

01461 10
21.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y QUÍMICO DE LA LÍNEA OSCURA
DE LOS GRANOS DEL ESMALTE DENTAL HUMANO
POR MEDIO DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN ODONTOLOGÍA

Presenta
C.D. Laura Vargas Ulloa
Esther

TUTOR
Dr. José Reyes Gasga

1997

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y QUÍMICO DE LA LÍNEA OSCURA
DE LOS GRANOS DEL ESMALTE DENTAL HUMANO
POR MEDIO DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA**

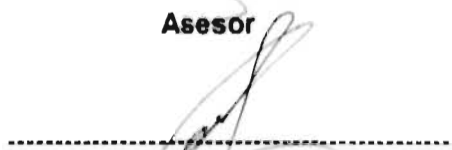
COMITÉ DE TESIS

Dr. Javier Portilla Robertson



Asesor

Dr. Manuel Saavedra García



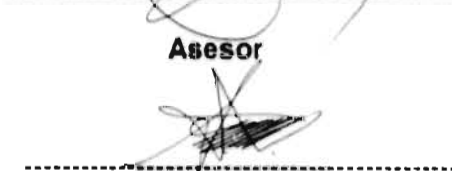
Asesor

Dr. Ramiro García García



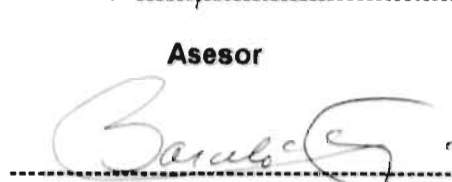
Asesor

M.C. Octavio Álvarez Fregoso



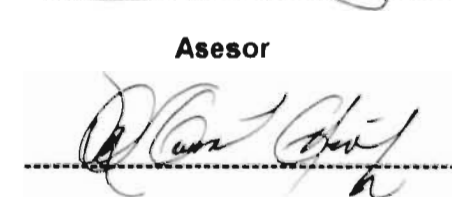
Asesor

Dr. Federico H. Barceló Santana



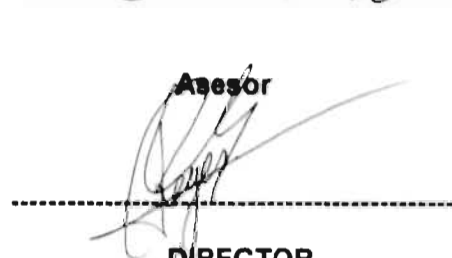
Asesor

Dra. Margarita García Garduño



Asesor

Dr. José Reyes Gasga



DIRECTOR

PRÓLOGO

Esta tesis es continuación de una serie de trabajos de investigación, que desde 1992 se han efectuado en la Facultad de Odontología en colaboración con el Instituto de Física

Los primeros trabajos que se efectuaron debido a problemas técnicos, no se les otorgó la relevancia que tendrían posteriormente, desde entonces, poco a poco se han ido perfeccionando las técnicas de la preparación de muestras dentales observadas mediante el microscopio electrónico, por lo que hoy es un poco más sencillo el procedimiento. En esta tesis analizaremos el esmalte dental humano, y en especial pondremos énfasis en la línea oscura presente en sus granos

De acuerdo con la norma oficial mexicana 013-SSA2, publicada en el Diario Oficial de la Federación el día 6 de enero de 1995, en un comunicado de la Organización Mundial de la Salud, México se encuentra entre los países de alto índice de frecuencia con enfermedades bucales, entre ellas, la caries dental afecta 90% de la población mexicana. Las caries son por su alta morbilidad enfermedades bucales que se encuentran entre las cinco de mayor demanda de atención en los servicios de salud del país. Por eso, es necesario comprender cómo están estructurados los dientes y cómo estos se afectan para poder unificar criterios y establecer sistemas de prevención bucal

En la introducción de este trabajo de tesis hablaremos de los antecedentes, el planteamiento del problema, la justificación, el objetivo general, los objetivos específicos y las hipótesis. Con el propósito de buscar información reciente respecto al desarrollo embriológico del esmalte, trataremos algunos puntos de interés sobre esto en el Capítulo 1. En el Capítulo 2, se presenta un panorama general de la línea oscura, tema principal de este trabajo, que no es una simple línea observada, pues están implicados conceptos de crecimiento y desarrollo de la estructura atómica. También comentaremos cómo es que el diente se encuentra afectado en cuanto a su disolución. Trataremos en el Capítulo 3 conceptos muy importantes, como la cristalografía del esmalte dental, la cual ha sido poco

difundida en el sector odontológico de México ; y nos referiremos a las operaciones simétricas e irregularidades de los arreglos atómicos comunes a todos los materiales. De la microscopía electrónica en la sección 3.2, nos avocaremos más al microscopio de transmisión, a microscopios de alto voltaje, a la imagen y difracción, etc., con el objetivo de dar una visión clara de los términos técnicos que se utilizarán en el resto de la tesis. En el Capítulo 4, parte importante es el método, pues la obtención de una buena muestra es básica para obtener el máximo de información ; por lo tanto, ahí describiremos el método experimental utilizado y las técnicas empleadas, así como el análisis químico de las muestras. En el capítulo 5 se darán a conocer los resultados obtenidos tanto de la estructura como de la composición química del esmalte ; discutiremos los resultados y al final presentaremos las conclusiones obtenidas.

ÍNDICE

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

	pág.
i. Antecedentes	1
ii. Planteamiento del problema	4
iii. Justificación	4
iv. Objetivo general	5
v. Objetivos específicos	5
vi. Hipótesis	5

CAPÍTULO I

FORMACIÓN DEL ESMALTE

I.1 Embriología del esmalte dental	6
I.2 Etapas de la formación dental	8
I.3 Inducción de la dentinogénesis	9
I.4 Amelogénesis	12
I.5 Los ameloblastos	13

CAPÍTULO II

ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN DEL ESMALTE

II.1 El esmalte dental humano	17
II.2 La línea oscura	21
II.3 Dilución del esmalte	29

CAPÍTULO III

CONCEPTOS IMPORTANTES

III.1 Cristales y átomos	
--------------------------	--

III.1.1	Cristalografía del esmalte dental	32
III.1.2	Operaciones simétricas	38
III.1.3	Irregularidades de los arreglos atómicos	46
III.2	Microscopía electrónica	49
III.2.1	Microscopios de alto voltaje	51
III.2.2	La imagen	51
III.2.3	Microscopio electrónico de transmisión (MET)	54
III.2.4	Microscopio electrónico de barrido (MEB)	56
III.2.5	Microscopio electrónico de alta resolución (MAR)	56
III.2.6	Tipo de señales generadas durante la interacción del haz con la muestra	58
III.2.7	La difracción	59
III.2.8	La ley de Bragg	61
III.2.9	Indexación de patrones de difracción	62
CAPÍTULO IV		
PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.		
IV.1	Origen de las muestras analizadas	63
IV.2	Preparación de muestras para MEB	63
IV.3	Preparación de muestras para MET	64
IV.4	Análisis químico de las muestras	64
CAPÍTULO V		
RESULTADOS		
V.1	Microscopía electrónica de barrido del esmalte dental	67
V.2	Microscopía electrónica de transmisión del esmalte dental	69
V.3	Análisis químico del esmalte dental	71
CAPÍTULO VI		
DISCUSIÓN		79
CONCLUSIONES		82

ÍNDICE DE FIGURAS

	pag.	
I a)	Vista general del esmalte dental	2
I b)	Superficie granular del esmalte	2
I 1 a)	Elevación del pliegue neural	6
I.2 a)	Etapas de la formación dental	8
I.3 a)	Gránulos secretorios del esmalte dental	10
I.3 b)	Unión amelo-dentinaria	11
I.5 a,b,c,d)	Tejido entrelazado del esmalte	14
I.5 e)	Prisma del esmalte dental	16
I.5 f)	Vainas del esmalte	16
II.1 a)	Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de la amelogenina	18
II.1 b)	Disposición de las franjas de la hidroxilapatita	19
II.2 a y b)	Dependencia focal del contraste de la línea oscura	22
II.2 c)	Líneas oscuras de un corte transversal de la muestra	23
II.2 d y e)	Líneas oscuras en la hidroxilapatita sintética	24
II.2 f)	Líneas oscuras por medio de la técnica de replica	24
II.2 g)	Modelo figurado del centro del grano	24
II.2 h,i)	La línea parece ser una fase distinta que el resto del grano	27
II.2 k,l)	Transformación del fosfato octacálcico (OCP) en hidroxilapatita	28
II.3 a)	Caries incipiente en la foseta del molar temporal	29
II.3 b)	Etapa inicial de disolución del esmalte	30
III. A)	Difracción del esmalte dental que denota un material policristalino	33
III. B)	Difracción de un material monocristalino	33
III. c)	Difractograma del esmalte dental	34
III.1 a)	Celda unitaria del esmalte dental	39
III.1 b)	Digitalización de la hidroxilapatita	40

III 1 c)	Sistema hexagonal de la hidroxilapatita	41
III 1 d)	Modelos de celdas unitarias : C.S, C C , C.C.C.	41
III 1e)	Anisotropía del esmalte dental	42
II 1 f)	Planos y direcciones en la estructura cristalina	42
III.1g)	Microradiografías del fosfato octacálcico	45
III 1h)	Difractograma de rayos X del OCP	46
III. 1 i)	Espectro de infrarrojo del fosfato octacálcico	46
III.1.3a)	Dislocación de borde	47
III. 3 b)	Dislocación de tornillo	47
III.2.1a)	Primer microscopio electrónico	49
III.2 1b)	Antiguas instalaciones de los microscopios electrónicos	51
III.2 a)	Esquema del microscopio electrónico de transmisión	53
III.2.2 a)	Formación del campo claro	54
III.2.2 b)	Formación del campo oscuro	54
III.2.4	Tipos de microscopios utilizados en el Instituto de Física U N A M	56
III.2.6	Tipos de señales que se generan con el haz electrónico	57
III.2.6 a)	Imagen de campo claro del esmalte dental	58
III.2.6 b)	Imagen de campo oscuro del esmalte dental	58
III.2.8a)	Interferencia constructiva del haz electrónico con la muestra	60
V.	Imagen del esmalte dental por medio del microscopio de tunelaje	67
V.1a,b,c,d)	Diferentes contrastes de la línea oscura	69
V.1 e)	Difracción del esmalte donde se corrobora la estructura hexagonal	69
V.2 a,b,c,d)	Digitalización de la línea oscura	71
V.3.1	Espectro de rayosX del esmalte dental humano (EDS)	72
V.3.2 a)	Mapeo químico del esmalte dental	74
V.3.3 a,b,c)	Espectros de los diferentes granos del esmalte dental	76
V.3.4	Espectros y concentraciones de las diferentes zonas de la línea oscura	77

**"El microscopio electrónico es un instrumento científico
que no debemos conformarnos sólo con ver a través de él,
sino entender lo que se ve, para extraer los secretos
de la naturaleza."**

J. Reyes Gasga

Microscopía Electrónica. una visión del microcosmos

RECONOCIMIENTOS

INSTITUTO DE FÍSICA

Dedico esta tesis a la memoria de la Quim. Elena Oliva, mujer excepcional, no sólo profesionalmente sino por su alto valor humano quien alentó e hizo posible la continuación de mis estudios.

