta última es secretada más lentamente. Debido a que los mismos odontoblastos forman ambos tipos de dentina, los túbulos permanecen continuos.^{2,3,6,26}

MINERALIZACIÓN DE LA DENTINA

Los odontoblastos forman la matriz mineralizada, segregan colágena en la unión amelodentinaria y migran centripetamente arrastrando al proceso odontoblástico.

Colágena tipo I

Durante la formación de la primera capa de matriz predentina, se observan trazos de colágena IV y I. Sin embargo, la colágena I es la llave estructural de la matriz dentinaria, es la proteína más abundante y ofrece una matriz fibrosa para la deposición de cristales de carbonato apatita. (Figura 10).

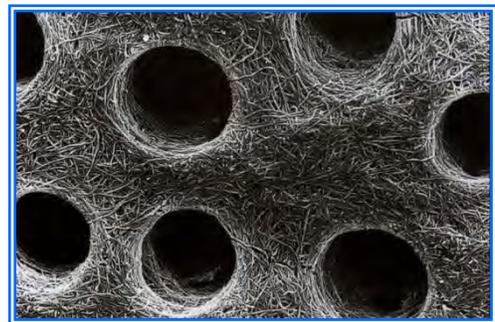


Figura 6. Colágena y túbulos dentinarios ²

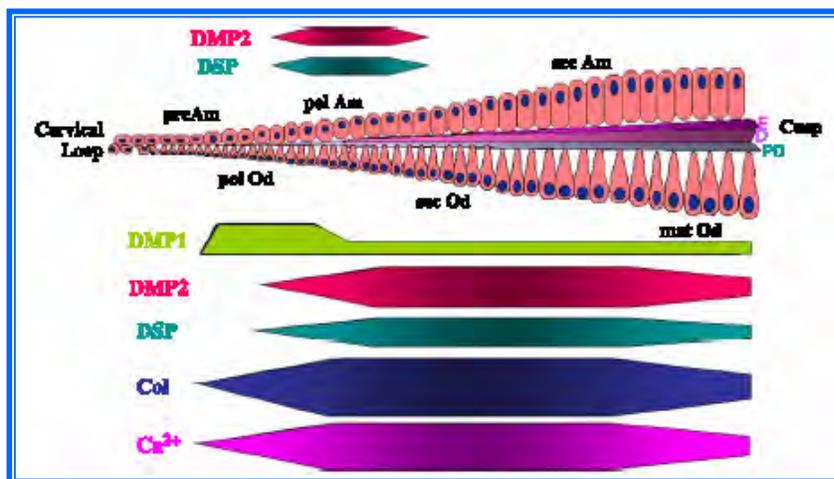
Proteínas no colágenas

Estas proteínas comprenden cinco grupos:

- ▶ El grupo más importante se compone de dos proteínas

- ◆ fosfoproteína de la dentina (DPP) o fosforina (50 %), tiene alta afinidad por la colágena tipo I y por el calcio y afecta la forma y tamaño de los cristales de apatita
- ◆ sialoproteína de la dentina (DSP) (5 – 8 %)
- ▶ Proteínas con propiedades de unión a calcio, específicas de tejido mineralizado: osteocalcina, sialoproteína ósea (BSP) y proteína 1 de la matriz dentinaria (DMP1)
- ▶ Proteínas como la osteopontina y la osteoconectina
- ▶ Glucoproteína α 2HS
- ▶ Factores de desarrollo como BMP y TGF- β ²

La DMP1 es esencial para la mineralización de hueso y dentina, pero su papel exacto en la osteogénesis y dentinogénesis no es claro.⁴⁵ El equipo de Lu (2007) sugiere que la DMP1 es una llave reguladora de la diferenciación de odontoblastos, de la formación del sistema de dentina tubular y de la mineralización y su expresión es requerida en los odontoblastos iniciales, pero que su expresión es continuada en los odontoblastos maduros y también requerida para una dentinogénesis normal.⁴⁶⁻⁴⁸ Lu señala a DMP1 como un gen candidato para desórdenes de la mineralización de la dentina y potencialmente para condiciones de agenesia dental.⁴⁶

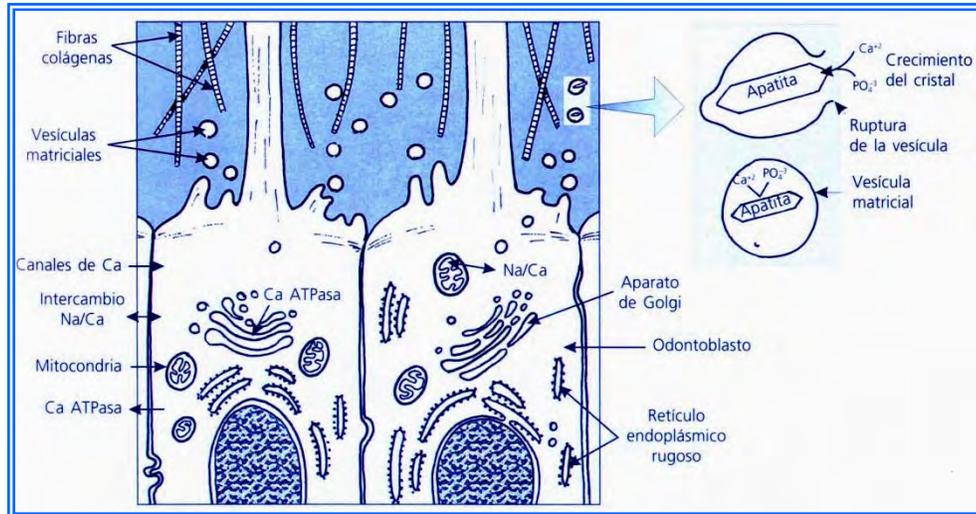


Esquema 9. La expresión de DMP1 es alta en los odontoblastos que han empezado a sintetizar una matriz mineralizada, con la nucleación inicial del fosfato cálcico la expresión de DMP1 declina con el desarrollo. La expresión de DMP2 y DSP se observó durante todo el proceso. La secreción de colágena tipo I y la deposición de calcio fueron observadas desde la polarización inicial de los odontoblastos y a través del proceso de mineralización. preAM: preameloblastos; pol AM: ameloblastos polarizados; sec AM: ameloblastos secretores; pre Od: preodontoblastos, pol Od: odontoblastos polarizados; sec Od: odontoblastos secretores; mat Od: odontoblastos maduros; E: esmalte; D: dentina; PD: pre-dentina.^{46,47}

Los odontoblastos humanos maduros pueden sintetizar colágena tipo III y ésta puede interferir con una mineralización dentinaria apropiada, las MMPs pueden ser necesarias para degradar la colágena tipo III y facilitar su remoción de la pre-dentina.^{7,49}

Vesículas matriciales

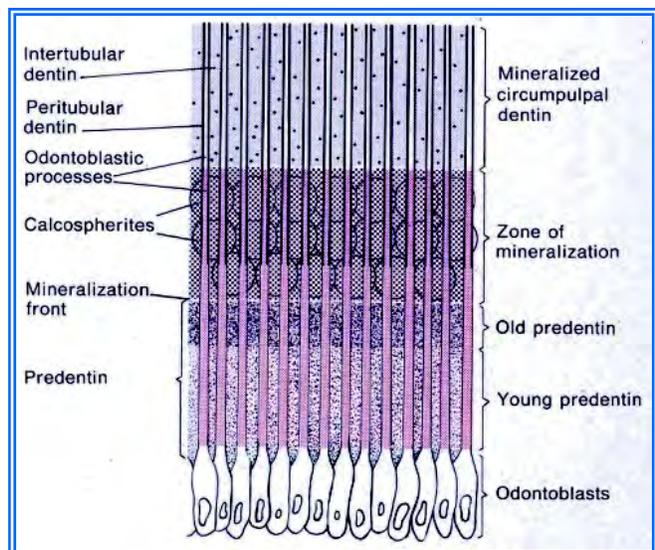
Las vesículas matriciales son la base de la calcificación, son formaciones esféricas de 100 a 200 nm de diámetro, limitadas por una membrana que se origina por gemación del odontoblasto. En su interior el calcio y el fosfato precipitan al encontrar un microambiente adecuado para ello: los iones acumulados en las vesículas precipitan como fosfato de calcio amorfo y finalmente se transforman en cristales de hidroxiapatita ricos en magnesio.³ (Esquema 10)



Esquema 10. Vesículas matriciales.⁸

Frente de mineralización

Al crecer los cristales terminan por romper la vesícula esparciéndose en la matriz circundante, los núcleos de calcificación que se fusionan unos con otros constituyen el frente lineal de calcificación. Se produce aposición de cristales de hidroxiapatita en varios puntos a la vez. Aparecen núcleos de calcificación globulares (calcosferitas) que más tarde se fusionan con sus vecinas (Esquema



Esquema 11. Diferentes etapas de la formación de dentina.²³

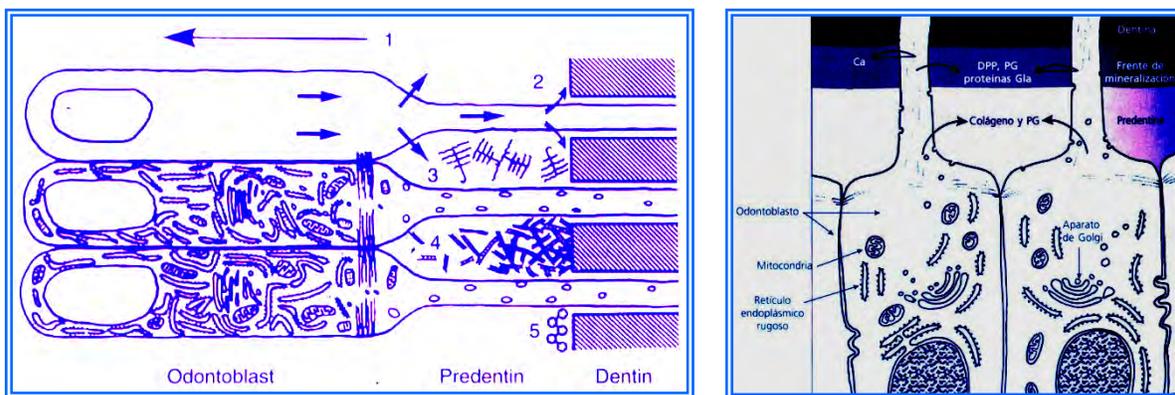
11). Cuando la fusión no se completa, se constituye la dentina interglobular.

El proceso inicial de formación de partículas es semejante al de la dentina del manto, y los cristales se desarrollan en las microfibrillas de colágena.³

La matriz de la dentina peritubular es menos abundante que la matriz intertubular, pero también está compuesta de colágena. Estos datos sugieren que la mayoría de los cristales están localizados alrededor de las fibras colágenas y probablemente no estén asociados a proteínas.²⁰

Dentina peritubular y dentina intertubular

La dentina peritubular delimita el túbulo rodeando al proceso odontoblástico, y se mineraliza simultáneamente con el frente de mineralización de la dentina intertubular. Habelitz (2007) sostiene la hipótesis que la dentina peritubular es un tejido no colágeno y un producto de la secreción de proteínas especializadas que facilitan la mineralización de la pared del túbulo,¹⁷ haciendo referencia al modelo de secreción dual establecido por Linde (1989) el cual propone la expresión y secreción de dos matrices de diferente composición, por ejemplo que Gla-proteínas están predominantemente localizadas en el frente de mineralización, mientras que la mayoría de la predentina consiste de colágena tipo I y proteoglicanos que hidroliza durante la mineralización (Esquemas 12 y 13).



Esquemas 12 y 13. Niveles de secreción propuestos por Linde. El nivel de secreción mayor en el extremo proximal del cuerpo celular del odontoblasto forma una matriz que comprende colágena y proteoglicanos avanza al frente de mineralización aproximadamente en 24 hs. El nivel distal de secreción está estrechamente relacionado al frente de mineralización donde son secretados varios componentes de la matriz no colágena específicos de tejido, nucleadores para la formación de cristales de hidroxiapatita.^{1,2,3}

Las diferencias de espacio y tiempo en la composición de la matriz puede ser responsable de la generación de dos tipos de tejido observados: la dentina intertubular, basada en fibras colágenas, y la dentina peritubular formada por proteínas no colágenas y ricas en ácido glutámico. Ambas fosfoproteínas y Gla-proteínas tienen una alta afinidad por iones de calcio y pueden inducir la nucleación

de apatitas, sugiriendo un papel inductivo en la mineralización, acorde con el alto grado de mineralización de la dentina peritubular.⁵ En este contexto el estudio de Gotliv reporta que la matriz orgánica de la DPT consiste de un único ensamble libre de colágena de proteínas ricas en ácido glutámico, mientras que la matriz orgánica de la DIT es rica en colágena y rica en Asp.⁵⁰

A gran escala, la dentina puede ser modelada como un composite reforzado continuamente con fibras, con la dentina intertubular formando la matriz y el lumen del túbulo con su vuelta asociada de dentina peritubular formando el reforzamiento cilíndrico.¹⁰ Machado *et al.*, reportan que fragmentos de dentina desmineralizada y esterilizada implantados en músculo de ratón presentan una capacidad osteoinductiva similar a la del hueso liofilizado y desmineralizado, presentando áreas de calcificación en un periodo de 180 días.⁵¹

Estados iniciales de la mineralización de la dentina

La formación de tejidos calcificados es un proceso altamente regulado. Así, se forma una estructura mineralizada ordenada jerárquicamente; por lo menos se requieren dos mecanismos regulatorios: (1) iniciación de la nucleación en sitios específicos de la fibra colágena y (2) prevención del desarrollo sin inhibición de cristales y su formación en áreas en las cuales la mineralización no es deseable.⁵²

Refiere Boskey (1991) que los estados iniciales de la mineralización de la dentina humana están constituidos por un fenómeno de nucleación mediada por células que producen los componentes de la matriz extracelular en la cual aparece un núcleo crítico.^{53,54} El equipo de He (2005) demostró que macromoléculas presentes en la matriz orgánica, como DMP1, pueden sufrir un cambio conformacional y formar una plantilla pre-organizada. La iniciación de nucleación de apatitas es altamente dependiente de la formación de una plantilla preorganizada y funciones de reconocimiento molecular.⁵² Las proteínas no colágena tales como las fosfoforinas pueden estar envueltas en la nucleación de cristales conteniendo calcio -y fosfato-, tales proteínas no sólo inducen la formación de núcleos, también pueden ser un control para la orientación y desarrollo inicial de los cristales.⁵⁵ Otros constituyentes de la matriz orgánica pueden también, después de la nucleación, controlar el tamaño y morfología de los cristales.⁵³