Mi más sincero agradecimiento al Dr. en Fis. José Reyes Gasga, por ser pilar en el desarrollo de la microscopía mexicana, excelente director de esta tesis y mejor ser humano.

Un agradecimiento especial a Dr. en Fis. Ramiro García García, M.C. Octavio Álvarez Fregoso, M.C. José Chávez Carvayar por sus importantes observaciones y valiosos comentarios en la realización de esta tesis. De igual forma al Dr. Dwight Acosta Najarro por el apoyo para realizar este trabajo.

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

Agradezco al Dr. Javier Portilla Robertson, Dr. Manuel Saavedra Garcia, Dr. Federico.H. Barceló Santana, Dra. Margarita García Garduño, M.C. Arcelia Melendez y C.D. Guilberto Nidome Inzunsa por el apoyo brindado para la realización de esta tesis.

ASESORAMIENTO TECNICO

Del Instituto de Física agradezco especialmente al Fis. Roberto Hernández y al Tec. Pedro Mexia por el apoyo técnico, tiempo, experiencia y amistad durante la realización de la tesis.

Al Instituto de Biología que muy amablemente, por medio de Dra. Hilda Flores Olvera y la Biol. Sara Fuentes se obtuvieron algunas fotografías con el microscopio electrónico de barrido. Al Sr. Barrañon Cedillo por la corrección de estilo. También a la **asesoría técnica** del Instituto de Física: Fis. Luis Rendón, Ing. Samuel Tehuacanero, M.C. Jaquelin Cañetas, Ing. Cristina Zorrilla, Fis. Edilbero Hernández, Carlos Flores, Lamberto Quiterio, J. Angel Flores, Steve Morningthunder y J. Antonio Ramirez. También agradezco el apoyo otorgado de DEGAPAUNAM proyecto No.106295

RESUMEN

El esmalte dental humano $(Ca)_{10}(PO_2)_4(OH)_2$, es un mineral del grupo de los fosfatos de calcio, estructuralmente de la familia de las apatitas. Este biomaterial cerámico contiene diminutos granos cristalinos en cuyos centros se presentan las líneas oscuras que miden $1.5 \text{ nm} \pm 0.8$ de espesor cuando se les ha observado por microscopía electrónica de transmisión (MET). Estas líneas son radiolúcidas y representan una fase de contraste dependiente del foco: es negra en sobre-foco, blanca en defoco y desaparece en foco. La zona de alrededor de la línea oscura contiene fosfatos octocálcicos (OCP), $Ca^8 H^2 (PO_4)_6 5H_2O$, pertenece al sistema triclinico, con grupo espacial P1, cuyos parámetros de red son: $a = 1.987 \text{ nm}$, $b = .963 \text{ nm}$ y $c = .687 \text{ nm}$. La línea oscura es muy sensible a la radiación y a los ácidos orgánicos. No existe diferencia significativa en cuanto a las posiciones atómicas comparadas con el resto del grano; contiene mayor cantidad de calcio, lo que hace suponer que probablemente se trate de una fase previa al crecimiento dental.

Palabras clave: Línea oscura hidroxiapatita, estructura hidroxiapatita biológica, análisis químico hidroxiapatita, microscopía esmalte dental.

SUMMARY

Human tooth enamel $(\text{Ca})_{10}(\text{PO}_2)_4(\text{OH})_2$ is a mineral from the calcium phosphates group, and structurally belongs to the apatite family. A ceramic biomaterial, tooth enamel is constituted of diminutive crystalline grains with dark lines $1.5 \text{ nm} \pm 0.8$ in thickness running along the center, when we observed them by transmission electron microscope (TEM). These lines are radiolucent, representing a contrast phase which is dependant upon the focus: black in overfocus, white in defocus, and disappearing when in focus. The zone about the line consists of octocalcium phosphates (OCP), $\text{Ca}_8\text{H}^2(\text{PO}_4)_6\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ from the triclinic system, space group PI, having parameters $a = 1.987 \text{ nm}$, $b = 963 \text{ nm}$ and $c = 687 \text{ nm}$. The existence of the dark line is very sensitive to the radiation and organic acids, and showed no significant difference in atomic positions in comparison with the rest of the grain, but does have more calcium, which probably means that it is a precursor phase in the enamel tooth growth.

Key words : Central dark line (CDL), biological hydroxyapatite structure, chemical analysis hydroxyapatite, electron microscopy tooth enamel

INTRODUCCIÓN

El esmalte dental humano (EDH), que cubre a la dentina del diente, está constituido por fosfatos de calcio llamados estructuralmente hidroxilapatita. La estructura del EDH la podemos clasificar según el tamaño de sus componentes, de mayor a menor dimensión, en prismas, cristales, átomos, etc. Este arreglo estructural se da de la siguiente manera: el esmalte dental está formado, en dimensiones de micras, por prismas que corren de la superficie de la dentina hacia la superficie del esmalte; tiene aproximadamente un espesor de 2 mm. Estos prismas, a su vez, están formados por pequeños cristales, de dimensiones nanométricas. Los cristalitos, que en su mayor parte son hidroxilapatita, son arreglos ordenados periódicamente de átomos de Ca, O, P e H. Cuando se rompe el ordenamiento periódico del arreglo atómico, ya sea por planos atómicos extra o por la presencia de átomos más grandes o de otro elemento, se habla de defectos cristalinos en el esmalte. Estos defectos modifican sus propiedades.

Un defecto que se presenta en todos los cristales de los prismas del EDH es lo que se ha denominado línea oscura. Esta línea parece ser un defecto intrínseco de la estructura del esmalte; es decir, la presencia de este defecto en el esmalte es necesaria para que se den las propiedades que conocemos del esmalte. El trabajo desarrollado en esta tesis pretende estudiar con mayor profundidad este defecto para la mayor comprensión del papel que desempeña en el funcionamiento del esmalte. En esta sección comentaremos, los antecedentes, el planteamiento del problema, los objetivos, las hipótesis y la justificación de lo que hemos realizado.

i. ANTECEDENTES

Todo lo que **existe** está constituido por átomos : el acero, la madera, las resinas, las células, los dientes , y como parte de éstos, el esmalte no es la excepción .

El EDH es el tejido más denso y mineralizado del cuerpo humano,⁴ capaz de soportar fuerzas similares a las que soporta el acero liviano,⁴ sin embargo, es frágil y susceptible de diluirse con ácidos orgánicos.⁵ El EDH es un mineral constituido por 97% de material inorgánico ; 2% de agua que incluye lo adherido a los cristales "capa de hidratación" y menos de 1% de material orgánico : 58% de proteínas, 40% de lípidos y pequeñas cantidades de azúcares, iones de lactatos y citatos.⁶

Entre las proteínas principales se encuentran las fosfoproteínas, las enamelinas y las amelogeninas, las cuales se cree que participan en el proceso de mineralización.⁷ El EDH es un biomaterial compuesto por millones de diminutos granos cristalinos, como puede apreciarse en las figs. 1a, 1b.

Entiéndase por cristal el conjunto de átomos o moléculas distribuidos en secuencias repetidas.⁸ El esmalte es un material policristalino, cuyos cristales, en comparación con otros tejidos mesenquimatosos como hueso, dentina o cemento, son de forma elongada.⁹

Cada grano en su parte central exhibe una línea oscura. Esta línea es muy importante porque, además de presentar susceptibilidad a las diluciones con ácidos orgánicos, parece estar vinculada al inicio del crecimiento del cristal y al proceso carioso.¹⁰ El proceso carioso está íntimamente relacionado con el orden o desorden de los arreglos atómicos en los cristales de la hidroxilapatita.^{10,11}

Diversos estudios han demostrado que el EDH tiene buena correspondencia con la hidroxilapatita.^{12,13,14,15,16,17} El EDH es una hidroxilapatita impura porque acepta átomos en su celda unitaria; la hidroxilapatita pura no existe en el organismo humano.¹⁸ Como comparación, el acero, entre más defectos tiene, más duro se torna; en el caso del esmalte, se sabe que tiene gran número de defectos estructurales, sobre todo al inicio del crecimiento de los cristales.¹⁹

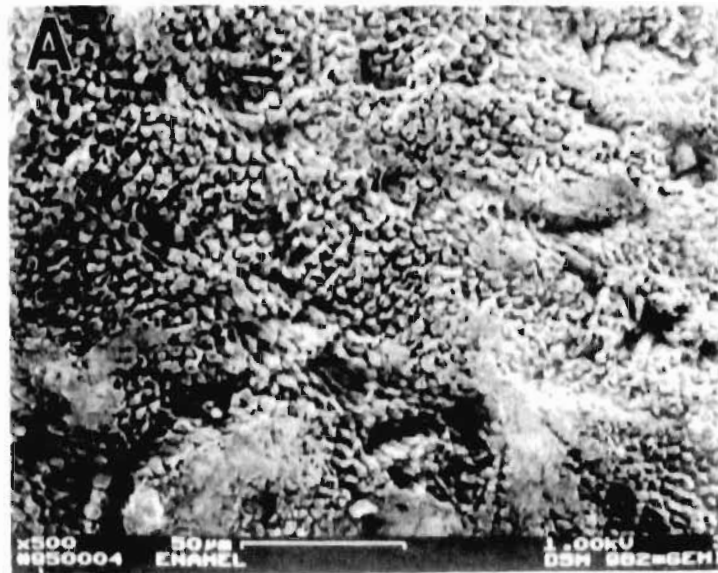


Figura 1 A) MEB. Vista general del esmalte dental humano.