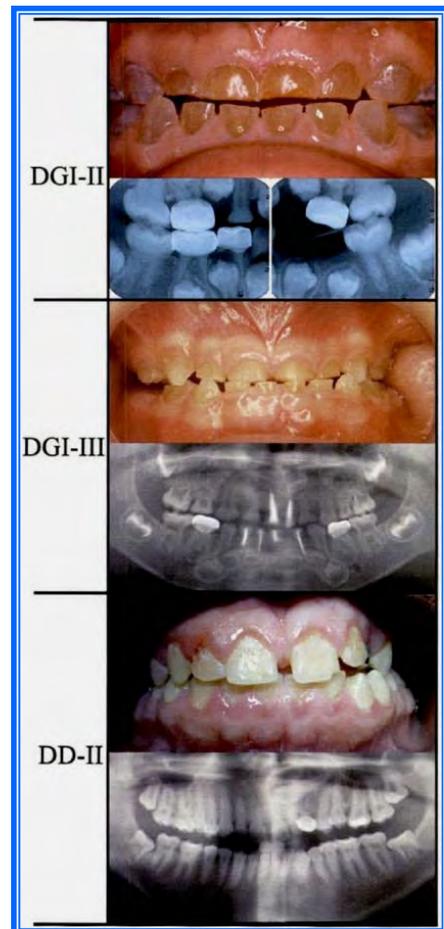
Son necesarios tres componentes, durante la formación de dentina, para una mineralización apropiada:

- ▶ Colágena tipo I, la cual forma una red

- ▶ Proteínas no-colágenas: proteína de la matriz dentinaria 1 (DMP1), fosfoforina de la dentina (PP) y sialoproteína de la dentina (DSP), las cuales pueden unirse a la malla de colágena y funcionan como un nucleador mineral
- ▶ Fosfato de calcio cristalino depositado de una forma ordenada

Los genes de las proteínas no-colágenas residen en el cromosoma 4q21, y los estudios han demostrado que tipos diferentes de mutaciones en DSPP lleva a diferentes fenotipos de dentinogénesis imperfecta II y de displasia dentinaria tipo II, en este orden de ideas, se ha demostrado, que la reducción en los niveles de fosfoforinas es responsable de la mineralización defectuosa de la dentina.⁵⁶⁻⁵⁸ Por ejemplo, los análisis bioinformáticos de mutaciones de DSPP conocidas sugieren que la DI tipo II es usualmente causada por aberración del *splicing* normal.⁵⁹ (Figura 7)

Figura 7. Defectos dentinarios hereditarios aislados. Dentición primaria de una persona con DGI-II (arriba). Las radiografías muestran obliteración pulpar en los molares. Dentición primaria de una persona con DGI-III (en medio). La radiografía muestra pulpa y conductos radiculares ensanchados. Varios dientes presentan abscesos después de exposición pulpar debida a la rápida atrición. Dentición permanente de una persona con DD-II (abajo). Note el parecido al color normal de los dientes. Las cámaras pulpares son más pequeñas de los normal (obliteradas prematuramente).⁵⁵



Hao y colaboradores (2004) establecen que la matriz orgánica sintetizada por los odontoblastos no es homogénea en su composición y que en la mineralización tisular existen zonas bien definidas con diferentes propiedades.⁴⁷ La mineralización tiene lugar de una forma altamente regulada en la unión pre-dentina-dentina. Las proteínas no colágenas son una mezcla heterogénea y operan en una programa controlado, genéticamente muy definido, para nuclear, dirigir la colocación del cristal, estabilizar la fase mineral y regular el tamaño del cristal.⁶⁰ Por ejemplo, la fibromodulina (Fmod) limita la fibrilogenesis de la colágena en pre-dentina promoviendo la mineralización de la dentina y los estados iniciales de la formación del esmalte; su ausencia deteriora la mineralización de la dentina, incrementando el diámetro de las fibras colágenas por toda la pre-dentina y retrasando la formación del esmalte.⁶¹

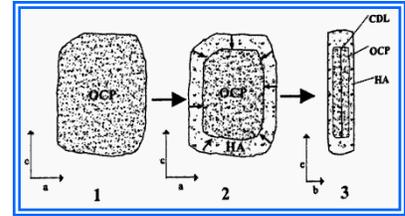
Huang y su equipo (2008) encontraron que la DSP se encuentra en predentina pero no en dentina mineralizada, por lo que no está asociada a cristales de hidroxiapatita, consideran que puede ser metabolizada o removida antes de la mineralización de las fibras colágenas y la conversión de predentina a dentina. Por el contrario la DPP fue detectada exclusivamente en el extracto mineral indicando un fuerte vínculo con los cristales de hidroxiapatita, indicando el papel de la DPP como iniciadora o moduladora de la formación y desarrollo de la hidroxiapatita.⁶² Hwang (2008) encontró que la BSP y la DSP son expresadas en la dentina reparativa, y que la TGF- β 1 incrementa la síntesis de BSP en las células pulpares humanas, por lo que sugiere que la dentina reparativa tiene características osteogénicas y dentinogénicas.⁶³

Magne (2001) sugiere que la maduración del cristal es esencialmente debido a procesos fisicoquímicos y que la matriz orgánica controla solo el tamaño del cristal, multiplicación y/o organización. Las proteínas colágena y no colágenas parecen no interferir fuertemente con el proceso fisicoquímico de la maduración del cristal; sin embargo, los cristales están en estrecha asociación con las proteínas. La colágena controla la iniciación y deposición mineral y el desarrollo de cristales en asociación con fibras, con su eje C paralelo al eje longitudinal de la molécula colágena. Las interacciones cristal-proteínas probablemente a través de grupos fosforilados, son probablemente la interfase con el proceso fisicoquímico de maduración, pero solo durante los primeros pasos de mineralización.^{64,65}

Por otra parte, las fosfoproteínas (principalmente fosforinas en dentina) se unen fácilmente a los cristales de apatita y son consideradas el control de la multiplicación del cristal y/o de su tamaño.^{64,65} Puede iniciar la deposición mineral en regiones localizadas por mecanismos de mineralización mediados por matriz. La PP puede unir iones de calcio con alta afinidad y al mismo tiempo agregar fibras colágenas en el frente de mineralización; la PP puede proveer la interfase de enlace entre el cristal mineral y la fibra de colágena. George y Hao (2005) citan a Dahlin, mencionando que los fluidos biológicos son metaestables con respecto al fosfato cálcico, por ejemplo, están abajo de la saturación necesaria para la precipitación espontánea, pero pueden elevar la saturación para soportar el desarrollo del cristal después de que el núcleo inicial ha sido formado. Por lo tanto, una fuerza es requerida para vencer la energía de la barrera formación para la existencia de cristales de hidroxiapatita termodinámicamente estables. La PP forma una plantilla biológica con combinación epitaxial a la superficie del cristal puede proveer tal fuerza.⁶⁶

En la mineralización inicial los cristales pueden desarrollarse directamente en una estructura de hidroxiapatita (HA),⁶⁰ pero algunos autores han propuesto que la formación de cristales de hidroxiapatita puede estar precedida por la formación

transitoria de precursores tales como fosfato octacálcico (OCP).⁶⁷ Esta posibilidad puede explicar la ausencia de cristales de hidroxiapatita con forma hexagonal en los estados iniciales de mineralización.⁶⁰



Esquema 14. Mecanismo de la formación de cristal biológico con OCP.⁶⁶

Bodier-Houllé *et al.* (1998) observaron que los cristales poseen en ambos extremos, una estructura relacionada a HA, y en la parte central una estructura relacionada a OCP.⁶⁸ En este orden de ideas han sido propuestos cuatro pasos para describir la conversión de los cristales nanométricos de HA en cristales de HA adultos. El primer paso es la formación de núcleos de hidroxiapatita.

El segundo estado inicial consiste de adsorción iónica y nucleación de partículas de tamaño nanométrico en sitios de nucleación específicos; cada sitio está confinado a un área discreta de la superficie de la matriz, estos sitios pueden ser distintos dominios estructural, topográfica y electrostáticamente, en la interacción interfacial entre la matriz y el núcleo mineral; el efecto es la energía de nucleación minimizada y el control de la estructura y orientación de nanopartículas. La identidad estructural entre la nanopartícula y el cristal final es un fuerte argumento soportando que las nanopartículas de hidroxiapatita constituyan un genuino paso en la formación biológica de cristales de hidroxiapatita.

En el tercer paso del desarrollo las partículas nanométricas de hidroxiapatita estables parecen desarrollarse por nueva deposición iónica. La dirección de desarrollo parece estar gobernada por la matriz y las partículas vecinas desarrollándose en la matriz misma; estas partículas se fusionan debido a la restricción de espacio.⁶⁸ (Figura 8)

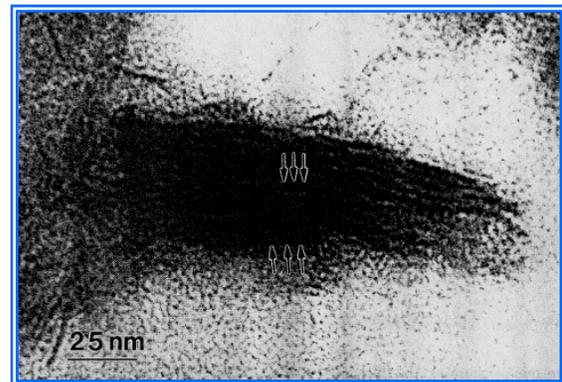


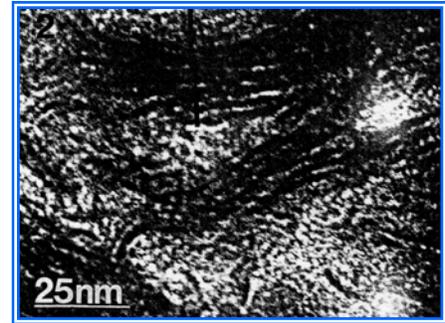
Figura 8. Fusión de las partículas nanométricas.⁶⁹

El último estado observado para el desarrollo de cristales óseos es una fusión lateral de cristales parecidos a cintas. El estado de desarrollo final puede ser el simple resultado de la restricción impuesta por el armazón orgánico, el cual limita el espacio válido para el desarrollo lateral.^{68,70}

Los cristales primarios consisten de hilos compuestos de islas de apatita de tamaño nanométrico, los cuales rápidamente coalescen en agujas y posteriormente en listones; estos hilos son inicialmente orientados cristalográficamente a lo largo del eje

de manera bipolar así que las distancias centro a centro entre las islas pudieran reflejar las distancias entre sitios de nucleación a lo largo de la matriz.⁷⁰ (Figura 9)

Figura 9. Estado de coalescencia⁶⁸



Se han observado agujas en el estado inicial, cadenas de fosfato de calcio primario e hilos de apatita compuesta de partículas nanométricas, en el desarrollo de la dentina, hueso, cartílago de desarrollo, tendón de la tibia del pavo mineralizado fisiológicamente,^{71,72} y esmalte.⁷¹

Los hilos (agujas) de fosfato de calcio desarrollándose en espesor, pueden ser capaces de quebrar las uniones laterales entre microfibrillas adyacentes de forma de listones, rodeando las microfibrillas; desarrollándose en todas direcciones laterales los cristalitas pueden gozar de un contacto multiplegado, desarrollándose un "continuum" de cristalitas contactando con microfibrillas estando rodeadas por los cristalitas. El sistema de arreglo puede dar la base primaria para las cualidades biomecánicas positivas de los tejidos duros ricos en colágena.⁷¹

En la mineralización de la dentina circumpulpar los cristales desarrollándose rara vez refuerzan el macroperiodo colágeno.⁷¹ La mineralización parece iniciar en la superficie colágena y avanzar dentro del interior de la fibra colágena. La sustancia mineral *per* volumen es hasta de un factor de 2 más alto que el interior de la fibra colágena.⁷¹ La mayoría de los cristales están localizados alrededor de las fibras colágenas y probablemente no están asociados con componentes proteínicos.²⁰

Los cristales de la dentina peritubular tienen casi la misma cristalinidad que aquellos del espacio intertubular, que muestran cantidades comparables de iones de carbonato, aunque algunos fosfatos tienen diferentes ambientes no-apatíticos.²⁰

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La revisión exhaustiva de la literatura científica sobre la dentina no ha profundizado en los análisis morfológicos sistemáticos que caractericen la ultraestructura de la dentina humana, ya que hasta este momento se tienen escasos datos sobre sus nanopartículas debido a que los estudios al respecto se han realizado en muestras de animales, por lo que es importante realizar investigaciones que se adentren en dichos conocimientos para el mejor entendimiento de la ultraestructura dentinaria, así como de su fisiodinamia, patología y biomineralización.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar los componentes estructurales de la dentina humana a nivel nanométrico y su composición química.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la ultraestructura de los túbulos dentinarios
- Determinar a través de la espectroscopía infrarroja los principales componentes de la dentina humana
- Determinar las concentraciones de Ca y P en dentina, predentina y unión amelodentinaria
- Determinar las características estructurales de los cristales de la dentina humana

HIPÓTESIS

1. Los procesos odontoblásticos se comunican entre sí a través de las ramificaciones de los túbulos dentinarios.
2. La dentina humana es un tejido formado por partículas de hidroxiapatita altamente estructuradas.

JUSTIFICACIÓN

Adelantar un estudio científico que permita la caracterización de la ultraestructura de los túbulos dentinarios y, características de las nanopartículas que conforman la dentina humana, permitirá en primera instancia, profundizar en los conocimientos de las bases fisiológicas y morfológicas de la dentina, sustentada sobre el conocimiento actual del comportamiento biológico del tejido y, en segunda instancia, confrontar estos hallazgos con el conocimiento ya establecido que tradicionalmente se ha venido aceptando, además de continuar esta línea de investigación en estudios posteriores que permitan determinar si este hecho se comporta con el mismo perfil.

CAPÍTULO I

TÉCNICAS DE OBSERVACIÓN Y ANÁLISIS

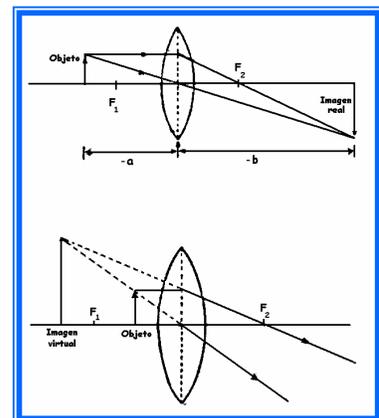
El estudio microscópico de células y tejidos inició con el microscopio óptico, y en este contexto es una herramienta esencial, junto con los imaginativos inventos más recientes basados en haces de electrones y otras formas de radiación.⁷³ Actualmente el microscopio electrónico es familiar a la mayoría de los investigadores dedicados a las ciencias físicas y biológicas, puesto que se ha convertido en una herramienta fundamental dentro de la investigación, principalmente de la microestructura de los materiales.⁷⁴

Para la realización de este estudio sobre la nanoestructura de la dentina humana se utilizaron los microscopios electrónicos de barrido y de transmisión, así como también se realizó el estudio de espectroscopía infrarroja.

MICROSCOPIA ÓPTICA

La lente percibe la “acción” formando imágenes, sobre una pantalla o directamente en la retina del ojo. La figura ilustra la obtención clásica de imágenes reales y virtuales por lentes convergentes. Cuando una lente resulta un instrumento defectuoso en la formación de imágenes, perjudica el poder de resolución, estos defectos se conocen como aberraciones.

Esquema 15. La figura ilustra la obtención clásica de imágenes reales y virtuales por lentes convergentes.⁷³



Abbe reconoció que el poder de resolución (PR) varía directamente con λ e inversamente con AN, por lo tanto $PR = 0.61 \lambda/AN$. PR determina la calidad de un instrumento óptico, un microscopio de luz visible puede poseer un PR del orden de 200 nm; con luz ultravioleta el PR puede ser hasta de 100 nm.⁷⁵

En general, un haz de una radiación de una longitud de onda determinada no puede utilizarse para examinar detalles estructurales mucho más pequeños que su propia longitud de onda: esto supone una limitación fundamental de los microscopios. Así pues, el límite de resolución de un microscopio óptico está determinado por la longitud de onda de la luz visible, que abarca desde 0.4 μm (para el violeta) hasta 0.7 μm (para el rojo lejano). En la práctica, las bacterias y las mitocondrias, que tienen

aproximadamente 500 nm (0.5 μm) de diámetro, son las estructuras que se pueden observar más nítidamente al microscopio óptico; los detalles más pequeños que éstas dimensiones quedan oscurecidos por los efectos de la naturaleza ondulatoria de la luz. En las mejores condiciones posibles: con luz violeta (longitud de onda, $\lambda = 0.4 \mu\text{m}$) y una apertura numérica de 1.4, el límite de resolución teórico que se puede obtener con el microscopio óptico es tan sólo de 0.2 μm .⁷³

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

El proceso físico de la formación de imágenes en el microscopio electrónico es exactamente el mismo que se tiene en un microscopio óptico. Existe una fuerte analogía en los procesos de formación de imágenes de los microscopios electrónicos y ópticos.

Cuando el haz de electrones interactúa con la muestra se producen varios tipos de señales las cuales nos permiten hacer la caracterización estructural y química de ésta. Estas señales son: electrones retrodispersados, secundarios, absorbidos, Auger, transmitidos y rayos X, característicos.⁷⁵

Con la óptica de partículas aceleradas se tiene una iluminación capaz de penetrar la materia y se obtiene un panorama visual de la estructura atómica de las cosas. Los haces de electrones proporcionan la información, vía fenómenos de dispersión e interferencia ondulatoria. Si un haz de electrones se está moviendo bajo la influencia de una diferencia de potencial aceleradora V (en volts), entonces la longitud de onda asociada al movimiento de las partículas se da por

$$\lambda = \frac{12.26 \text{ \AA}}{V^{1/2} (1 + 0.978 \times 10^{-6} V)^{1/2}}$$

La diferencia de potencial que utilizan los microscopios electrónicos modernos para acelerar electrones y convertirlos en haces de partículas moviéndose a velocidades del orden de la mitad de la velocidad de la luz es muy variada, pero siempre está en el orden de kilo electrón volts (keV), por ejemplo, a 100 keV, $v_{e^-} = 1.64 \times 10^8 \text{ m/seg}$. El microscopio electrónico (ME) requiere regiones confinadas, con alto vacío ($\sim 10^{-7}$ torr), para la trayectoria de los electrones.

Actualmente hay dos variantes de ME, el de transmisión (MET) y el de barrido (MEB). En el de transmisión un haz de electrones acelerados incide en la superficie de

una muestra y sale por la cara opuesta de ella; ésta debe tener un espesor menor a 1000 \AA que se logra con técnicas de bombardeo iónico, por ataque químico o electroquímico. En el MEB los electrones que van a dar origen a una imagen salen por la misma cara de la muestra donde incidió el haz de electrones, como si fuera un microscopio de luz reflejada, por lo tanto la muestra puede ser relativamente grande, desde unos milímetros hasta varios centímetros.⁷⁵

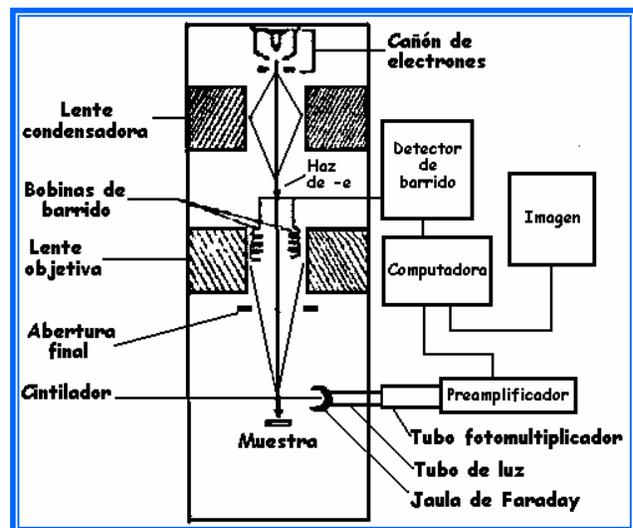
Microscopía electrónica de alta resolución. Se caracteriza por la alta calidad de su lente objetiva y la inclusión de una pequeña lente auxiliar que permite disminuir bastante la aberración esférica del sistema y aumentar su poder de su resolución. Se han logrado obtener resoluciones de hasta 0.17 nm , es decir, resolución atómica.⁷⁵

MICROSCOPIA DE BARRIDO

Es un instrumento diseñado para estudiar, en alta resolución, la superficie de los sólidos. Es extremadamente útil para estudiar las características morfológicas y topográficas de la muestra; como su empleo y manejo son relativamente sencillos, y pueden adaptárseles fácilmente otras técnicas analíticas, su uso se ha popularizado extraordinariamente.⁷⁵

En el MEB un haz de electrones incide en la muestra generando interacciones elásticas e inelásticas, produciendo éstas últimas electrones secundarios cuyas energías son del orden de $3 - 5 \text{ eV}$, los cuales son recolectados por un detector de Everhart-Thornley. El esquema representa un microscopio electrónico de barrido.

Esquema 16. Microscopio electrónico de barrido⁷³



El MEB tiene una profundidad de campo de más de 400 veces que la de un microscopio óptico, así como gran versatilidad en el manejo de ampliaciones ($10X \rightarrow 105X$), mayor resolución ($3-6 \text{ nm}$) y la preparación de muestras es relativamente fácil. El nivel de interacción de los electrones incidentes está determinado por la energía de los electrones que chocan y por el tipo de átomo que exista en la muestra;

el haz puede penetrar entre 0.003 a 1 mm, dependiendo del voltaje utilizado y del número atómico de los átomos de la muestra.⁷⁵

ANÁLISIS QUÍMICO POR RAYOS X CARACTERÍSTICOS (EDS)

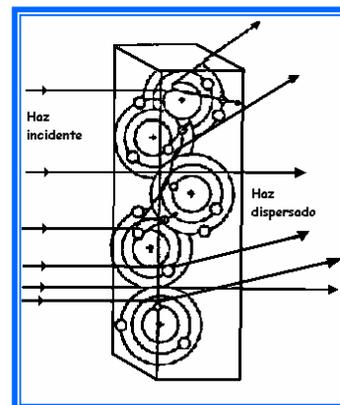
La microsonda electrónica mide la intensidad y la longitud de onda de la radiación característica de un elemento, al ser excitado por un haz de electrones. En su diseño se usan dos tipos de espectrómetros: el espectrómetro de dispersión de energía (EDS) y el espectrómetro de dispersión de longitud de onda (WDS). En el espectrómetro dispersor de energía se usa un detector de estado sólido colocado cerca de la muestra, el cual, al momento de su interacción con los rayos X, produce un pulso eléctrico que es proporcional a la energía del rayo X característico. Conociendo el número de pulsos y su intensidad, puede medirse la energía de los rayos X y la composición química de la muestra.⁷⁴

El espectrómetro EDS es fácilmente adaptable a cualquier microscopio, ya sea de barrido o de transmisión. El microscopio electrónico equipado con un detector de rayos X del tipo EDS, por lo tanto, nos permite detectar desde el Oxígeno ($Z = 8$) hasta elementos pesados.⁷⁴

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

El microscopio electrónico de transmisión (TEM) consiste fundamentalmente de un cañón de electrones (su fuente de iluminación), lentes condensadoras, lente objetiva, lentes intermedias y lente proyectora. El cañón electrónico es la única lente electrostática que tiene el microscopio electrónico; las demás son lentes electromagnéticas. La imagen producida por la lente objetiva sirve como objeto para la lente intermedia, la cual producirá una segunda imagen, que a la vez es amplificada por la lente proyectora para producir la imagen final en la pantalla o en una placa fotográfica.⁷⁴

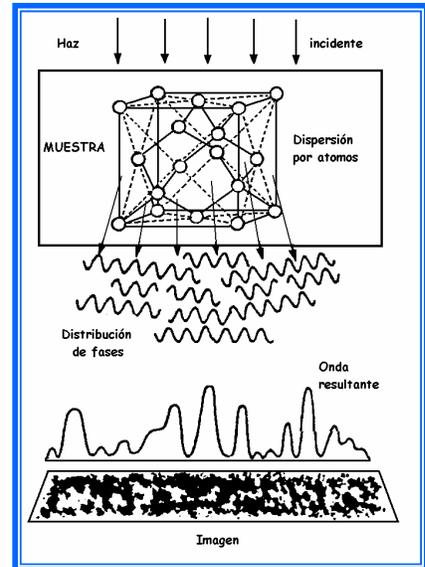
En el proceso de dispersión elástica los electrones interactúan con los campos de potencial electrostático (inferior a 100 eV) de los núcleos de los átomos que constituyen el material. La energía de los electrones incidentes cambian poco, pero el momento sí se modifica, produciendo una distribución espacial de intensidad



Esquema 17. Dispersión elástica en el MET.⁷³

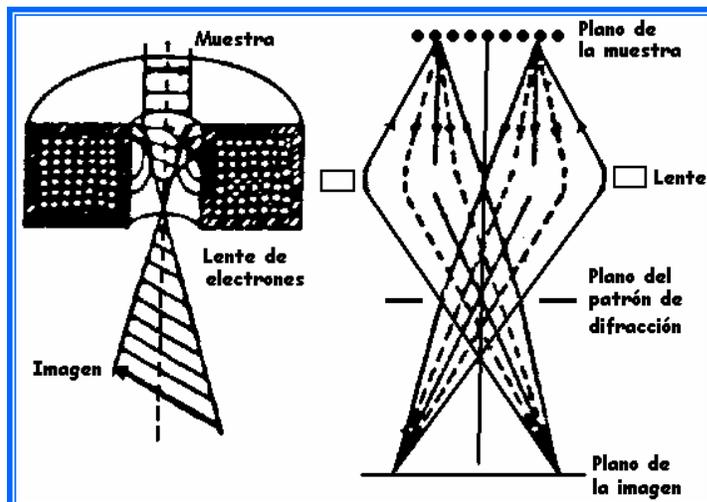
luminosa emergente; el objeto dispersor sufre un pequeño rechazo en la dirección opuesta al movimiento de los electrones, tal que la energía cedida de los electrones incidentes al objeto dispersor es despreciable (< 50 eV). (Esquema 17)

Cuando se bombardea con electrones un material delgado, los electrones que salen continuarán su viaje, con una distribución de valores de fase, relativos a la fase de la onda incidente; esta distribución dependerá de los valores del campo de potencial, o sus variaciones, a través del cual pasó cada electrón. Muchos de estos electrones habrán experimentado un cambio pequeño en la amplitud de onda asociada a ellos por procesos de dispersión tanto inelástica como elástica. La distribución angular de intensidad de electrones salientes está dada por la distribución de intensidad luminosa, cuyas variaciones producen el contraste; ésta formará una distribución de zonas claras y oscuras. El esquema muestra el proceso de formación de imágenes en un microscopio electrónico de transmisión (Esquema 18).



Esquema 18. Proceso de formación de imágenes en un microscopio electrónico de transmisión.⁷³

Cuando el haz que llega a la muestra se va a “fragmentar” en m haces que llevan información específica; de manera que una región del espacio se llena con “puntos” de intensidad electrónica, distribuidos regular y periódicamente en el espacio tridimensional. Una sección transversal de esta región del espacio es lo que conocemos como patrón de difracción de electrones (Esquema 19). El haz transmitido es la parte del haz que no sufre desviación con respecto al haz incidente y no contabiliza en términos de condiciones de Bragg.