Figura 1 B) MEB. La superficie del esmalte está constituido por una masa granular.

El EDH, tiene deficiencias en tres constituyentes primarios: Ca, PO y OH. Algunos componentes son sustituciones, como el Na y el K; elementos divalentes, como Sr y Ba, pueden fácilmente reemplazar al Ca. El EDH es bajo en calcio y iones hidróxidos, rico en sustituciones con impurezas alrededor de los sitios OH, sin embargo, es el tejido corporal con más calcio que existe. La concentración de calcio en la apatita pura es de 39.9%, mientras que en el EDH es de 36.5%. Estas impurezas contribuyen a la solubilidad del EDH. La relación de Ca/P observada en el esmalte dental es de 1.67, pero usualmente es reportado dentro del intervalo entre 1.48 a 1.67.³

Los carbonatos también son parte integral de las apatitas biológicas, ayudan estabilizando la estructura y desempeñan un papel importante en la maduración del esmalte durante la fase inicial de la formación cariosa.²⁰

Los carbonatos son las impurezas más abundantes en los cristales del esmalte (3-5% en peso), en el que existe reemplazamiento de iones de Ca por OH o Ca por PO.²¹

Una celda unitaria es la porción mínima de espacio en una red que se repite, donde se concentra determinado número de átomos. La celda unitaria del EDH contiene 18 iones, en un volumen aproximado 52.13 nm. Existen 14 redes cristalinas llamadas de Bravais, el EDH pertenece al eje hexagonal primitivo con tornillo. Dentro de los grupos puntuales, el EDH pertenece al grupo espacial P6 3m, con parámetros de red $a = 0.9434$ y $c = 0.6881$ nm.²²

Las coordenadas atómicas de la hidroxilapatita son:²³

O (I)	en 6	(h)	0.3272, 0.4837,	1/4	occ=1
O (II)	en 6	(h)	0.5899, 0.4666,	1/4	occ=1
O (III)	en 12	(i)	0.3457, 0.2595,	0.0736	
P	en 6	(h)	0.3999, 0.3698,	1/4	occ=1
Ca (I)	en 4	(f)	1/3, 2/3, 0.0010,		occ=1
Ca (II)	en 6	(h)	0.2464, 0.9938,	1/4	occ=1
OH	en 4	(e)	0.0, 0.0, 0.1930,		occ=1
H	en 4	(6)	0.0, 0.0, 0.0617,		occ=1/2

En el Instituto de Física de la UNAM se vienen realizando estudios por microscopía electrónica del EDH desde 1992 ; sin embargo, el papel que desempeña la línea oscura en los cristales del EDH sigue siendo en la actualidad un problema de frontera en este campo

ii. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente, la existencia de la línea oscura en los granos del EDH está experimentalmente comprobada. El espesor de ésta es de 1.5 nm, lo que implica la utilización de técnicas de microscopía electrónica en su versión convencional y de resolución atómica. Hasta la fecha, la naturaleza de su estructura y el papel que desempeña en la estructura de los granos no ha sido dilucidada. Existen varias hipótesis acerca de la línea oscura, pero hasta el momento ninguna ha sido satisfactoria. Por lo tanto, en este trabajo de tesis ahondaremos en el estudio de esta línea tratando de dar más indicios que nos den la respuesta sobre su naturaleza.

iii. JUSTIFICACIÓN

Si más de 90% de la población mexicana se encuentra afectada bucalmente, y sobre todo por caries, es necesario promover y realizar el mayor número de investigaciones al respecto. La caries es inicialmente un proceso de desmineralización y existe evidencia que la línea oscura es donde se inicia esta desmineralización. Si comprendemos más la forma en la que la estructura es afectada, estaríamos en posibilidad de crear nuevas alternativas preventivas y terapéuticas para el mejoramiento de la salud bucal.

iv. OBJETIVO GENERAL

Estudiar e identificar estructuralmente, a nivel atómico, la línea oscura presente en los granos del esmalte dental humano, por medio de la técnica de microscopía electrónica de transmisión, tanto convencional como de alta resolución, es el objetivo general del presente trabajo de tesis.

v. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar estructural y químicamente la línea oscura
2. Determinar estructural y químicamente el grano del esmalte dental humano
3. Comparar la estructura y la composición química tanto de la línea como del grano del esmalte dental humano.
4. Establecer cuál es el papel que desempeña la línea oscura con respecto a los granos del esmalte dental humano.

vi. HIPÓTESIS

Hipótesis de trabajo

Existe diferencia significativa tanto estructural como química en el grano del esmalte dental humano y la línea oscura que lo cruza.

Hipótesis nula

No existe diferencia significativa estructural ni química en el grano del esmalte dental humano y la línea oscura que lo cruza.

Hipótesis alterna

La línea oscura representa una fase distinta de la hidroxilapatita que forma el resto del grano del esmalte dental humano.

CAPÍTULO I

FORMACIÓN DEL ESMALTE

1.1 EMBRIOLOGÍA DEL ESMALTE DENTAL

Uno de los problemas más apasionantes de la biología moderna es el análisis de los mecanismos del desarrollo, crecimiento y diferenciación incluyendo el dental. ¿Qué mecanismos organizan con tanta precisión el principio y el fin del crecimiento dental? ¿cómo coordina el organismo, en el espacio y en el tiempo, hasta los mínimos detalles, determinando las diferentes etapas? ¿cómo comprender la diferenciación celular que presentan formas, estructuras y funciones concretas? El problema consiste en entender los acontecimientos y mecanismos de comunicación asociación intracelular que dan origen a los diferentes tejidos especializados, como el EDH. Por eso es importante enfatizar en algunos puntos de la formación del esmalte, con el objetivo de tener un mejor entendimiento de los sucesos durante este proceso.

La amelogénesis en el hombre, el mono y la rata es semejante en cuanto a sus patrones fundamentales.

El epitelio del órgano dental es separado del ectodermo por medio de la membrana basal, el cual se cree que tiene su origen en la cresta neural (fig 1.1 a)

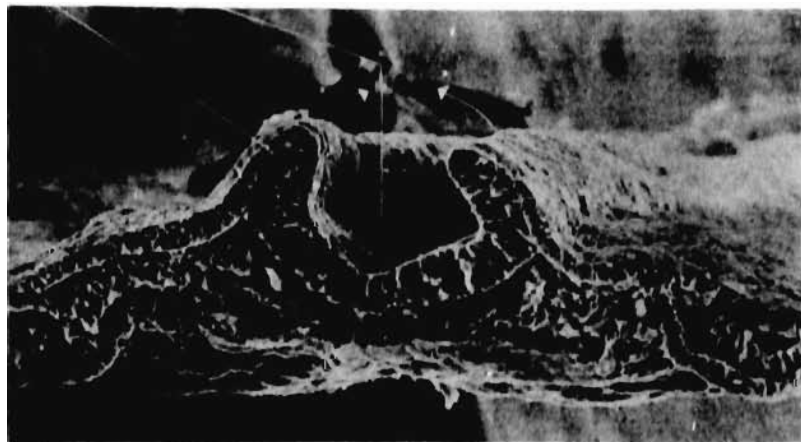


Figura 1.1 a) MEB. Elevación del pliegue neural. (Tosney, K.W : Dev.Biol.89:13,1982)

Algunas células pulpares mesodérmicas se diferencian en odontoblastos. Éstas tienen la función de sintetizar y secretar colágena tipo I y proteínas no colágenas, las cuales forman colectivamente la predentina, que se mineraliza por la precipitación de los cristales de fosfato de calcio, las células de la cresta neural, al entrar en contacto con el epitelio oral, adquieren el potencial para inducir la formación dental.²⁶ Los factores externos deben tener influencia en el destino de los diferentes mensajes recibidos por los tejidos.²⁵ Durante el desarrollo, los factores deben estar asociados con otros elementos, como el tejido nervioso o una membrana basal subyacente al epitelio oral.^{27,28}

Diversas investigaciones han demostrado que el ectodermo oral puede potencialmente interactuar con la papila dental. El ectodermo contiene células de la cresta neural, las cuales poseen mensajes para inducir la formación dental y su posición espacial. Formaciones dentígenas pueden observarse en el tejido ovárico o pancreático sin necesidad de tener contacto con el epitelio oral.^{29,30} Algunos investigadores creen que las células epiteliales pudieran tener receptores de superficie. Células neurales interactúan con el epitelio e inducen la formación dental.^{29,30}

La membrana basal sufre una invaginación. El mensaje es una sustancia química secretada por células de la cresta neural en el medio ambiente extracelular del epitelio oral ectomesenquimatoso, esta sustancia podría ser una fosfoproteína que posteriormente se calcificará. Estas calcificaciones integrarán la mayor parte del esmalte, la dentina y el cemento dental.^{30,31} Esta sustancia proteica podría ser la transportadora de las instrucciones del gen formador de los dientes. Ciertas células podrían considerarse como parte de un "sistema de inteligencia celular" regido por el código genético y modificado por su medio ambiente. La sustancia se libera por exocitosis y se difunde en todas direcciones hacia los receptores, que son células con receptores de membrana. Algunos trabajos de investigación creen que ningún sitio del epitelio oral interactúa con la papila dental para formar dientes.^{32,33}

1.2 ETAPAS DE LA FORMACIÓN DENTAL

1.2.1 ETAPA DE YEMA

El epitelio oral se separa de la membrana basal, donde están constituidas las células neuroectomesenquimatosas (fig.1.2 a).