Esquema 19. Esquema de la formación de patrón de difracción e imagen de una muestra cristalina.⁷³

El patrón de difracción completo se considera como una imagen de la red y se localiza en el espacio recíproco, el cual es formado por coordenadas construidas con los valores recíprocos de las distancias en el espacio real, es decir, es una medida de la frecuencia espacial dada por $1/\chi$, donde χ es la distancia a la que están colocados los centros dispersores distribuidos sobre planos imaginarios.⁷⁵

MICROESPECTROSCOPIA INFRARROJA TRANSFORMADA DE FOURIER

La microscopía infrarroja transformada de Fourier identifica componentes moleculares.⁷⁶ La técnica de microespectroscopía nos permite el análisis de regiones de $20 \times 20 \mu\text{m}^2$, de secciones de tejido, obteniendo el espectro de absorbancia infrarroja.²⁰

La FTIR ha sido usada para analizar la presencia de moléculas características de las apatitas biológicas. El estudio de microespectroscopía infrarroja de la dentina puede ser un paso interesante antes de la investigación de la ultraestructura ósea. La dentina y el hueso están formados sólo por colágena tipo I como la matriz orgánica, y tienen la misma apatita biológica como fracción mineral. Sin embargo, la dentina es más apropiada para el estudio de la maduración mineral y orgánica debido a que diferencia del hueso, no está sujeta a los tejidos adyacentes.⁷⁷

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Se analizaron 30 premolares sanos de pacientes de ambos sexos, cuyas edades fluctuaron entre los 15 y 21 años, remitidos para su extracción de la Clínica de Ortodoncia de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Odontología, UNAM. Los pacientes fueron anestesiados localmente con xilocaína con epinefrina al 2 % y se procedió a la extracción de los premolares.

Los premolares se fijaron en formalina buffer al 10 % (solución neutra amortiguada de formalina) por un tiempo mínimo de 72 horas.

PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO

En el Departamento de Materia Condensada del Instituto de Física, UNAM, se realizaron cortes con disco de diamante en la superficie de los dientes, siguiendo el eje longitudinal del mismo, y se fracturaron a la mitad (Figura 10), para obtener las muestras; éstas se recubrieron con carbono y se colocaron las muestras durante cinco horas en una evaporadora de carbono marca Ernest F. Fullam, Inc. Latham,[®] NY. Posteriormente se analizaron con microscopio electrónico de barrido de alta resolución Jeol 5 200[®] con resolución de 3 nm.



Figura 10. Muestra para MEB

También se analizaron las muestras por EDS para determinar sus componentes.

PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE TRANSMISIÓN

Las muestras fueron embebidas en acrílico autopolimerizable y colocadas en un portamuestras. Se realizaron cortes con disco de diamante en una cortadora Jean Wirtz[®]. Se obtuvieron de esta forma cortes de dentina coronal humana sana de 3 mm × 3 mm × 0.7 mm. Posteriormente utilizando una plancha térmica Thermolyne[®], lijas

finas (de 2 000 a 4 000), paños y una pulidora Buehler,[®] modelo Minimer, las muestras se pulieron a espejo.

Se les hizo una concavidad a las muestras utilizando el Dimpler. Las muestras se colocaron en el portamuestras y se alojaron en la platina, se les agregó pasta de diamante. La velocidad de giro de los discos y el avance vertical de la muestra fueron controlados por un microprocesador, lo cual permitió lograr una concavidad con espesor del orden de 5 μm en el centro de las muestras. Para manejar las muestras se colocaron en una rejilla de cobre de 3 mm, con un orificio en el centro de tal manera de que el orificio funcionó como una ventana en la zona más delgada de las muestras.

Las muestras se procesaron en Ion Mill. Este método involucra el desprendimiento de los átomos de la superficie por el bombardeo de iones de alta energía. Se realiza en vacío y los iones que generalmente se usan son Ar^+ con energías de 5 a 10 KeV. En este proceso el haz iónico es enfocado al área de ataque, dirigido en forma rasante, hasta obtener una microperforación. El procedimiento típico es de 24 horas de trabajo efectivo del haz iónico. (Figura 11)



Figura 11. Ion Mill

A continuación las muestras fueron cubiertas con una película delgada conductora (carbón), para evitar que se cargaran y deflectaran el haz electrónico. Se realizó el análisis con microscopio electrónico de transmisión. (Figura 12)

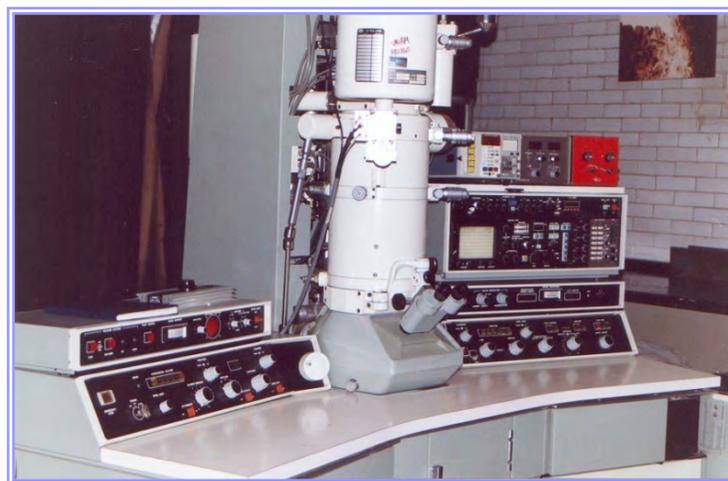


Figura 12. Microscopio electrónico de transmisión

PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS INFRARROJO

Las muestras fueron embebidas en acrílico autopolimerizable y colocadas en un portamuestras. Se realizaron cortes transversales con disco de diamante y se obtuvieron de esta forma cortes de dentina coronal humana sana mostrando los tejidos en forma concéntrica, se realizaron cortes con fresas de diamante y se separaron muestras de esmalte, esmalte y dentina de la unión amelodentinaria, dentina y dentina cercana a pulpa. Las muestras se pulverizaron y tamizaron por separado, se cubrieron con bromuro y se procedió a su análisis con microespectroscopio infrarrojo.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

Análisis por Microscopia Electrónica de Barrido

Los odontoblastos se encuentran alineados en número de cuatro a seis, en empalizada y muestran un intrincado sistema de unión a través de finas ramificaciones por medio de las cuales se unen y comunican entre sí, al mismo tiempo que se fijan al estroma pulpar (Figura 13). Este sistema de unión les permite recibir todos los estímulos provenientes del exterior.

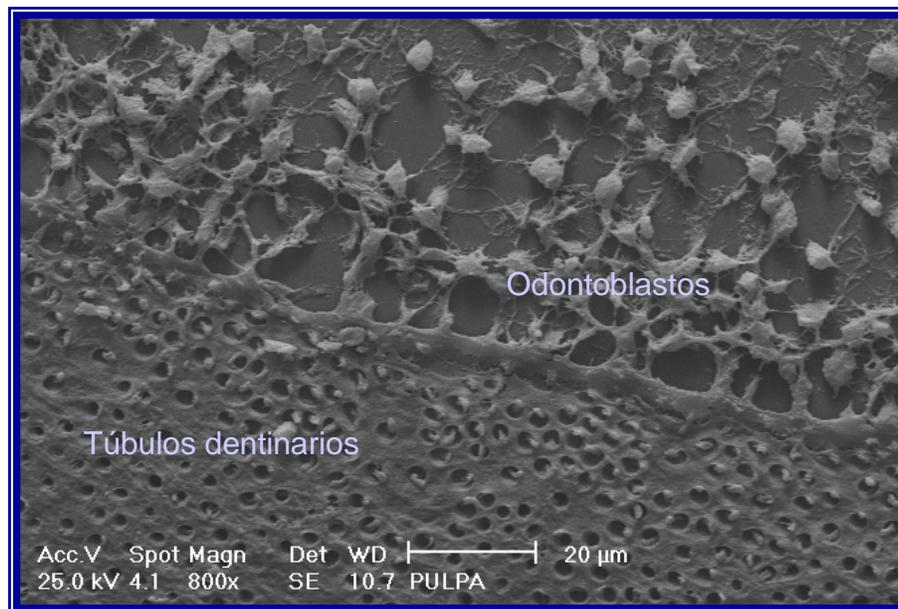


Figura 13. Túbulos dentinarios y odontoblastos. MEB 800 X

En la pre dentina, en zonas donde los cortes se vuelven transversales, se aprecian numerosos túbulos dentinarios con diferentes diámetros y tamaños; la mayoría de ellos muestra las prolongaciones odontoblásticas en su interior. Los túbulos más cercanos al tejido pulpar tienen un diámetro mayor que oscila entre 5 y 8 µm. La dentina peritubular se observa muy definida y como un halo electrodenso principalmente en los cortes transversales donde se observan los túbulos redondeados.

El MEB reveló que los túbulos dentinarios contienen un complejo sistema de ramificaciones internas de diferente diámetro por medio de las cuales se unen y

comunican entre sí. Estas estructuras parecen ser su soporte interno. Se hacen más finas hacia la unión amelodentinaria y al llegar al esmalte desaparecen casi por completo. (Figuras 14 a 17).

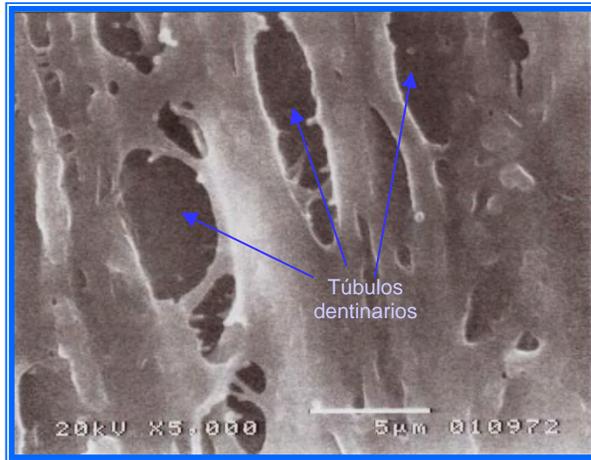


Figura 14. Corte longitudinal de dentina humana que muestra túbulos dentinarios y su sistema de ramificaciones internas. MEB 5000 ×

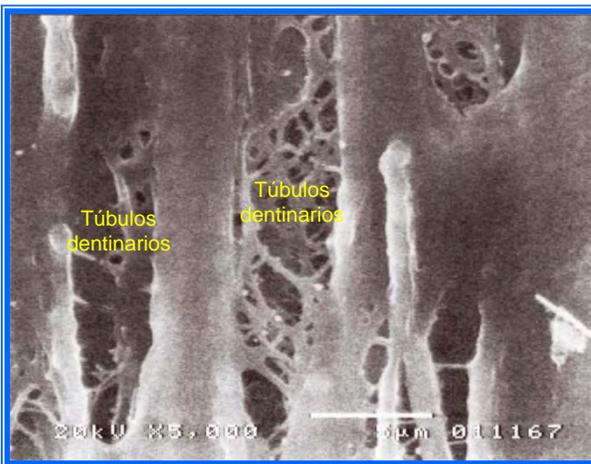


Figura 15. Túbulos dentinarios, sus ramificaciones parecen ser el soporte interno. MEB 5000 ×



Figura 16. Procesos odontoblásticos y ramificaciones. MEB 2000 ×

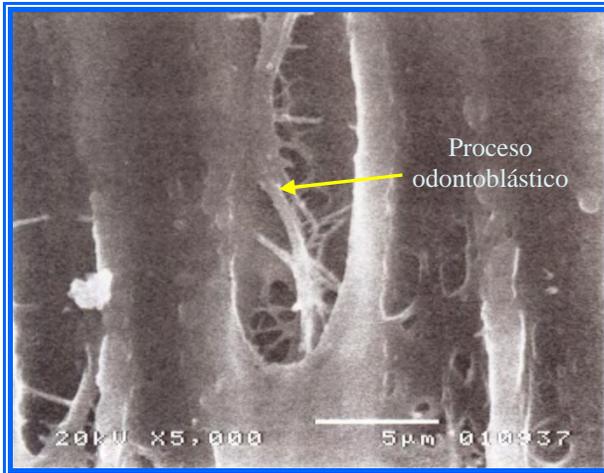


Figura 17. Proceso odontoblástico y ramificaciones. MEB 5000 ×

Los procesos odontoblásticos presentan uniones entre ellos que atraviesan los túbulos dentinarios. (Figuras 18 a 20)

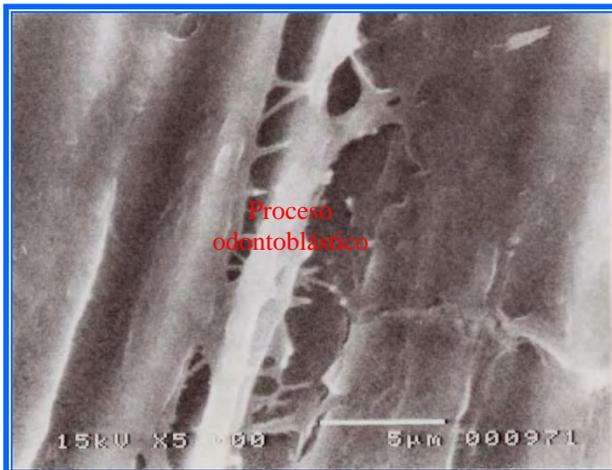


Figura 18. Corte longitudinal de túbulo dentinario mostrando el proceso odontoblástico y sus ramificaciones. MEB 5000 ×

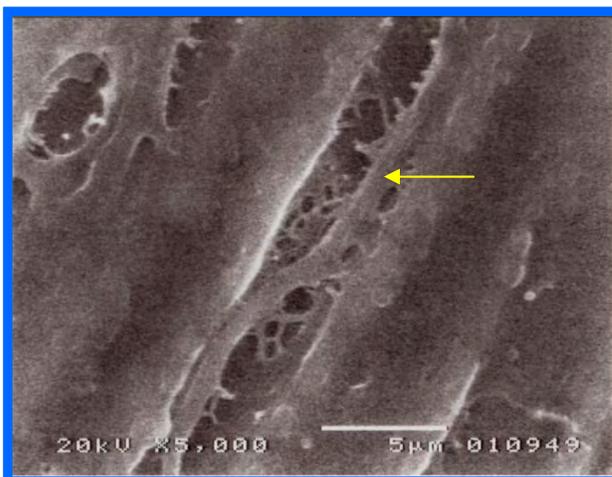


Figura 19. Túbulo dentinario y proceso odontoblástico en su interior. MEB 5000 ×



Figura 20. Proceso odontoblástico con múltiples ramificaciones (flechas amarillas). MEB 5000 ×

Las ramificaciones aumentan conforme nos acercamos a predentina (Figura 21)

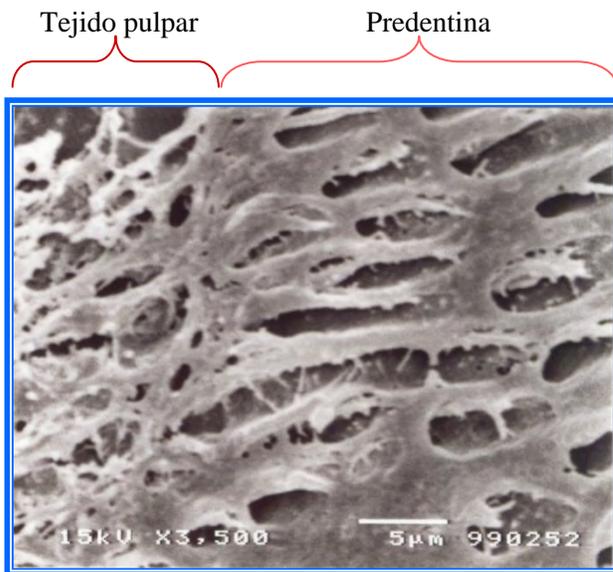
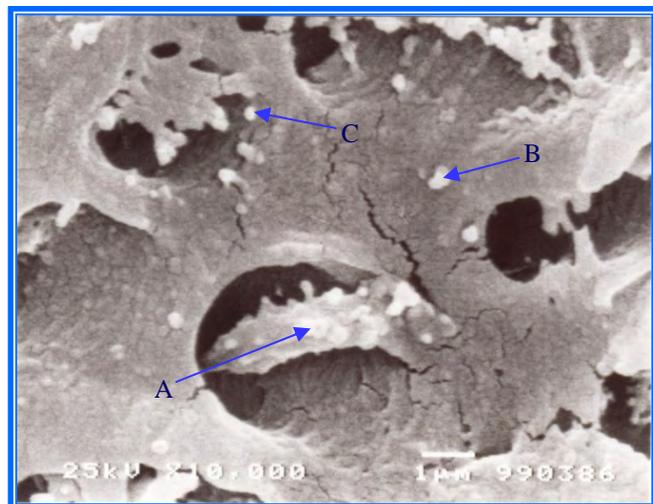


Figura 21. Procesos odontoblásticos con múltiples ramificaciones, predentina en corte transversal en la unión con el tejido pulpar. MEB 3500 ×

En cortes transversales de predentina, se observan las prolongaciones odontoblásticas cargadas de microvesículas que van siendo depositadas en el piso de los túbulos. Cuando estas vesículas coalescen y a medida de que se les depositan sales comienza la mineralización. (Figura 22)

Figura 22. Proceso odontoblástico cargado de microvesículas (A), microvesículas en espacios intertubulares (B) y en la pared del túbulo dentinario (C). MEB 10000 ×



Análisis por Microanálisis por espectrometría de dispersión de energía de rayos X característicos. EDS.

Mediante análisis EDS se determinaron las concentraciones de Ca y P en predentina, dentina y unión amelodentinaria, encontrándose que la concentración de P decrece ligeramente en dentina y unión amelodentinaria, en tanto que la concentración de Ca aumenta en dichas zonas. La mayor concentración de Ca se observó en la zona media de la dentina madura o mineralizada; por el contrario, la concentración de P es ligeramente mayor en predentina, donde es menor la concentración de Ca (Cuadros 7, 8 y 9).

Cuadro 7. Análisis EDS de predentina

Predentina				
Element	k-ratio (calc.)	ZAF	Atom %	Wt %
P – K	0.2966	1.134	39.60	33.63
Ca – K	0.6124	1.084	60.40	66.37
Total			100.00	100.00

Cuadro 8. Análisis EDS de dentina de la zona intermedia

Dentina				
Element	k-ratio (calc.)	ZAF	Atom %	Wt %
P – K	0.2604	1.141	35.36	29.71
Ca – K	0.6546	1.074	64.64	70.29
Total			100.00	100.00

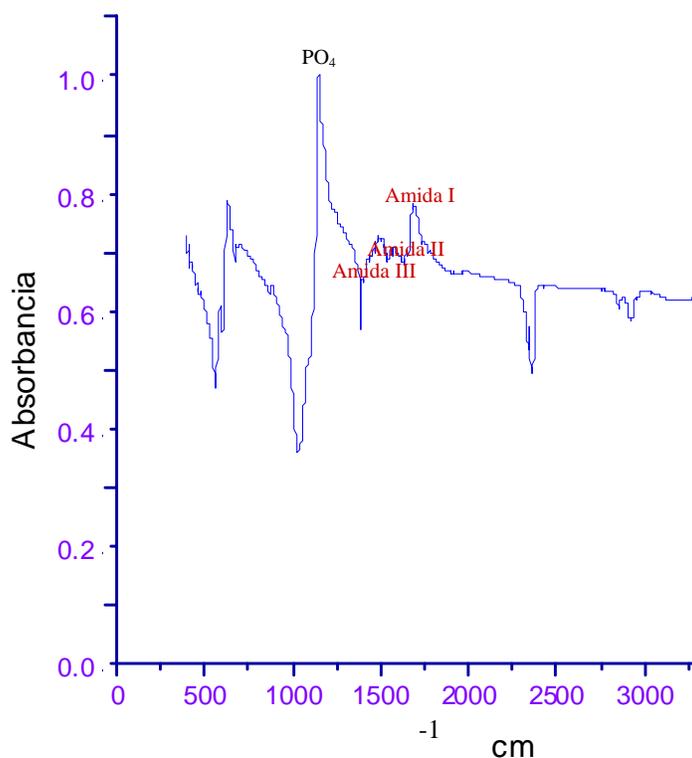
Cuadro 9. Análisis EDS de dentina de la unión amelodentinaria

Dentina de unión amelodentinaria				
Element	k-ratio (calc.)	ZAF	Atom %	Wt %
P – K	0.2769	1.138	37.31	31.50
Ca – K	0.6352	1.078	62.69	68.50
Total			100.00	100.00

Este estudio demuestra que el calcio aumenta de la predentina hacia la dentina, la dentina del manto (en la unión amelodentinaria) tiene una concentración ligeramente menor de calcio.

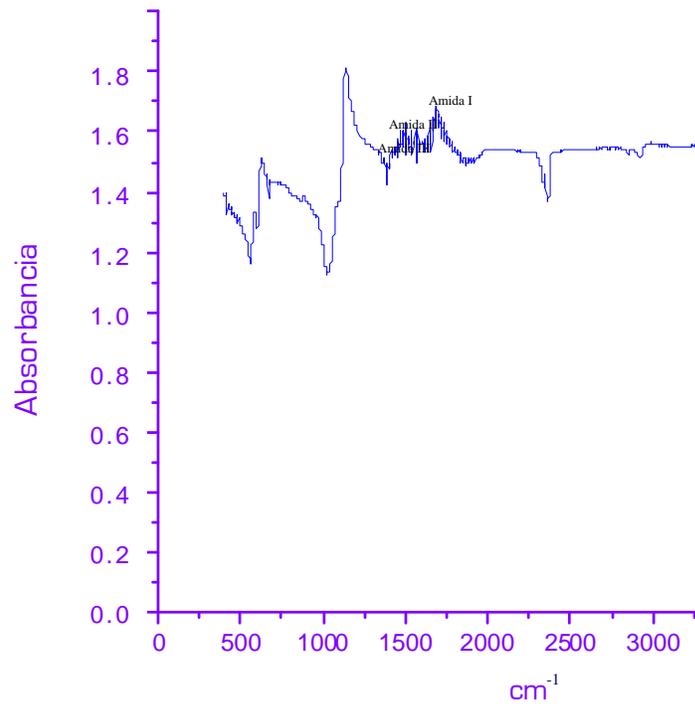
Análisis por Microespectrometría de infrarrojos transformada de Fourier. FTIRM

Con el análisis por FTIRM se observaron las bandas de amida I y III típicas de colágena. El análisis de la dentina cercana a pulpa muestra que la amida I vibra entre 1670 y 1680 cm^{-1} , la amida II entre 1560 y 1580 cm^{-1} , y la amida III muestra bandas con frecuencias de 1420 cm^{-1} ; las bandas de amida son difíciles de determinar a medida que nos acercamos a la unión amelodentinaria y al esmalte (gráficas 1, 2, 3 y 4). El pico del dominio $\nu_3\text{PO}_4$ se observó en 1200 cm^{-1} en las muestras de dentina y casi desaparecen en las muestras de esmalte de unión amelodentinaria y del esmalte. El dominio $\nu_3\text{CO}_3$ reportado por otros autores entre 1550 y 1400 cm^{-1} fue difícil de determinar por la presencia de amida III en 1420 cm^{-1} (gráfica 1). Las vibraciones encontradas son difíciles de determinar en la unión amelodentinaria y desaparecen en las muestras de esmalte, los cristales cercanos al frente de mineralización muestran niveles altos de HPO_4 y niveles bajos de CO_3 . Se observaron picos en 2400 cm^{-1} característicos de los grupos fosfato hidrogenados. Las vibraciones entre 2700 y 3100 cm^{-1} corresponden al grupo C – H.

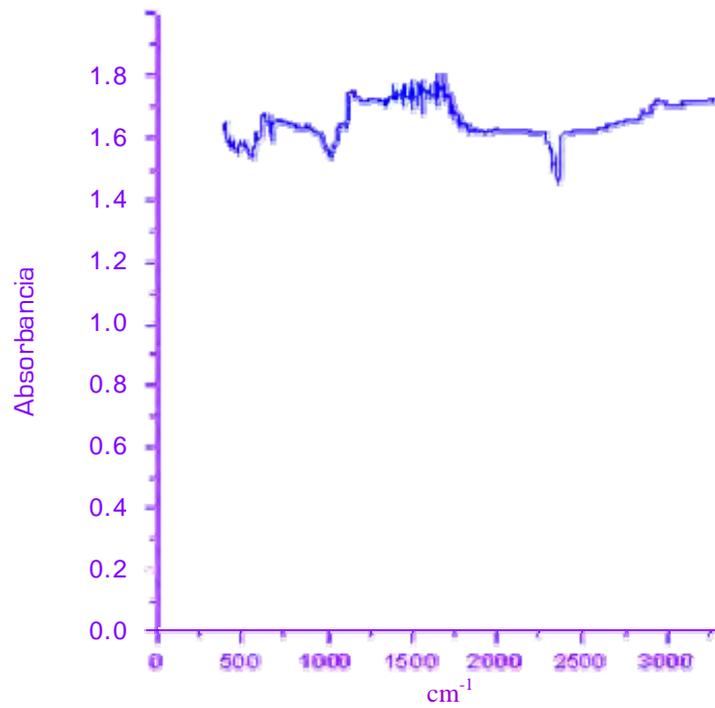


Gráfica 1. Análisis por FTIRM de dentina

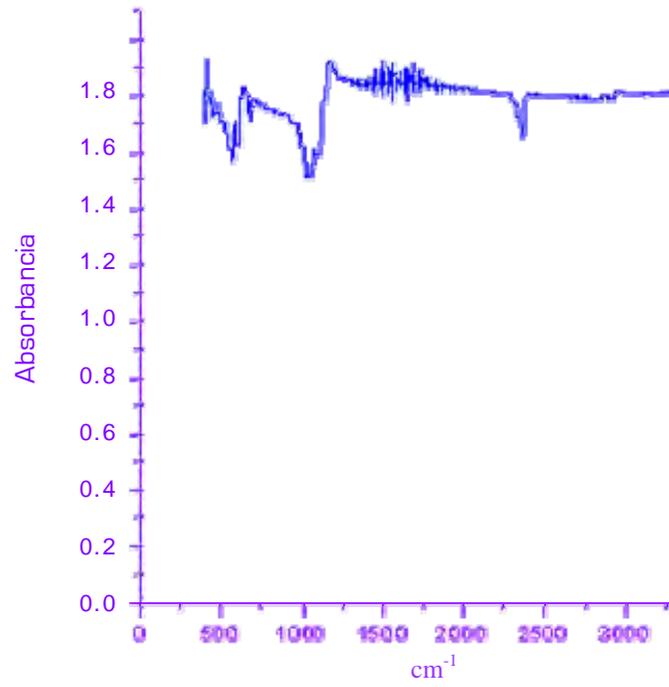
Gráfica 2. Análisis por FTIRM de dentina de la unión amelodentinaria



Gráfica 3. Análisis por FTIRM del esmalte en unión amelodentinaria



Gráfica 4. Análisis por FTIRM del esmalte



Análisis por Microscopía Electrónica de Transmisión.

Con el MET la dentina peritubular se observa muy definida y como un halo electrodenso, sin embargo el límite con la dentina intertubular es ligeramente irregular, (Figura 23).

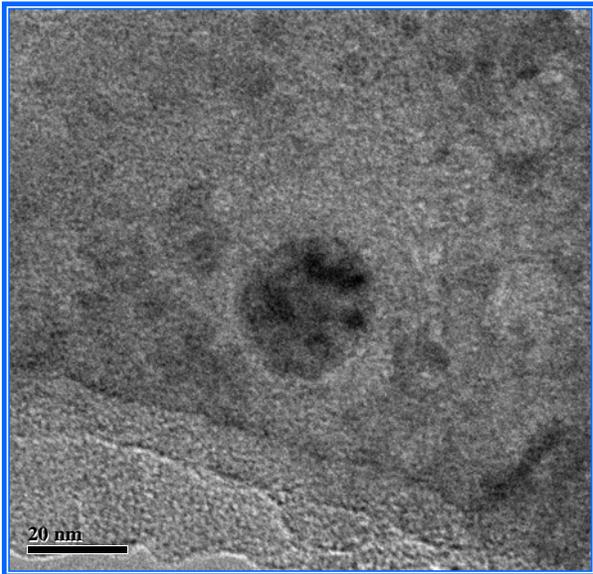


Figura 23. Corte transversal de un túbulo dentinario y dentina peritubular. MET

El MET revela que las fibras colágenas cortadas transversalmente muestran una formación de microfibrillas. (Figuras 24 y 25). En las imágenes de campo oscuro se observa claramente la presencia de cristalitas de HA embebidos en la matriz de colágena. Estos cristales tienen tamaño nanométrico.