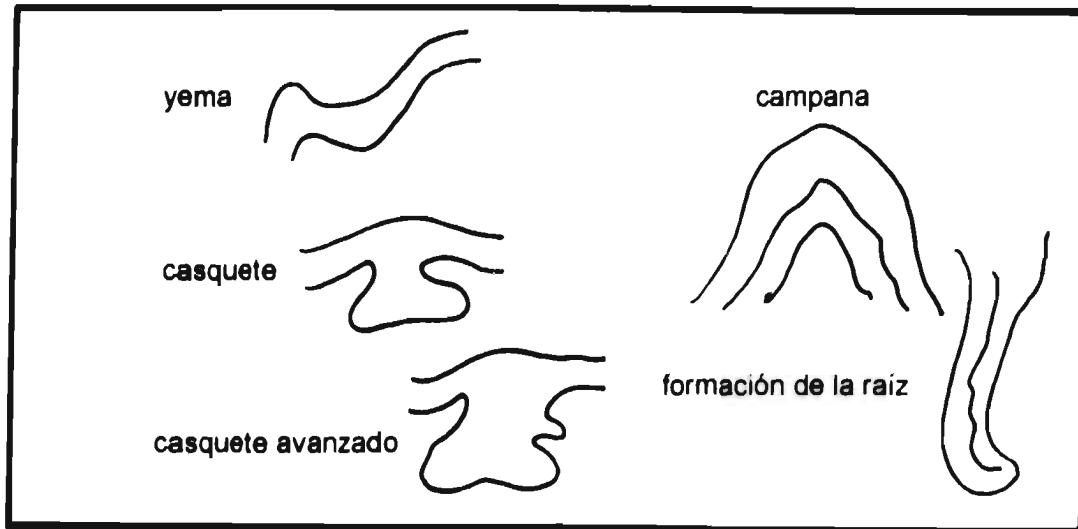


Figura 1.2 a) Etapas de la formación dental.

1.2.2 ETAPA DE CASQUETE

El epitelio, en la etapa de yema, ha crecido en el mesodermo de la cresta neural para formar una especie de casquete. Las células del estrato germinativo del ectodermo oral se continúan con la superficie del casquete. Otras células ocupan el interior.

1.2.3 CASQUETE AVANZADO

Se inicia el desarrollo dental en el ectodermo oral, con una delgada lámina dental y una protuberancia en donde se forma la yema dental del diente permanente. Se alarga el casquete, el cual está delimitado por el epitelio dental externo y el interno, el cual encierra la

papila primitiva dental, que contiene células de la cresta neural. La interacción de estas capas produce el órgano del diente.

1.2.4 ETAPA DE CAMPANA

La lámina dental persiste y las células se recubren con el epitelio dental externo. El aspecto externo de la campana tiene epitelio cuboidal, el cual es invaginado por redes capilares. La membrana basal de las células endoteliales de los capilares y el epitelio dental externo se encuentran separados por el tejido conectivo. El epitelio dental externo forma un lazo cervical con una capa de células columnares en el interior del epitelio dental. La membrana basal separa el epitelio interno de la primitiva papila dental. El interior de la campana consiste en capas delgadas de estrato intermedio adjunto al epitelio dental interno, se pierde el retículo estrellado entre el estrato intermedio y el epitelio dental externo. La combinación interna y externa del epitelio dental pulpar induce a la diferenciación de los odontoblastos, en la zona donde las células de la papila dental primitiva se aproxima a la membrana basal. La papila dental primitiva se alarga en la pulpa dental y se separa del epitelio de casquete, y deja un espacio que contiene un material filamentoso que se cree que es colágena tipo V.³³ El epitelio dental interno estará destinado a desarrollar una capa que formará los ameloblastos.³⁴

1.3 INDUCCIÓN DE LA DENTINOGÉNESIS

Las células pulpares causan la diferenciación de los odontoblastos funcionales.³⁵ La inducción ocurre sin contacto celular aparente desde la membrana basal, que es separada en dos componentes.³⁶ Una molécula desconocida, quizá una prefase de los fosfatos de calcio, se secreta por los ameloblastos que formarán el esmalte.

Los odontoblastos se elongan como formas más dentinarias y la membrana basal es fagocitada por los ameloblastos, que desarrollan una superficie con numerosas interdigitaciones y fibras colágenas.³⁷ Algunas proyecciones son similares a las proyecciones

odontoblásticas “ Las fibras colágenas comienzan a desarrollar un material denso entre las fibras “ Este material es globular y forma líneas simétricas mediante macromoléculas. las líneas se encuentran contenidas en granos alargados. Estudios cuidadosos han revelado muestras de exocitosis de gránulos elongados en varios puntos del proceso odontoblástico”” (fig 1 3).

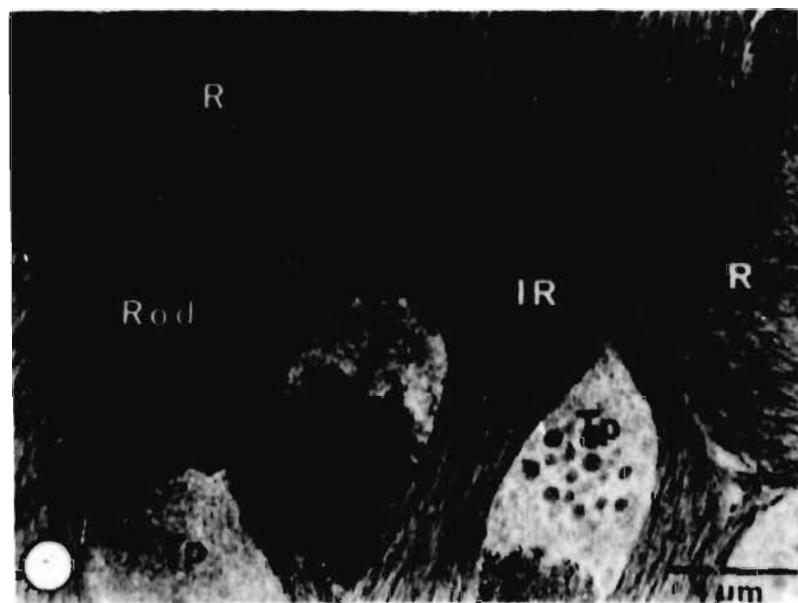


Figura 1 3. a) Gránulos secretorios formados entre las filas (Warshasky. Scan Microsc.1:4,1987)

El proceso odontoblástico muestra ocasionalmente terminaciones en la unión amelo-dentinaria que se entrelazan con las fibras colágenas y el manto dentinario “ El manto dentinario son fibras de colágeno tipo I adjuntas al proceso odontoblástico ““

Usualmente se encuentra un agregado de colágeno en la dentina y la preentina. Por medio de autorradiografías se ha observado que el colágeno se deposita a través de la preentina ““

La unión amelo-dentinaria es producto de odontoblastos y ameloblastos (fig 1.3 b)

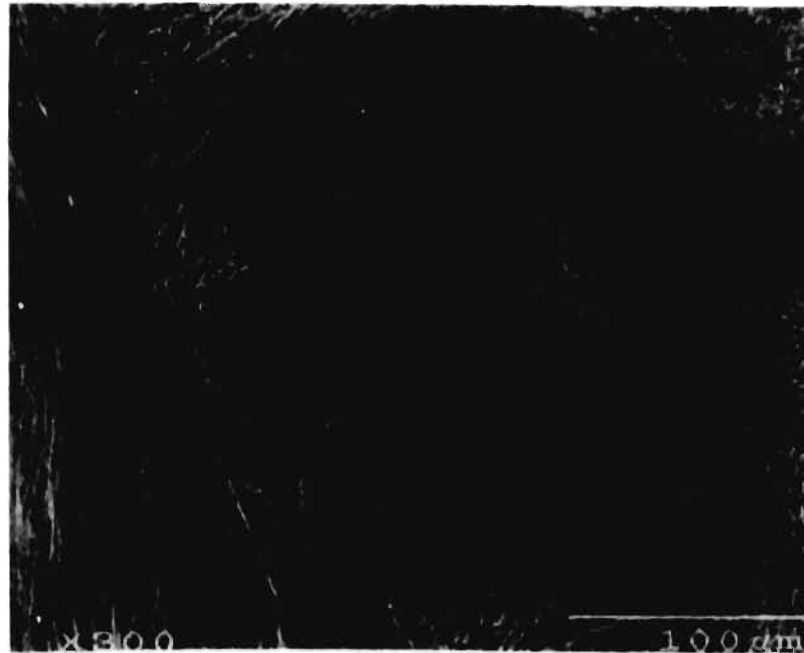


Figura 1.3 MEB. b) Unión amelo-dentinaria.

A esta unión se le denomina **enameloides**. De ella se origina la forma de los dientes alrededor de la papila dental que la contiene. “Réplicas de procesos membranosos revelan una especie de pseudo membrana de consistencia suave que denota diferentes tipos de fibras colágenas que le dan aspecto tubular a la dentina.” Los túbulos odontoblásticos se asemejan al proceso citoplásmico y contienen fibras a lo largo de ellos. “La lámina limitante entre el proceso odontoblástico y la pared del túbulo ha sido interpretada como proceso odontoblástico.”⁵¹⁻⁵² En ciertas condiciones de preparación, el proceso puede ser alterado en cuanto a su longitud.⁵³ Existe evidencia de vesículas matriciales semejantes a las del cartilago, que deben estar presentes al inicio de la mineralización.⁵⁴⁻⁵⁵

Los odontoblastos son originalmente una pequeña fase de la formación del órgano del esmalte que secreta dentina en aposición y forma la corona del diente. En la pulpa, los odontoblastos secretan dentina inducida por el epitelio dental interno, que se diferencia en capas de ameloblastos. Sin embargo, se cree que la dentina nunca entra en contacto con los ameloblastos.⁵⁶

Se piensa que la secreción pudiera contener una glicoproteína, una fosfoproteína, también existe un cierto nivel de tirosina en la predentina y representa al procolágeno en la

terminal amino-carboxilo, cuando éste se secreta. Diversos estudios han revelado que también existe fructosa glicoproteica en los incisivos de ratas” Y también como amelogeninas en la dentina.”

Los ameloblastos no secretan matriz calcificante hasta que se desarrollan completamente, y esto no se efectúa hasta que la dentina adquiere proteínas no colágenas que permiten la mineralización. Quizá el ameloblasto por sí solo sea el factor de iniciación durante la mineralización.”

Proteínas no colágenas como la osteocalcina” y fosfoproteínas, han sido aisladas de la dentina; ” se ha sugerido que el contacto entre el ameloblasto y el odontoblasto inician la mineralización.”