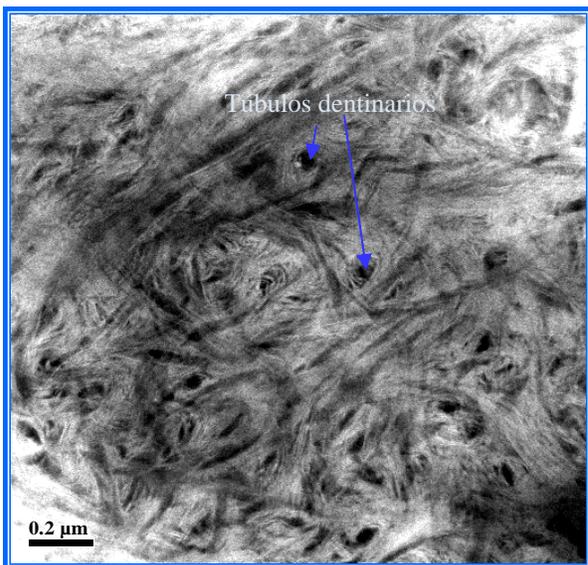


Figura 24. Imagen en campo claro de las fibras de colágena. MET

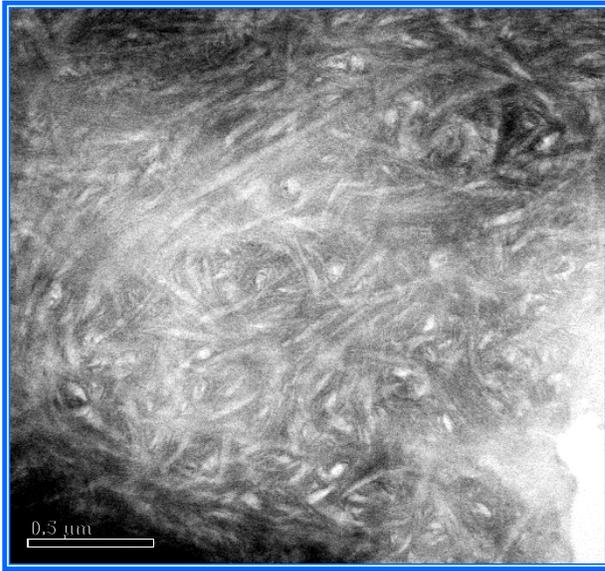


Figura 25. Imagen en campo oscuro de las fibras de colágena. MET

También se observan cristales hacia el interior de los túbulos (Figura 26).

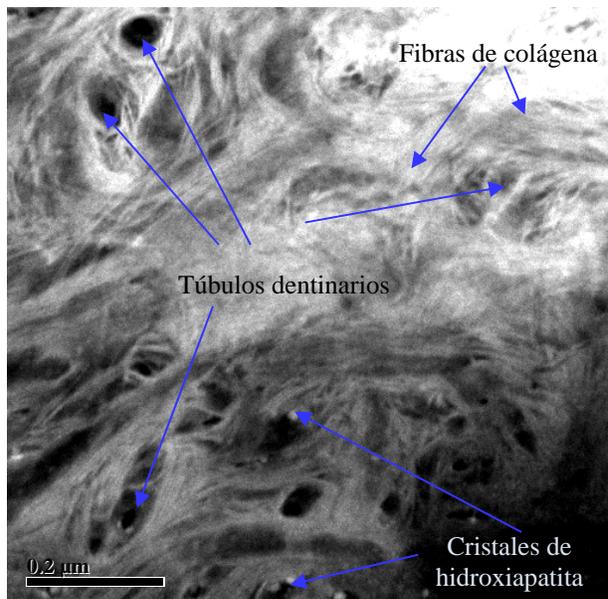


Figura 26. Imagen de campo claro de las fibras de colágena y cristales de hidroxiapatita. MET

La dentina es un biomaterial de carácter policristalino con un comportamiento de composito: se observaron cristales nanométricos de hidroxiapatita dentro de una matriz de material orgánico. En zonas más calcificadas se observan los cristales de hidroxiapatita en la superficie de las fibras colágenas (Figuras 27 y 28).

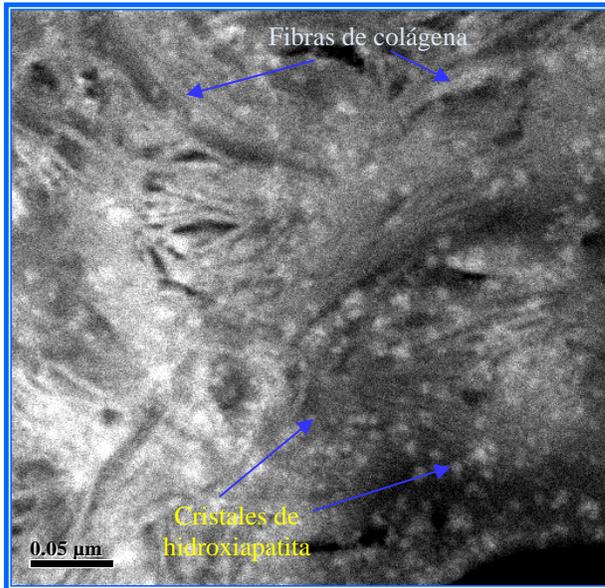


Figura 27. Imagen de campo oscuro de las fibras de colágena y cristales de hidroxiapatita.MET

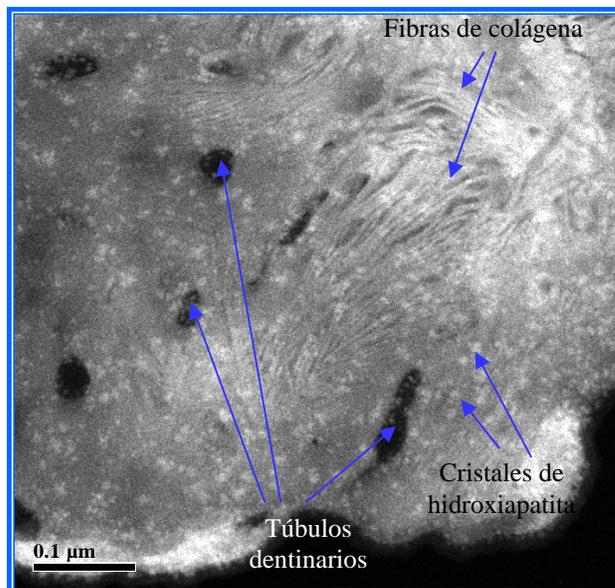


Figura 28. Imagen de campo oscuro de las fibras colágenas y cristales de hidroxiapatita. MET

El arreglo de estos granos es diferente o al menos hay una mayor densidad de cristales en las zonas que rodean los túbulos dentinarios (dentina peritubular) que en las zonas intermedias (dentina intertubular) (Figuras 29 y 30).

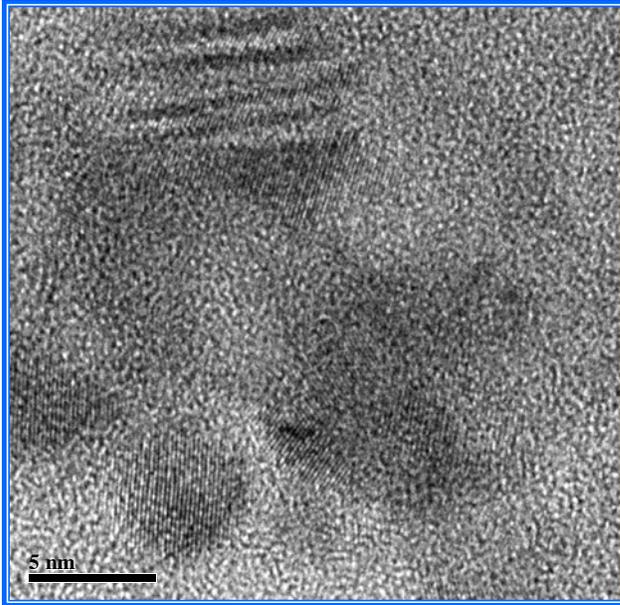


Figura 29. Imagen en campo claro y de alta amplificación de los cristales de hidroxiapatita. MET

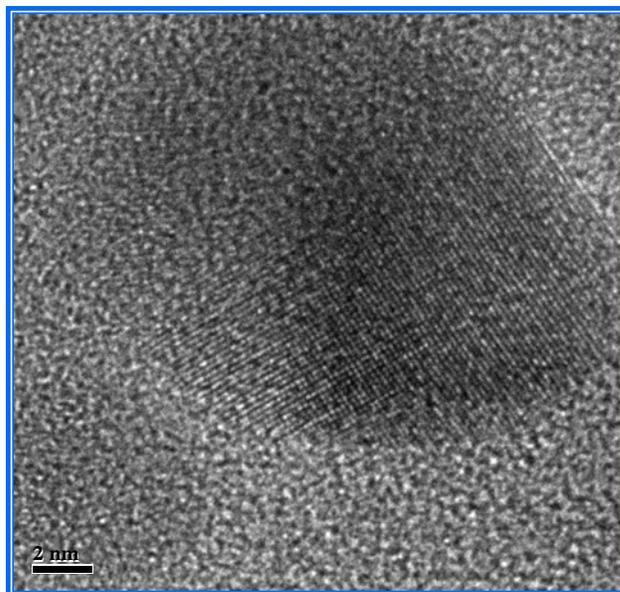


Figura 30. Imagen en campo claro y de alta amplificación de los cristales de hidroxiapatita. MET

Las imágenes de MET de alta resolución de los cristales de HA muestran claramente que éstos tienen una celda unitaria de forma hexagonal, con una dimensión mayor en el eje [100], el cual es de 8.17 Å, el eje [002] es de 3.44 Å y el eje [101] de 5.26 Å, tal y como se muestran en las figuras 31 y 32. Lo cual concuerda con la tarjeta de rayos X, ya establecida (Cuadro 10).

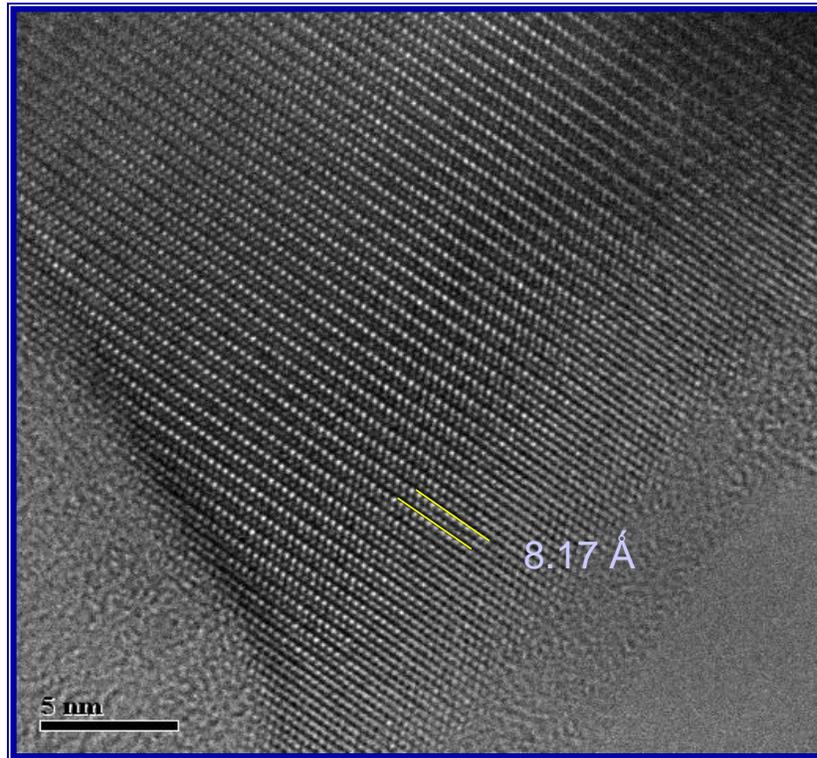


Figura 31. Imagen de MET de alta resolución de los cristales de hidroxiapatita en dentina humana. Eje [100]

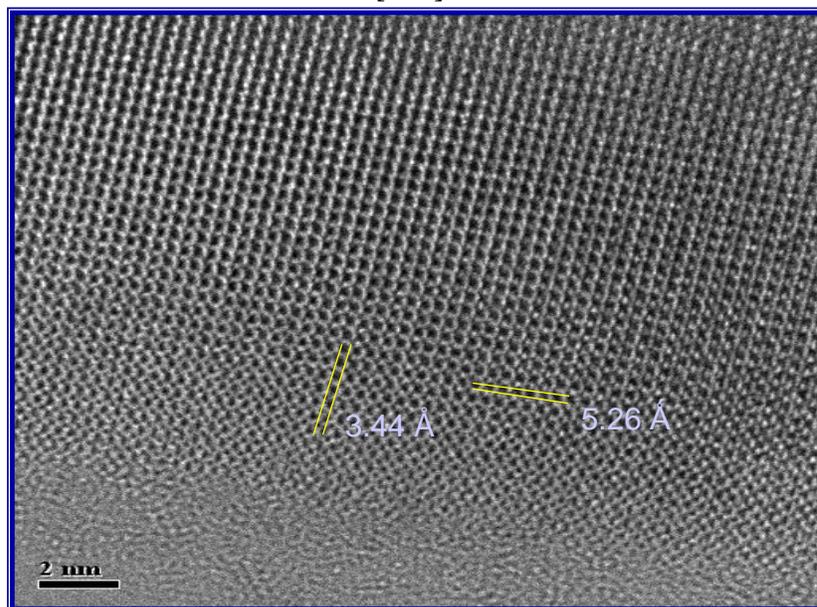


Figura 32. Imagen de MET de alta resolución de los cristales de hidroxiapatita en dentina humana, mostrando los ejes [002] y [101]

4	2.81	2.78	2.72	8.17	Ca ₃ (PO ₄) ₃ (OH) Hidróxido de calcio ortofosfato			½[Ca(OH) ₂ •3Ca ₃ (PO ₄) ₂] (Hidroxiapatita)		
I/I ₁	100	60	60	11	d Å	I/I	hkl	d Å	hkl	d Å
Rad. CuKα ₁ Cut off 30	a 1.5405 I/I ₁	Filter Photometer		Dia. 114.6 mm (Guinier camera)	8.17	12	100	2.040	2	400
Ref. de Wolff, Tech. Phys. Dienst, Delft, Holland					5.26	6	101	2.000	6	203
Sys. Hexagonal S.G. P6 ₃ /m (176)					4.72	4	110	1.943	30	222
9.418	b	Co 6.894	A	C 0.7309	4.07	10	200	1.890	16	312
					3.88	10	111	1.871	6	320
					3.51	2	201	1.841	40	213
					3.44	40	002	1.806	20	321
					3.17	12	102	1.780	12	410
					3.08	18	210	1.754	16	402,303
					2.814	100	211	1.722	20	004,411
					2.778	60	112	1.684	4	104
					2.720	60	300	1.644	10	322,223
					2.631	25	302	1.611	8	313
					2.528	6	301	1.587	4	501,204
					2.296	8	212	1.542	6	420
					2.262	20	310	1.530	6	331
					2.228	2	221	1.503	10	214,421
					2.148	10	311	1.474	12	502
					2.134	4	302	1.465	4	510
					2.065	8	113	Más líneas adicionales		
I/I ₁ are peak values from a pattern which shows slight broadening prism reflections.										
Sample obtained following the procedure indicated by Hodge C.S., Ind Eng Chem Anal. Ed. 10 156 (1938)										

Cuadro 10. Tarjeta de rayos X. La hidroxiapatita pertenece al grupo espacial 176. Powder Diffraction File of the International Tables for X-ray crystallography. International Union of Crystallography. The Kynoch Press, Birmingham, England, 1952.⁷⁸

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

Mjör y Heyeraas^{2,79} han sugerido que los túbulos dentinarios presentan ramificaciones laterales o túbulos secundarios de 1 μm de diámetro, en ángulo recto y se conectan con los túbulos vecinos. Nuestro estudio usando MEB revela que los odontoblastos se encuentran alineados en número de cuatro a seis y presentan un intrincado sistema de unión a través de finas ramificaciones. Las ramificaciones internas son muy complejas y de diferentes diámetros, adelgazándose hacia la unión con el esmalte: los túbulos dentinarios contienen un sistema de ramificaciones internas por medio de las cuales se unen y comunican entre sí. Esto concuerda con los resultados de Torres,²⁴ quien reporta que los túbulos que se encuentran adyacentes al tejido pulpar son muy anchos y muestran un intrincado sistema reticular de haces, a través de los cuales se comunican y unen entre sí.

El MEB reveló uniones entre los odontoblastos, y también encontramos que los procesos odontoblásticos presentan uniones que atraviesan los túbulos dentinarios y comunican un proceso con otro. Berkovitz, Holland y Moxham mencionan que se observan complejos de unión entre odontoblastos adyacentes, las uniones adherentes se dan por la relación posicional entre células. Las uniones comunicantes (gap) permiten la comunicación entre odontoblastos de impulsos eléctricos y pequeñas moléculas y la actividad sincronizada de unos con otros.⁶ Asimismo el equipo de Ishikawa reporta uniones gap entre los odontoblastos y otras células pulpares.⁷ En nuestro estudio encontramos que las fibras de unión entre odontoblastos son más abundantes conforme nos acercamos a la zona de predentina.

En nuestro estudio el MET revela que la dentina es un tejido de carácter policristalino con un comportamiento como composito: se observaron cristales nanométricos de hidroxiapatita dentro de una matriz de material orgánico. Höhling y Arnold⁷¹ señalan que la mineralización parece iniciar en la superficie colágena y avanzar dentro del interior de la fibra colágena. La sustancia mineral por volumen es hasta de un factor de 2 más alto que el interior de la fibra colágena. Höhling y Arnold encontraron que los cristales primarios consisten de hilos compuestos de islas de apatita de tamaño nanométrico, los cuales están inicialmente orientados cristalográficamente a lo largo del eje de manera bipolar⁷¹: las nanopartículas de la dentina están orientadas en el eje [100], el cual es de 8.17 Å, el eje [002] es de 3.44 Å y el eje [101] de 5.26 Å lo cual concuerda con nuestros estudios (Imágenes 29 y 30).

La dentina contiene moléculas de $(\text{CO}_3)^{2-}$ en una concentración de carbonato en el orden del 5 – 6 % de su peso. La creación en moléculas orgánicas de entidades polares, tales como grupos carboxilo e hidroxilo, puede incrementar fuertemente la nucleación de apatitas en estos polímeros orgánicos, así como la adhesión de los mismos. El equipo de Pasteris ha sugerido que hay una imposición bioquímica del estado específico de cristalinidad e hidroxilación, incorporando $(\text{CO}_3)^{2-}$ y limitando el grupo (OH). En este orden de ideas, la hidroxiapatita de la dentina es considerada una hidroxiapatita carbonatada.⁸⁰

Weiner refiere que la dentina peritubular que rodea los túbulos de la dentina coronal, realiza la dureza de este material comparada con la zona justo bajo el esmalte, que no contiene dentina peritubular y es considerablemente suave. Estas diferencias influyen directamente en la manera en la cual el diente responde a las presiones durante la masticación.⁸¹ Refiriéndose a varios autores menciona que el contenido mineral entre la dentina peritubular y la intertubular es del 9 al 40%.²⁶ En concordancia con este autor nuestros hallazgos muestran que la dentina peritubular se observa muy definida y como un halo electrodenso principalmente en los cortes transversales donde se observan los túbulos redondeados.

Con este orden de ideas Weiner⁸¹ menciona que el examen de las líneas de fractura de la dentina coronal en el MEB en general muestra límites distintivos entre la ITD y la PTD cuando son examinados en un plano perpendicular al eje del tubo. Los ejes de las fibras colágenas mineralizadas están localizadas en este plano, y la línea de fractura claramente se propaga alrededor de estos haces. Secciones pulidas de dentina coronal vistas en un plano perpendicular a los ejes de los túbulos, claramente muestran que la interfase no es definida, pero la densidad del mineral decrece gradualmente de la PTD a la ITD.⁸¹ El límite es ligeramente irregular.^{26,81} Lo cual concuerda con nuestras observaciones.

Por el contrario, Magne y colaboradores, utilizando el FTIRM (microespectroscopio infrarrojo transformado de Fourier), encontraron que los cristales cercanos al frente de mineralización son muy inmaduros, mostrando niveles altos de HPO_4 y niveles bajos de CO_3 . Los iones de carbonato fueron encontrados en ambientes muy lábiles, probablemente en la superficie del cristal. La remoción de algunos iones de HPO_4 durante la maduración está ligada a un incremento en el contenido de carbonato total; los iones de CO_3 se pierden en ambientes lábiles, probablemente después de su incorporación en regiones más organizadas de la malla durante el proceso de maduración, es decir, son desplazados desde regiones pobremente cristalinas, particularmente en la superficie del cristal, o incorporados en la malla apatítica. La proporción $\text{CO}_3 - \text{PO}_4$ se incrementa desde el frente de mineralización hasta la unión

con dentina primaria, en distancias, a menudo, $> 100 \mu\text{m}$. Además en algunas regiones de dentina del manto, el contenido de carbonato es siempre mayor que en otras partes en la dentina secundaria. Por el contrario el contenido de PO_4 disminuye con el proceso de maduración;^{20,65} lo cual concuerda con nuestros resultados: la concentración de P decrece ligeramente en dentina y unión amelodentinaria, en tanto que la concentración de Ca aumenta en dichas zonas. Magne relaciona el incremento del contenido carbonato total asociado con una mayor cristalinidad mineral, en este contexto, con la maduración, los cristales evolucionan hacia un orden mayor.^{20,65} Nosotros hicimos el análisis con EDS encontrando que la concentración de P es de 0.2966 en predentina y desciende a 0.2604 en dentina y por el contrario, la concentración de Ca es de 0.6124 en predentina y de 0.6546 en dentina, lo cual concuerda con los estudios de Magne, los cristales inmaduros tienen niveles altos de P y bajos de Ca, y los cristales más mineralizados tienen un mayor nivel de Ca y bajo nivel de P.

Magne *et al.*, también analizaron dentina primaria del caballo con microespectroscopía infrarroja transformada de Fourier, y encontraron en el espectro que la característica más aparente es el rango del área mineral/proteína ($\nu_1\nu_3\text{PO}_4$ /amida I), el cual es significativamente mayor para la dentina peritubular (7.45 ± 1.30) que para la dentina intertubular (3.25 ± 0.21). También son notables algunas diferencias en las bandas de proteínas; en el espectro de la dentina peritubular, la gran anchura de la banda de amida A (debido a la banda de agua OH sobrepuesta en esta región) y el rango alto de amida A/amida I indica que la dentina peritubular contiene más agua con respecto a la proteína contenida.²⁰

Magne y colaboradores investigaron el dominio $\nu_3\text{PO}_4$ para obtener datos de la cristalinidad mineral. El dominio $\nu_3\text{PO}_4$ tiene dos componentes principales: el 1020 cm^{-1} es representativo de apatitas no estequiométricas con persistencia de vacíos, HPO_4 , y/o CO_3 y el 1030 cm^{-1} de apatitas más cristalinas. En las regiones más maduras cerca de la unión amelodentinaria, el espectro de la dentina intertubular, se caracteriza por un pico más intenso en los 1100 cm^{-1} que en 1090 y 1112 cm^{-1} ; por el contrario en las regiones peritubulares, los 1090 cm^{-1} son siempre más intensos que 1112 y 1100 cm^{-1} .²⁰ En otro contexto, el equipo de Miller estableció, usando microespectroscopía infrarroja, que en la región $\nu_t, \nu_3\text{PO}_4^{3-}$ ($950 - 1200 \text{ cm}^{-1}$) del hueso, la apatita en el mineral óseo recientemente depositado es considerablemente no-estequiométrica.⁸² Nosotros encontramos en la dentina humana que el pico del dominio $\nu_3\text{PO}_4$ en 1200 cm^{-1} en las muestras de dentina y de dentina de unión amelodentinaria y casi desaparece en las muestras de esmalte de unión amelodentinaria y del esmalte. Las vibraciones encontradas van desapareciendo en la unión amelodentinaria y desaparecen en las muestras de esmalte.

Las bandas de amida son representativas de la conformación de las proteínas.^{20,65} El presente estudio demuestra la presencia de bandas de amida I, II y III, las cuales van desapareciendo a medida que se acerca al esmalte, lo cual demuestra la paulatina maduración. Magne y colaboradores mencionan que las frecuencias de las bandas de amida A y B son casi idénticas en los espectros de dentina intertubular y dentina peritubular; debido a que la colágena exhibe una absorción infrarroja muy poco común comparada con otras proteínas, la dentina peritubular puede tener una cantidad significativa de colágena; además las bandas de amida I y III en el espectro de la dentina peritubular son típicas de colágena.²⁰ Las pequeñas variaciones observadas en la banda de amida I en el espectro de la dentina peritubular indican que la colágena es más hidratada. Magne, al analizar dentina de caballo encontró que las vibraciones de la amida I cambian de 1659 a 1656 cm^{-1} y que se ensancha en frecuencias bajas; el dominio de la amida III muestra bandas con frecuencias de 1280, 1240 y 1204 cm^{-1} ; los dos picos de alta frecuencia del dominio de amida III (1340 y 1315 cm^{-1}) mostraron la misma intensidad relativa que el espectro de dentina intertubular. Sin embargo, cuando analizamos la dentina humana encontramos que la amida I vibra entre 1670 a 1680 cm^{-1} , la amida II entre 1560 y 1580 cm^{-1} , la amida III vibra en 1420 cm^{-1} .

CONCLUSIONES

1. Los túbulos dentinarios presentan un intrincado sistema de ramificaciones internas de diferente diámetro por medio del cual se comunican entre sí.
2. Los odontoblastos presentan un intrincado sistema de unión a través de finas fibras y fibrillas que los unen entre sí el cual permite que los estímulos externos lleguen directamente a ellos y al tejido pulpar.
3. Las prolongaciones odontoblásticas están cargadas de microvesículas, las cuales se van depositando en el piso de los túbulos, estas vesículas son consideradas la base de la calcificación.
4. La concentración de calcio aumenta de la predentina hacia la dentina, la dentina del manto (en la unión amelodentinaria) tiene una concentración ligeramente menor de calcio.
5. Las bandas de amida I y III representativas de la conformación de la colágena van desapareciendo a medida que nos acercamos a la unión amelodentinaria y al esmalte, lo cual se considera que refleja la paulatina maduración.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Linde A. Dentin and Dentinogenesis. Volume I. CRC Press, Boca Ratón, FL., 1984
2. Hargreaves KM, Goodis HE. Seltzer and Bender's Dental Pulp. Quintess Publ Co 2002 China
3. Gómez de Ferraris ME. Histología y embriología bucodental. 2º Ed Med Panam 2002.
4. LeGeros RZ. Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine, Karger, Basel, 1991
5. Tseng YH, Tsai YL, Tsai TWT, Lin CP, Huang SH, Mou CY, Chan JCC. Double-quantum altered heteronuclear correlation spectroscopy under magic angle spinning. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance* 2007;31:55–61
6. Berkovitz BKB, Holland GR, Moxham BJ. Color Atlas & Textbook of Oral Anatomy; Histology and Embriology. 2a Ed. Mosby Year Book, London 1992
7. Ishikawa T, Takahashi K, Maeda T, Suda H, Shimono M, Inoue T. Dentin/Pulp Complex. Proceedings of the International Conference on Dentin/Pulp Complex 2001. Quintessence Publ.
8. Nanci A. Ten Cate's Oral Histology Development, structure and function. 6ª Ed Mosby 2003 USA
9. Balooch G, Marshall GW, Marshall SJ, Warren OL, Asif SAS, Balooch M. Evaluation of a new modulus mapping technique to investigate microstructural features of human teeth. *Journal of Biomechanics* 2004;37:1223–32
10. Kinney JH, Marshall SJ, Marshall GW. The mechanical properties of human dentin: A critical review and re-evaluation of the dental literature. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003;14(1):13-29
11. Katz JL, Kinney JH, Paulette Spencer, Wang Y, Fricke B, Walker MP, Friis EA. Elastic anisotropy of bone and dentitional tissues. *J Mater Sci: Mater Med* 2006;16:803– 806
12. Bo Huo. An inhomogeneous and anisotropic constitutive model of human dentin. *Journal of Biomechanics* 2005;38:587–94
13. Maev RG, Denisova IA, Maeva EY, Denissova AA. New data on histology and physico-mechanical properties of human tooth tissue obtained with acoustic microscopy. *Ultrasound in Med. & Biol* 2002;28(1):131–6
14. Senawongse P, Otsuki M, Tagami J, Mjör I. Age-related changes in hardness and modulus of elasticity of dentine. *Arch Oral Biol* 2006;51:457–63
15. Tesch W, Eidelman N, Roschger P, Goldenberg F, Klaushofer K, Fratz P. Graded microstructure and mechanical properties of human crown dentin. *Calcif Tissue Int* 2001;69:147–57