1.4 AMELOGÉNESIS

Los dientes humanos poseen una erupción limitada. El órgano dental revela un ciclo completo de vida de los ameloblastos durante la amelogénesis en ratas^{41,42,43} Las estructuras del epitelio dental se derivan de la lámina basal. Las células epiteliales provienen del estrato intermedio y el retículo estrellado. El epitelio dental externo es cuboidal y se transforma en columnar, diferenciándose en ameloblastos.”

El retículo estrellado varía en espesor y número celular, engloba el espacio extracelular que actúa como protección hidrostática en la fina capa de ameloblastos. La papila dental produce la pulpa, que contiene las células odontoblásticas, con una matriz de aspecto gelatinoso extracelular. Nervios y sangre suplen a las células pulpares y cuerpos odontoblásticos. Alrededor de los procesos odontoblásticos se localizan fibras nerviosas que acompañan a los túbulos dentinarios.”

1.5 LOS AMELOBLASTOS

Los ameloblastos sufren varios cambios durante su ciclo de vida, como la presecreción, la secreción inicial, secreción interna, secreción externa y la etapa de maduración.”

ESTADO PRESECRETOR

Se caracteriza por el desarrollo temprano del órgano dental y la papila dental. El concepto del ameloblasto es generado durante todo el ciclo de vida de éste. Y su alineación es en filas. Con radioautografías puede medirse el nivel del ciclo mitótico mediante una inyección de H-timidina. Los ameloblastos de la pulpa se diferencian a través de la membrana basal. Estos ameloblastos se encuentran en el interior del epitelio dental celular. Las células pulpares son inducidas hacia odontoblastos y permanecen hasta que se secreta la dentina. ⁶⁶

La futura organización ocurre en forma de filas. Su distribución depende de la edad de la fila: la zona más madura se encuentra en el centro y las filas más jóvenes a los lados, y se encuentran entrelazadas, como se observa en las figs. 1.5a, b, c y d.

La zona apical es más joven que la inicial. Se cree que la instrucción está dada por el RER próximo a la superficie celular. ⁶⁶

ESTADO SECRETORIO

En cada fila se forman los procesos de Tomes durante la secreción. Los procesos se inclinan en la misma dirección de cada fila del ameloblasto. En los seres humanos, cada seis o siete filas se agrupan en bandas que corren formando circunferencias en la corona y que corresponden a las llamadas estrías de Retzius. ⁶⁷ La matriz es inmediatamente mineralizada y el material llamado "stippled" no se considera un pre-esmalte. ⁶⁸

Los ameloblastos poseen dos sitios secretorios entre las filas y dentro de éstas. Una vez que se forman las filas del esmalte se llenan los espacios entre ellas. Los dos sitios de secreción se unen en una sola superficie. ⁶⁹ Durante la secreción interna y externa los procesos de Tomes adquieren una posición interdigitada, cuando se inicia la formación del esmalte, éste no se observa. ⁷⁰

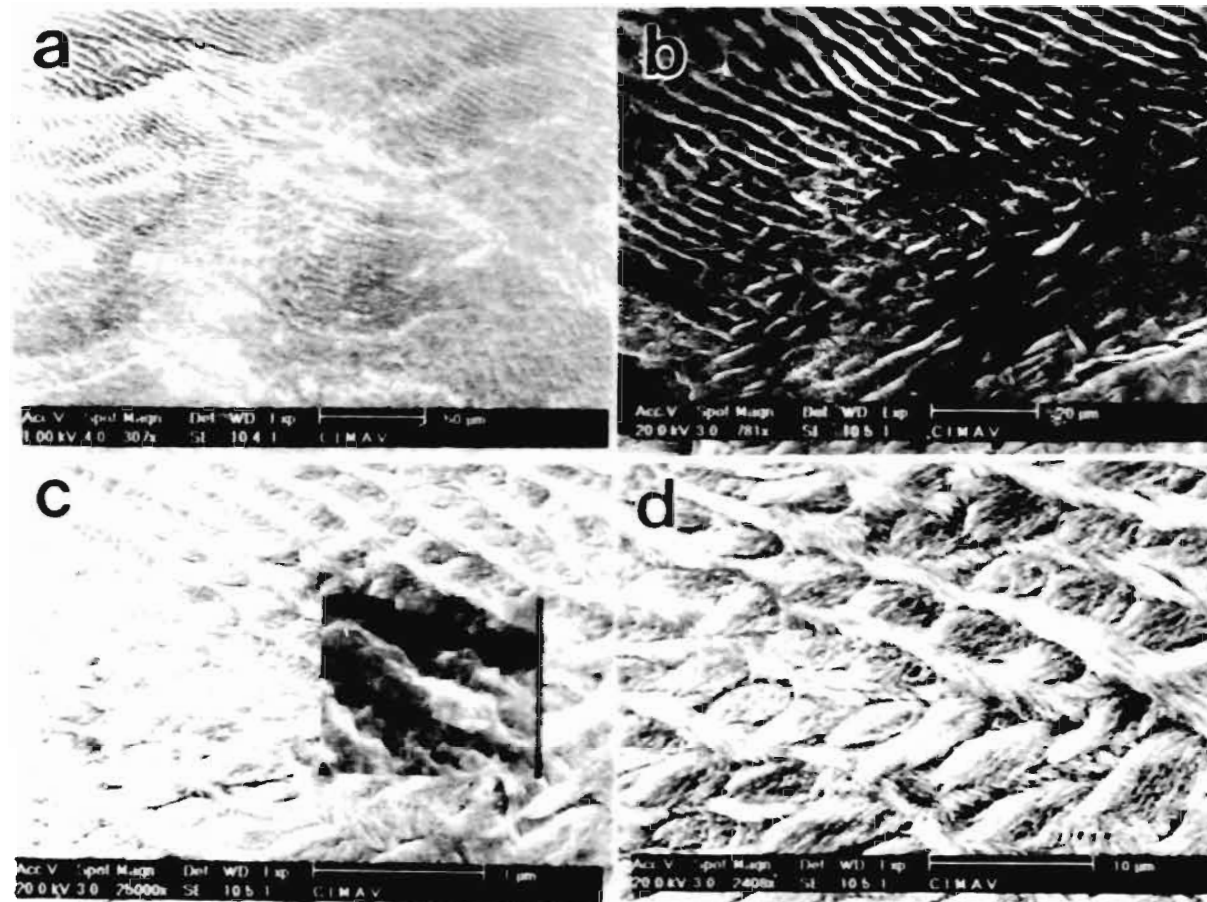


Figura 1.5 e) MEB. El esmalte dental muestra un tejido entrelazado de franjas de hidroxilapatita. En el recuadro se muestra que también existen uniones transversales entre las franjas de la hidroxilapatita.

PROCESO DE MADURACIÓN

En este proceso se observan dos tipos de células: las apicales, de consistencia suave, y las rugosas, con modulaciones que pasan de una consistencia a la otra.⁷⁰

El espacio entre las filas del esmalte es más amplio que el interno, el cual es delgado y elíptico (figs 1.5.e,f). Entre las filas se produce una especie de capa del esmalte.^{70,71} El ameloblasto posee dos tipos de arreglos en su base funcional, con núcleos altos y bajos. El arreglo de núcleos altos es más uniforme que el de los bajos.⁷⁰

ETAPA DE POSTSECRECIÓN

Intervienen los fagolisosomas que están presentes en el citoplasma, y de ellos depende la supervivencia del ameloblasto. También se localizan en las células del estrato intermedio.^{70,71} Se produce pérdida de la polarización y acortamiento de las células en el ápex. La mitocondria, que era muy notoria, comienza a migrar a una posición supranuclear, y el aparato de Golgi pierde su forma tubular.⁷¹

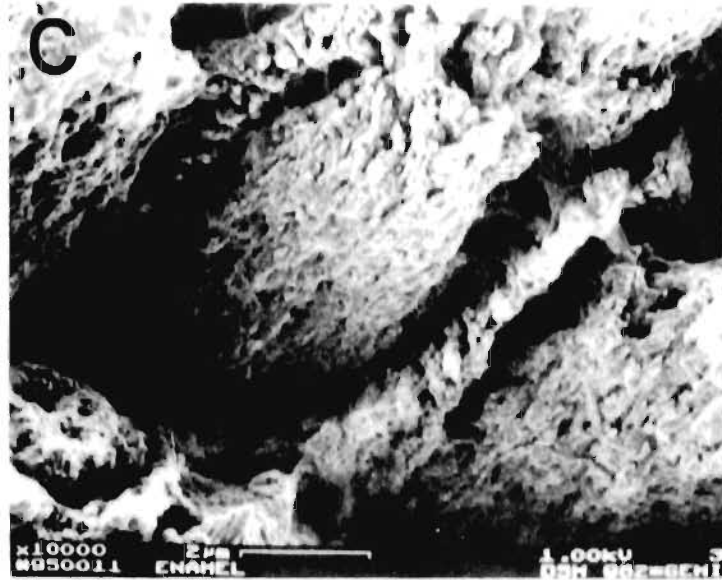


Figura 1.5. e) Prisma del esmalte dental humano separado por las vainas del esmalte

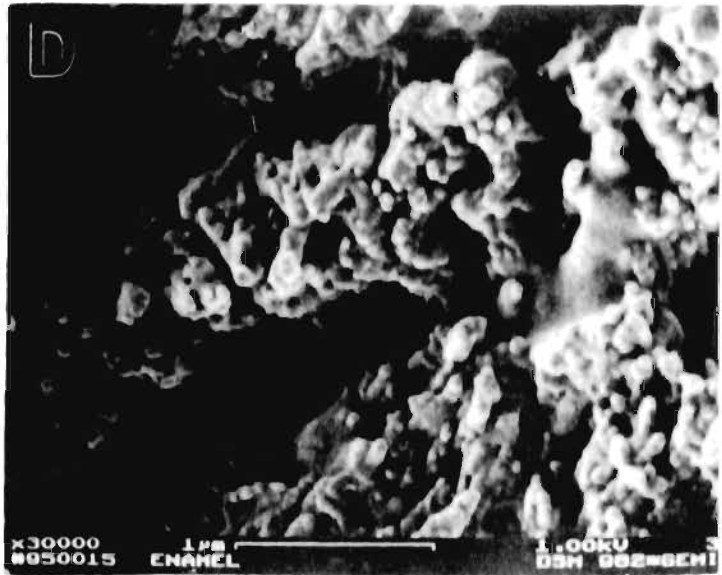


Figura 1.5. f) A los lados de la vaina se observan una especie de conductos.

CAPÍTULO II ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN DEL ESMALTE

2.1 EL ESMALTE DENTAL HUMANO

Por mucho tiempo, algunos profesionales de las áreas biomédicas se referían a la composición como estructura, por lo tanto es necesario distinguir entre ambos términos. En este capítulo, al hablar de la estructura nos referiremos a los arreglos geométricos atómicos en secuencias repetidas, y la composición del esmalte estará dada principalmente por fosfatos de calcio, que estructuralmente constituyen la hidroxilapatita, la cual es constituyente del hueso, el cartilago, el cemento y la dentina. Su fórmula química es: $[(Ca)_{10}(OH)_2](PO_4)_6$. Es soluble en agua y, de hecho, si una muestra se deja sin líquido, poco a poco se deshidrata hasta permitir la desunión de los cristales. Los fosfatos que tienen mayor importancia biológica son: los fosfatos de calcio amorfos, los deshidratados de calcio-brushita, anhídridos de calcio-monetita, los fosfatos octocálcicos, los fosfatos tricálcicos- whitlockita, pirofosfatos deshidratados de calcio y las apatitas.”

El material orgánico consiste en una colagenasa tipo I. La colágena consta de tres cadenas polipeptídicas unidas entre sí en forma de hélice (el procolágeno). Consta de 20 a.a. dentro de los cuales se encuentran: glicina, alanina, prolina e hidroxiprolina, que constituyen la tercera parte de la molécula. La unidad estructural del procolágeno consta de un arreglo molecular de 280 nm de longitud y 1.35 nm de espesor. El colágeno también posee glucosa y galactosa [menos de 1% en peso]. El colágeno tipo uno es el único que se encuentra en tejidos duros. La vitamina C lleva a cabo la hidrolización de la prolina y la glicina que deben hidrolizarse antes de que se unan las cadenas polipeptídicas.” Respecto a las proteínas no colágenas, se ha demostrado que el esmalte dental guarda una estrecha relación con ellas; algunas matrices no colágenas se encuentran implicadas en la iniciación o inhibición de la formación de la apatita, tanto en vivo como in vitro.”

Dos tipos de proteínas se han observado en el esmalte de bovino, el 85% de la matriz

consiste en una proteína rica en prolina llamada amelogenina, la cual es removida probablemente por hidrólisis durante el proceso de mineralización. La otra proteína de importancia es la enamelin, se trata de una fosfoproteína con un peso molecular de 46,000-72,000 daltons, rica en ácido aspártico y ácidos glutámicos."

En cuanto a la amelogenina, participa en el desarrollo de la matriz del esmalte. Existen dos genes relacionados con esta proteína, uno para el cromosoma X, otro para Y. Su localización en X se encuentra en la región p 22.¹² En cuanto al cromosoma Y, el locus de la amelogenina es una area pseudoautosómica, su afección está relacionada con el síndrome Kallmann's. Y en comparación al gen X, este se encuentra muy disminuido.¹³

Las amelogeninas humanas tienen secuencia P-A-T-D-K-T-D-R-E-E-V-I-F (fig II.1 a).¹⁴

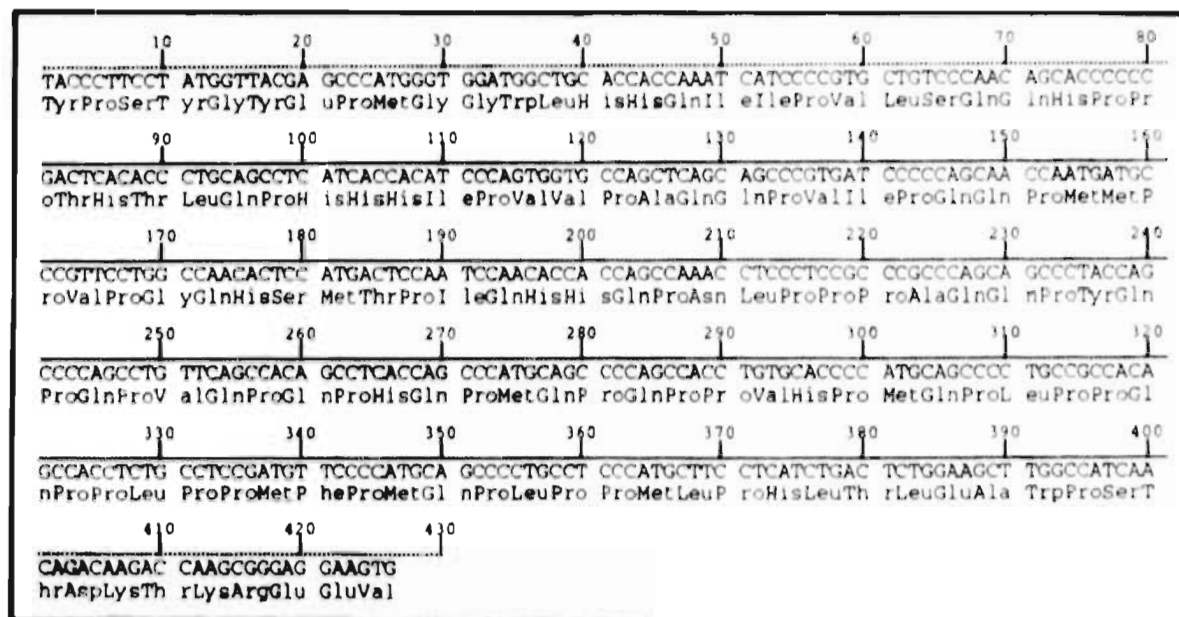


Figura II.1. a) Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de la amelogenina humana cDNA.

Se ha sugerido que el fosfato proteico es un participante en la nucleación (iniciación del proceso de mineralización) de la hidroxilapatita. La fosfatasa alcalina también se encuentra dentro de la matriz, aparece donde tiene lugar el crecimiento continuo de cristales. Se cree que rompe el pirofosfato para permitir el crecimiento del cristal.¹⁵

En cuanto al agua adherida a los cristales, quizá se deba a cambios bioeléctricos

ocasionados por la absorción de iones y protones en la superficie dental.⁷⁹ En otros tejidos calcificados, cuando aparece el primer cristal, rápidamente brota de las paredes de las vesículas matriciales, cuando éstas se encuentran en los estadios iniciales de la formación de los tejidos duros. Todas las matrices, sin importar cuáles sean, aceptan minerales en forma de hidroxilapatita.⁴

Estudios realizados con microscopía electrónica de transmisión han revelado que el EDH es una masa formada por varillas de granos cristalinos. En los granos se encuentra una línea obscura central (CDL) de 1 a 1.5 nm de espesor, que puede o no atravesar el cristal. Y puede ser negra, blanca o desaparecer según su orientación.⁷³

La unidad estructural básica del cristal es el "prisma", término mal empleado porque no posee una geometría regular.³ El prisma correspondería a la parte inicial de las varillas de la hidroxilapatita. Estas varillas son producto de la secreción varillar e intravarillar. Se dice que una parte de la varilla está formada del mismo ameloblasto, que sus procesos de Tomes son esenciales tanto para la orientación como para la formación de las varillas y la de gránulos secretorios.⁸⁰ Se sabe que el esmalte se forma a una velocidad de 4 micromicras por día.⁴ Las varillas tienen un trayecto sinusoidal, tienden a mantenerse en hileras dispuestas en forma de anillos concéntricos alrededor del diente (fig II.1 b).

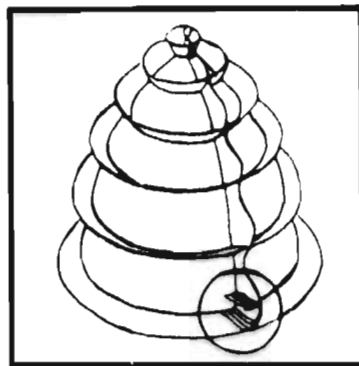


Figura II.1 b) Disposición en circunferencias de las franjas del esmalte a lo largo del eje mayor del diente. (Ten Cate. Histología Oral. Editorial, Panamericana, 1986.)

Cada hilera corre en una dirección generalmente perpendicular a la superficie del diente, con una ligera inclinación hacia la cúspide. Existe un cambio de dos grados entre hileras sucesivas⁴⁴. Los prismas del niño poseen un espesor de 297 nm, 300 nm de longitud y un diámetro de 1.03 nm, los prismas de los jóvenes miden 514 nm de espesor, 600 nm de longitud y 5.68 de diámetro. Los prismas de los ancianos: 583 nm de espesor, 800 nm de longitud y 5.66 de diámetro. Los cristales del anciano ya no presentan alargamiento en la dirección *c* y ya no existe contraste ni en la sección transversal ni en la longitudinal. De acuerdo con nuestras observaciones, los cristales del esmalte dental en ancianos se fragmentan a medida que transcurre el tiempo y son menos susceptibles a la desmineralización. Las hileras del esmalte en los premolares corren radialmente respecto a la superficie externa del esmalte, corren horizontales hacia el centro y entrelazadas. El esmalte carente de varillas se localiza en los 30 micrómetros más externos del esmalte de todos los dientes primarios y en el tercio gingival de los permanentes. Cada varilla recién aparecida mide aproximadamente tres micrómetros, y gradualmente alcanzan un promedio de 6 micrómetros. A las varillas que se entrelazan sobre las cúspides se les denomina esmalte nudoso. Y al fenómeno óptico que se ve como bandas claras y oscuras producto de la variación varillar se les conoce como bandas de Hunter-Schreger⁴⁵. Las estrias de Retzius son conjuntos de seis o siete varillas que se observan como bandas oscuras en cortes longitudinales y en cortes transversales como anillos concéntricos⁴⁶. Existen también estrias transversales que podrían ser resultado de interrelaciones entre las varillas. Las laminillas y penachos pueden observarse en cortes cuidadosamente desmineralizados. Las laminillas corresponden a defectos lineales, los cuales contienen proteínas o desechos orgánicos de la cavidad bucal. Se cree que los penachos se forman por cambios abruptos en la dirección de las varillas y festonean el límite amelodentinario.⁴⁷