16. Kinney JH, Habelitz S, Marshall SJ, Marshall GW. The importance of intrafibrillar mineralization of collagen on the mechanical properties of dentin. *J Dent Res* 2003; 82(12):957-61
17. Habelitz S, Rodriguez BJ, Marshall SJ, Marshall GW, Kalinin SV, Gruverman A. Peritubular Dentin Lacks Piezoelectricity. *J Dent Res*; Sep 2007; 86(9): 908-11
18. Kinney JH, Gladden JR, Marshall GW, Marshall SJ, So JH, Maynar JD. Resonant ultrasound spectroscopy measurements of the elastic constants of human dentin. *Journal of Biomechanics* 2004;37:437-41
19. Avery JK. *Essentials of Oral Histology and Embriology*. Mosby Year Book 1992 USA
20. Magne D, Guicheux J, Weiss P, Pilet P, Daculsi G. Fourier transform infrared microspectroscopic investigation of the organic and mineral constituents of peritubular dentin: a horse study. *Calcif Tissue Int* 2002;71:179-85
21. Kinney JH, Pople JA, Marshall GW, Marshall SJ. Collagen orientation and crystallite size in human dentin: a small angle x-ray scattering study. *Calcif Tissue Int* 2001;69:31-37
22. Elbaum R, Tal E, Perets AI, Oron D, Ziskind D, Silberberg Y, Wagner HD. Dentin micro-architecture using harmonic generation microscopy. *J Dent* 2007;35:150-5
23. Schroeder HE. *Oral Structural Biology*. Ge Thi Ver Sturt 1991
24. Torres CDL, Garcés OMM, Reyes-Gasga J. Estudio de la ultraestructura de la dentina humana por microscopía óptica y electrónica. Tesis de Grado de Maestría en Odontología. DEPeI, FO, UNAM, México, D.F. 2001
25. Garant PR. *Oral Cells and Tissues*. Quint Pub Co 2003 Canada
26. Schroeder L, Frank RM. High resolution transmission electron microscopy of adult human peritubular dentine. *Cell Tissue Res* 1985;242:449-51
27. Mandler M, Neubüser A. FGF signaling is necessary for the specification of the odontogenic mesenchyme. *Develop Biol* 2001;240:548-59
28. Jernvall J, Thesleff I. Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. *Mech Dev* 2000;92:19-29
29. Cobourne MT. The genetic control of early odontogenesis. *BJO* 1999:21-8
30. Peters H. Teeth, where and how to make them. *TIG* February 1999;15(2):59-65
31. D'Souza RN, Aberg T, Gaikward J, Cavender A, Owen M, Karsenty G, Thesleff I. *Cbfa1* is required for epithelial-mesenchymal interactions regulating tooth development in mice. *Develop* 1999;126:2911-20
32. Wurgaft R, Montenegro MA. *Atlas de histología y embriología bucodentaria*. Abaco, Santiago-Chile, 1998
33. Davis WL. *Histología y embriología bucal*. Interamericana-McGraw-Hill 1988
34. Borea G. Embryologie de l'organe denture et de la denture (organogenèse et morphogenèse) *Enciclop Méd Chir* 1974;10
35. Sharpe PT. Neural Crest and Tooth Morphogenesis. *Adv Dent Res* 2001;15:4-7

36. Bendall AJ, Abate-Shen C. Roles for Msx and Dlx homeoproteins in vertebrate development. *Gene* 2000;247:17–31
37. Thesleff I. Homeobox genes and growth factors in regulation of craniofacial and tooth morphogenesis. *Acta Odontol Scand* 1995;53:129-34
38. Matalova E, Fleischmannova J, Sharpe PT, Tucker AS. Tooth Agenesis: from Molecular Genetics to Molecular Dentistry. *J Dent Res* 2008;87(7):617-623
39. Jowett AK, Vainio S, Ferguson MWJ, Sharpe PT, Thesleff I. Epithelial-mesenchymal interactions are required for msx1 and msx2 gene expression in the developing murine molar tooth. *Develop* 1993;117:461-70
40. Kettunen PI, Laurikkala J, Itäranta P, Vainio S, Itoh N, Thesleff I. Associations of FGF-3 and FGF-10 with signaling networks regulating tooth morphogenesis. *Develop Dyn* 2000;219:322-32
41. Ito Y, Zhao J, Mogharei A, Shuler CF, Weinstein M, Deng C, Chai Y. Antagonistic effects of smad2 versus smad7 are sensitive to their expression level during tooth development. *J Biol Chem* 2001;276(47):44163-72
42. Nagai N, Nakano K, Sado Y, Naito I, Gunduz M, Tsujigiwa H, Nagatsuka H, Ninomiya Y, Siar CH. Localization of type IV collagen α 1 to α 6 chains in basement membrane during mouse molar germ development. *Int J Dev Biol* 2001;45:827-31
43. Bègue-Kirn C, Smith AJ, Ruch JV, Wozney JM, Purchio A, Hartmann D, Lesot H. Effects of dentin proteins, transforming growth factor β 1 (TGF β 1) and bone morphogenetic protein 2 (BMP2) on the differentiation of odontoblast in vitro. *Int J Dev Biol* 1992;36(4):491-503
44. Thesleff I, Keranen S, Jernvall J. Enamel Knots as Signaling Centers Linking Tooth Morphogenesis and Odontoblast Differentiation. *Adv Dent Res* 2001;15: 14-18
45. Qin Ch, Huang B, Wygant JN, McIntyre BW, McDonald CH, Cook RG, Butler WT. A chondroitin sulfate chain attached to the bone dentin matrix protein 1 NH2-terminal fragment. *The J Biol Chem* 2006;281(12):8034-40
46. Lu Y, Ye L, Yu S, Zhang S, Xie Y, McKee MD, Li YC, Kong J, Eick JD, Dallas SL, Feng JQ. Rescue of odontogenesis in Dmp1-deficient mice by targeted re-expression of DMP1 reveals roles for DMP1 in early odontogenesis and dentin apposition in vivo. *Develop Biol* 2007;303:191–201
47. Hao J, Zou B, Narayanan K, George A. Differential expression patterns of the dentin matrix proteins during mineralized tissue formation. *Bone* 2004;34:921– 932
48. Lu Y, Zhang S, Xie Y, Pi Y, Feng JQ. Differential regulation of dentin matrix protein 1 expression during odontogenesis. *Cel Tis Organs* 2005;181:241–7
49. Mazzoni A, Mannella F, Tay FR, Tonti GAM, Papa S, Mazzotti G, Di Leonarda R, Pshley DH, Breschi L. Zymographic analysis and characterization of MMP-2 and -9 forms in human sound dentin. *J Dent Res* 2007;86(5):436-440

50. Gotliv BA, Robach JS, Veis A. The composition and structure of bovine peritubular dentin: Mapping by time of flight secondary ion mass spectroscopy. *J Struct Biol* 2006;156:320–333
51. Machado MEL, Souza AS, Araújo VC. Histological evaluation of the osteoinduction capability of human dentine. *Int Endod J* 2006;39:855–9
52. He G, Gajjeraman S, Schultz D, Cookson D, Qin Ch, Butler WT, Hao J, George A. Spatially and temporally controlled biomineralization is facilitated by interaction between self-assembled dentin matrix protein 1 and calcium phosphate nuclei in solution. *Biochemistry* 2005;44:16140-8
53. Mann S. Molecular tectonics in biomineralization and biomimetic materials chemistry, *Nature* 1993;365:499-505
54. Boskey AL. The role of extracellular matrix components in dentin mineralization. *Cri Rev Oral Biol Med* 1991;2:369-87
55. Linde A, Goldberg M. Dentinogenesis. *Cri Rev Oral Biol Med* 1993;4:679-728
56. Kim JW, Simmer JP. Hereditary dentin defects. *J Dent Res* 2007;86(5):392-99
57. Song Y, Wang Ch, Peng B, Ye X, Zhao G, Fan M, Fu Q, Bian Z. Phenotypes and genotypes in 2 DGI families with different DSPP mutations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;102:360-74
58. Huq NL, Cross KJ, Ung M, Reynolds EC. A review of protein structure and gene organisation for proteins associated with mineralised tissue and calcium phosphate stabilisation encoded on human chromosome 4. *Arch Oral Biol* 2005;50:599–609
59. Holappa H, Nieminen P, Tolva L, Lukinmaa PL, Alaluusua S. Splicing site mutations in dentin sialophosphoprotein causing dentinogenesis imperfecta type II. *Eur J Oral Sci* 2006;114: 381–4
60. Houllé P, Voegel JC, Schultz P, Steuer P, Cuisinier FJG. High resolution electron microscopy: structure and growth mechanisms of human dentin crystals. *J Dent Res* 1997;76(4):895-904
61. Goldberg M, Septier D, Oldberg A, Young MF, Ameye LG. Fibromodulin-deficient mice display impaired collagen fibrillogenesis in predentin as well as altered dentin mineralization and enamel formation. *J Histochem Cytochem* 2006;54(5):525-37
62. Huang B, Sun Y, Maciejewska I, Qin D, Peng T, McIntyre B, Wygant J, Butler WT, Qin C. Distribution of SIBLING proteins in the organic and inorganic phases of rat dentin and bone. *Eur J Oral Sci* 2008;116:104–12
63. Hwang YC, Hwang IN, Oh WM, Park JC, Lee DS, Son HH. Influence of TGF- β 1 on the expression of BSP, DSP, TGF- β 1 receptor I and Smad proteins during reparative dentinogenesis. *J Mol Hist* 2008;39:153–60

64. Wallwork ML, Kirkham J, Chen H, Chang SX, Robinson C, Smith DA, Clarkson BH. Binding of dentin noncollagenous matrix proteins to biological mineral crystals: an atomic force microscopy study. *Calcif Tissue Int* 2002;71:249-55
65. Magne D, Pilet P, Weiss P, Daculsi G. Fourier transform infrared microspectroscopic investigation of the maturation of nonstoichiometric apatites in mineralized tissues: a horse dentin study. *Bone* 2001;29(6):547-52
66. George A, Hao J. Role of phosphophoryn in dentin mineralization. *Cell Tissue Organs* 2005;181:232-240
67. Brown WE, Smith JP, Lehr JR, Frazier AW. Octacalcium phosphate and hydroxyapatite. *Nature* 1962;196:1048-55
68. Bodier-Houlle P, Steuer P, Voegel JP, Cuisinier JP. First experimental evidence for human dentin crystal formation involving conversion of octacalcium phosphate to hydroxyapatite. *Acta Cryst* 1998;54:1377-81
69. Arnold S, Plate U, Wiesmann HP, Stratmann U, Kohl H, Höhling HJ. Quantitative electron spectroscopic diffraction analyses of the crystal formation in dentine. *J Microsc* 1999;195:58-63.
70. Plate U, Arnold S, Reimer L, Höhling HJ, Boyde A. Investigation of the early mineralization on collagen in dentine of a rat incisors by quantitative electron spectroscopic diffraction (ESD) *Cell Tissue Res* 1994;278:543-7
71. Höhling HJ, Arnold S, Plate U, Stratmann U, Wiesmann HP. Analysis of a general principle of crystal nucleation, formation in the different hard tissues. *Adv Dent Res* 1997 Nov;11:462-6
72. Weiner S, Traub W. Organization of hydroxyapatite crystals within collagen fibrils. *FEBS Letters* 1986;206:262-6
73. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Biología Molecular de la célula*. 3ª Ed 1996, Ed Omega, Barcelona
74. Yacamán MJ, Reyes Gasga J. *Microscopía Electrónica Una visión del microcosmos*. 1º Ed, 1º reimpresión, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México. 1998
75. Huanosta-Tera A. El ABC de la formación de imágenes en un microscopio electrónico. *Rev Mex Fís* 2000;46:91-102
76. Rochow TG, Tucker PA. *Introduction to microscopy by means of light, electrons, X rays, or acoustics*. Plenum Press, 2º Ed, 1994, New York and London. Pp257 QH 205 2 R62 1994
77. Magne D, Weiss P, Bouler JM, Laboux O, Daculsi G. Study of the maturation of the organic (type I collagen) and mineral (nonstoichiometric apatite) constituents of a calcified tissue (dentin) as a function of location: a Fourier transform infrared microspectroscopic investigation. *JBMR* 2001;16:750-7
78. Tarjeta de rayos X. *Powder Diffraction File of the International Tables for X-ray crystallography*. Internat Uni Crystal. The Kynoch Press, Birmingham, England, 1952

79. Mjör IA, Heyeraas KJ. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 1: Normal structure and physiology. *Quint Int* 2001;32:427-46
80. Pasteris JD, Wopenka B, Freeman JJ, Rogers K, Valsami-Jones E, van der Houwen AM, Silva MJ. Lack of OH in nanocrystalline apatite as a function of degree of atomic order: implications for bone and biomaterials. *Biomaterials* 2004;25:229-38
81. Weiner S, Arthur Veis A, Beniash E, Arad T, Dillon JW, Sabsay B, Siddiqui F. Peritubular dentin formation: crystal organization and the macromolecular constituents in human teeth. *J Struct Biol* 1999;126:27-41
82. Miller LM, Vairavamurthy V, Chance MR, Mendelsohn R, Paschalis EP, Betts F, Boskey AL. In situ analysis of mineral content and crystallinity in bone using infrared micro-spectroscopy of the ν_4 PO_4^{3-} vibration. *Biochim Biophys Acta* 2001;1527:11-9