Conforme a nuestras observaciones, debemos hacer notar que el EDH es muy sensible a la radiación y que la zona central de los cristales es la primera en afectarse. Lo que sucede es que existe un incremento en la energía transmitida a los electrones de los átomos

de la muestra que resulta en rompimientos de enlaces atómicos y, como consecuencia en la relajación de la estructura. Los efectos disminuyen por arriba de 100 KV, pero desaparece el material orgánico. Es conocido el hecho de que los materiales que contienen agua sean de mayor susceptibilidad en cuanto a su estructura, tal es el caso de los fosfatos octocálcicos que se encuentran en el centro del cristal donde se encuentra la línea oscura¹¹

2.2 LA LÍNEA OSCURA

El EDH, se conforma de granos cristalinos en cuyos centros aparecen las líneas oscuras (CDL), pero no es sino hasta las microrradiografías que se hacen más evidentes como se observa en la fig II 2 a y b, el interés odontológico en estos defectos atómicos radica en que es la zona más susceptible a desmineralizarse por ácidos orgánicos lo que corresponde a los estadios tempranos de la caries dental^{12,13} También parecen estar vinculadas al crecimiento inicial de los cristales y no son debidas a los altos voltajes. El contraste de las CDL depende de la orientación del foco es oscura en bajo-foco, desaparece en foco y es blanca en sobre-foco¹⁴

Los primeros reportes de estas líneas fueron en esmalte dental de roedores, aunque ya se habían observado características lineales en monos, perros y seres humanos, reportaban que se trataba de una interferencia en el patrón que representaban una fase discontinua de los cristales y que dependía de la orientación del foco^{15,16} En las primeras investigaciones, se afirmaba que las líneas oscuras sólo representaban en 20% de los granos.¹⁷ Sin embargo, observaciones realizadas en el Laboratorio de Materia Condensada del Instituto de Física muestran que todos los granos del esmalte dental vistos en las microrradiografías poseen una línea y esto depende del ángulo que forma el grano con respecto al haz electrónico, que será de 90° (fig. II.2c).



Figura II.2. Dependencia focal del contraste de la línea oscura. a) sobrefoco. b) en foco. Nótese que en (b) la línea desaparece.



Figura II.2 c) MET. Corte transversal del esmalte dental donde se muestran las líneas oscuras. (M. González; A. Madrigal. Análisis Estructural del esmalte dental. Tesis Odontológica, UNAM, 1994.)

En cristales de hidroxilapatita sintética también se han observado las CDL y han sido reproducidas por medio de hidrólisis de fosfatos octocálcicos (OCP), los autores mencionan que son defectos que también se encuentran en el esmalte, la dentina y el hueso (figs II 2d y e) Otras opiniones afirman que las CDL no existen, que la parte central de los granos está hueca y que su forma es romboidal en vez de hexagonal, estas observaciones fueron hechas por medio de microscopía de alta resolución¹² (fig II f y g) En 1978, Dalcusi y Kerebel explicarían que los cristales pasan de formas rectangulares a hexagonales conforme crecen.¹³

En estudios hechos con esmalte fetal las CDL también son observadas. En éste las CDL miden de 8 a 10 nm de espesor y sólo es posible su observación con amplificación mayor que 150,000 x. Este estudio se realizó con 60 cristales, de los cuales el 50% tenían defectos

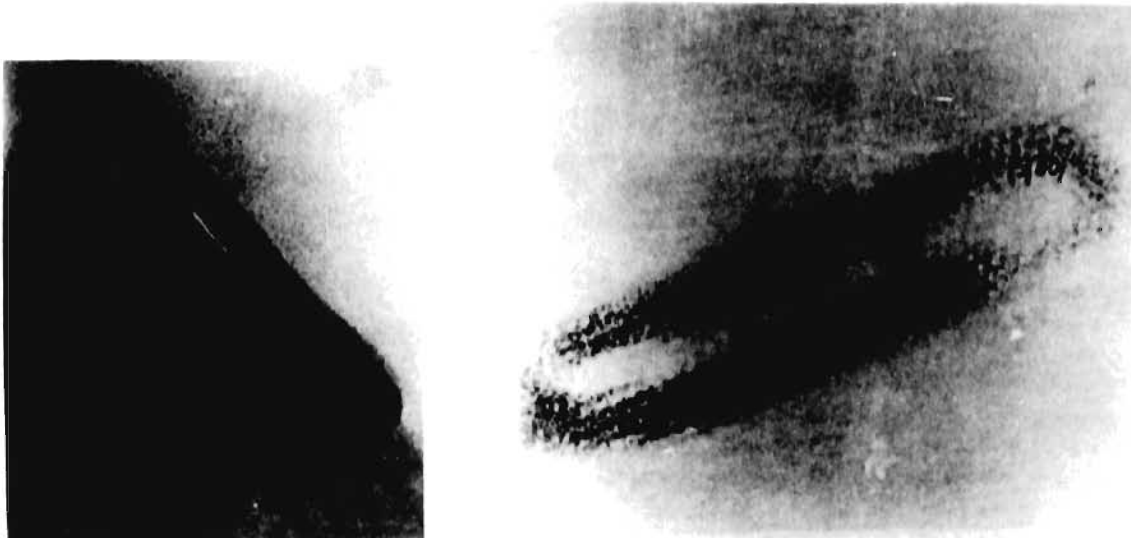


Figura II. d y e) En la hidroxilapatita sintética también aparece la línea obscura. (Le Geros Calcium phosphates in oral biology and medicine, San Francisco, California, 1991.)

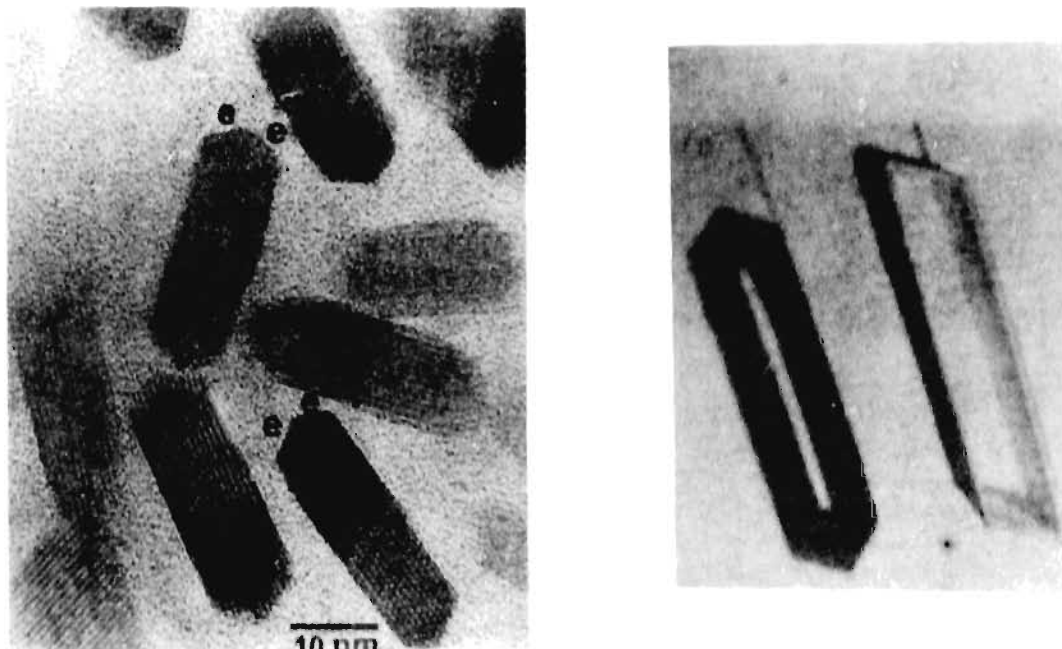


Figura II. f y g) La línea obscura también es evidente por medio de microscopía con alta resolución. g. El autor afirma que los prismas son romboidales. (H. Warshasky. External shape of enamel crystals, 1987.)

30% eran de tornillo, 15% bidireccionales y 5% de borde” En 1962, Nylen afirmaría que las líneas oscuras eran uniones de granos. Marshall, en 1981, decía que el plano (100) no se

caracteriza por tener unión de granos en estructuras hexagonales y que no era característica de las apatitas cálcicas. Además, que estas líneas a veces terminan dentro del cristal y que probablemente se tratara de una variación química de la estructura, como las sustituciones carbonatadas o una fase compatible con los fosfatos de calcio. De acuerdo con lo observado, creemos que sí existen uniones de granos, pero también se trata de una variación química. El carbonato es el componente más abundante en peso de los cristales, el cual es reemplazado por iones hidróxidos. El total de carbonato decrece con la maduración del cristal y se incrementa con el tiempo. Conforme decrece la cantidad de carbonato, éste se eliminado e incorpora a la red cristalina, la cual puede ser el resultado de la hidrólisis de los fosfatos octocálcicos (OCP). En 1965, Brown, sugirió la posibilidad de que el OCP gradualmente se transforme en hidroxilapatita,* con lo que debemos suponer que en el crecimiento se suceden varias prefases hasta conformar, de acuerdo con ciertas condiciones, el EDH.

En 1985, Nelson, afirmaría que las CDL consisten en una expansión mayor de la red de aproximadamente 20% en el centro del cristal y que corresponde a la celda unitaria del OCP. Éste puede observarse a través del plano (300) y del (600), con espacios interplanares de 0.27 nm y 0.31 nm respectivamente. Él sugiere cuatro modelos para la explicación de estas líneas: En el modelo 1 proponía vacancias de aproximadamente 41 nm. Modelo 2. Consistía en fallas como resultado del vector $[1/4\ 00]$. En el modelo 3 explicaría que el OCP se incorporaba en la apatita con dirección [010] y plano (100) y consistía de capas de calcio deficientes derivadas de OCP con ancho aproximado de 0.51 nm, las cuales eran fosfatos y agua. Modelo 4. Afirma que son capas de calcio deficientes carentes de vectores de desplazamiento, pero con vacancias que pudieran colapsar la estructura. Se dice que muchas investigaciones han fracasado porque el defecto es muy sensible al daño electrónico, posee H₂O y rápidamente puede desaparecer. El OCP interviene en la nucleación de los cristales durante el proceso de la mineralización e interviene en el proceso de desmineralización.* También se han observado las CDL en otros tejidos calcificados.*

Las CDL podrían ser un defecto bidireccional,⁹⁰ o el producto de sustituciones iónicas como las carbonatadas.⁹¹ De acuerdo con nuestras observaciones, las CDL podrían representar una fase diferente del resto del esmalte necesaria para el crecimiento del cristal (fig II g, h)

El OCP ha sido propuesto como precursor de la HA.¹¹⁹ En las zonas [2-1-13] y [11-21], el OCP puede detectarse en ausencia de hidrólisis del compuesto, lo que hace pensar que la hidrólisis del OCP crea defectos en la HA.¹⁹

En otro modelo se ha sugerido que las CDL son inclusiones de fosfato octocálcico consisten en una celda unitaria de OCP embebida en la matriz de la apatita, se trata de defectos en los planos del cristal y son vulnerables a la dilución con ácidos orgánicos.²¹

Probablemente, en la etapa temprana de la mineralización existan nucleaciones, y en la segunda etapa se asocia a las CDL.¹⁴ Durante el proceso de crecimiento existe gran cantidad de impurezas que se incorporan en el centro del cristal y producen una variación química.⁹²

El OCP in vivo es influido por varios factores, como pH, temperatura, concentración de la solución, etc., también están presentes otros iones como son F, CO, PO, Mg, citrato oxalato, etc. El OCP denota cristales alargados estables en ácido medio, se hidroliza en presencia de F, CO, Ca, o Na.^{93,94} La apatita sintética, obtenida por la hidrólisis de OCP, muestra que el HPO_4 se incorpora en la apatita y disminuye cuando se incrementan el flúor y el CO.⁹⁵

Cuando el OCP se transforma en apatita (fig II h.i) existen iones como MG, F, CO, citratos, etc., que probablemente ayudan al proceso de disolución y reprecipitación desde la única fuente de P o Ca; necesarios para la formación de las apatitas sintéticas.⁹⁶ La solución puede saturarse con P y Ca esta transformación ocurre in situ, por medio de hidrólisis autocatalítica. En ese caso, la apatita se forma en ausencia de concentraciones críticas de flúor o $(\text{CO}_3)^{2-}$ con un pH cercano a neutral, que da como resultado una apatita deficiente con presencia de PO_4 . Se cree que incorporando Mg se estabiliza la estructura del OPC.

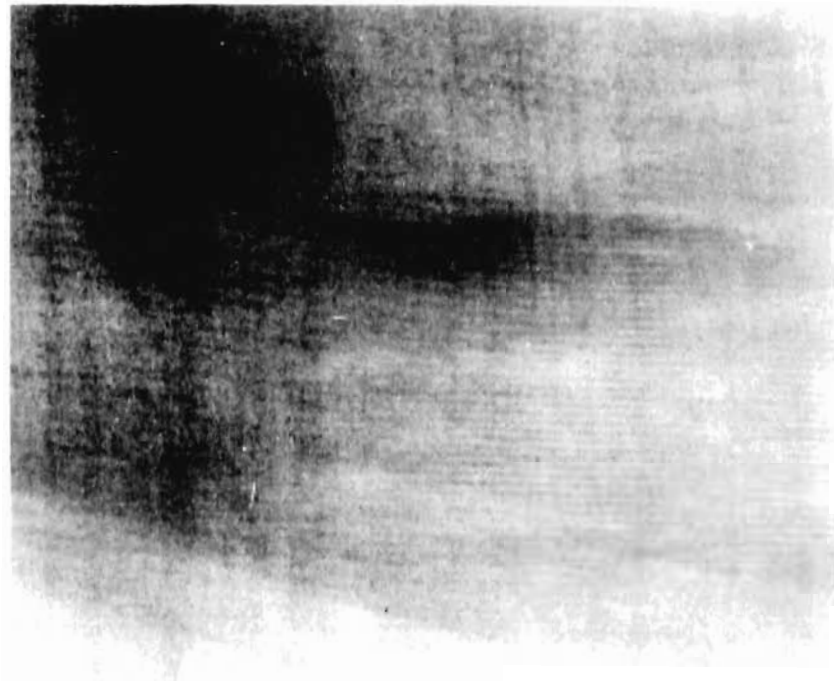
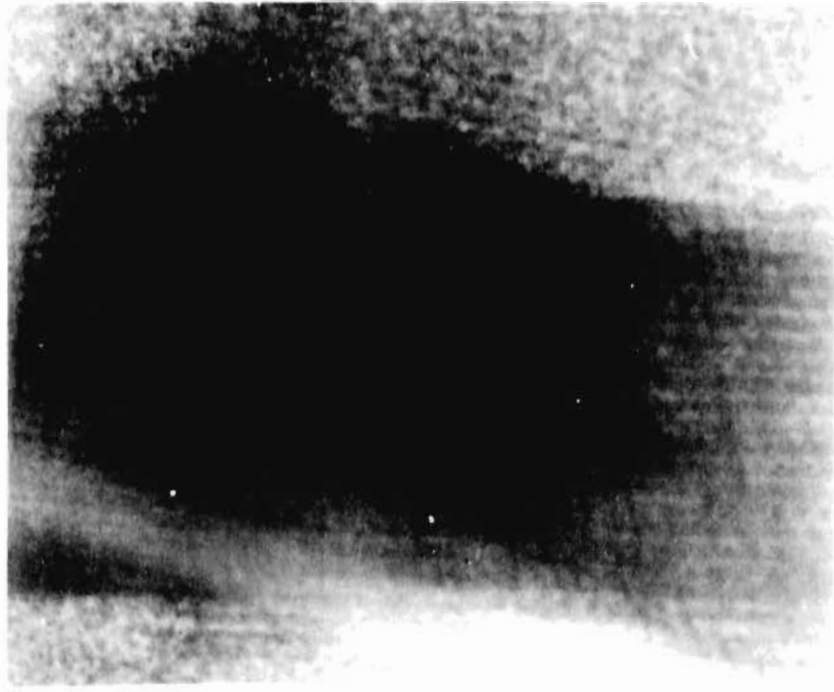


Figura II. h, i) Las líneas oscuras quizá podrían representar una fase diferente durante la formación de la apatita del esmalte dental

La estabilidad del OCP se alcanza por debajo de 100°C y se colapsa en 200°C, formándose otras fases. La transformación de una fase en otra en los fosfatos de calcio puede contribuir parcial o completamente a la disolución o precipitación del material, muchos iones se van incorporando durante las transformaciones in situ. La temperatura, el pH y la composición también pueden contribuir a promover o suprimir las reacciones⁹⁹

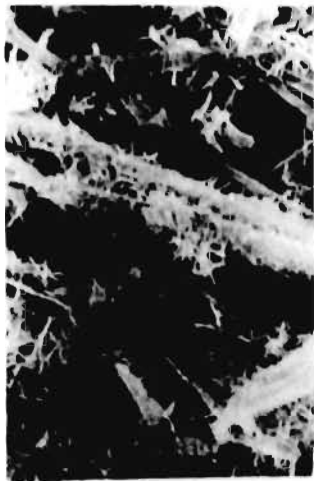


Figura II. j ,k ,l) Transformación del OCP en hidroxilapatita sintética. (Le Geros Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine, San Francisco, California, 1991.)

2.3 DISOLUCIÓN DEL ESMALTE

Para hablar de disolución tenemos que referirnos a la solubilidad, la cual depende de las actividades del calcio y el hidróxido en la solución. Si el producto se satura, la hidroxiapatita se precipita. Si no se satura y se disuelve. La disolución está confinada inicialmente a la subsuperficie del esmalte, pues la capa externa está protegida por un alto contenido de fluoruro y por una película de superficie orgánica procedente de la saliva. Una vez que pasan la superficie protectora, los iones y las moléculas de los ácidos orgánicos quedan en libertad de reaccionar con la estructura del diente y disolverla. Tal es el caso de la fotografía siguiente (fig II.3 a), en la que se observa que la disolución inició con una fractura, quizá producto de una mala oclusión, y que por medio de ella se fue filtrando el líquido bucal hacia el interior del esmalte favorecido con un medio ambiente ácido.

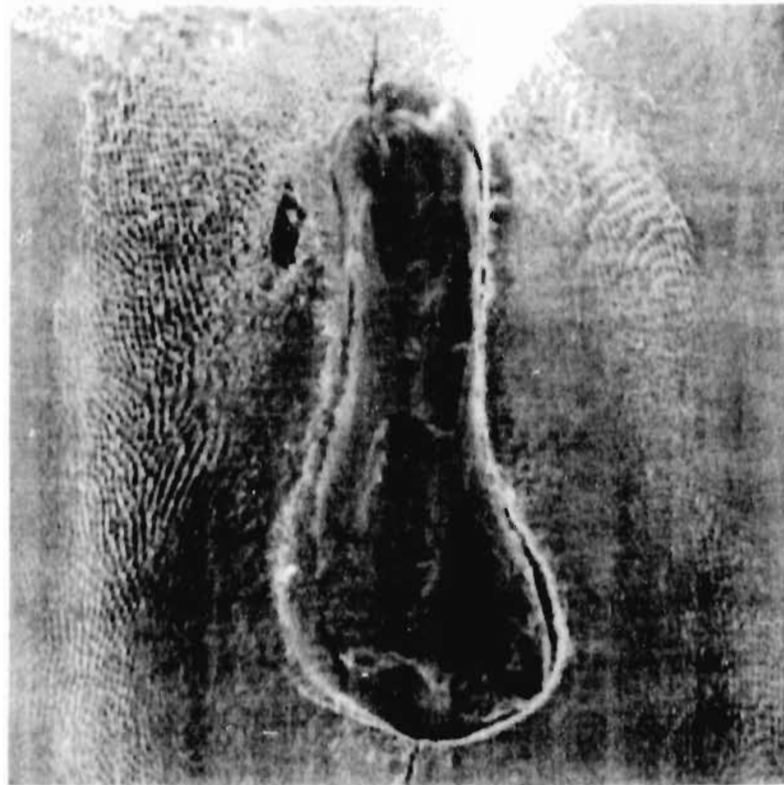


Figura II.3. a) MEB. La disolución está representada por la caries incipiente de la fosa del diente temporal.

Como ya hemos mencionado, el primer sitio de dilución a nivel microscópico son las CDL del grano y las líneas de Retzius, a partir de éstas se extiende a las partes interprismáticas y luego a la parte orgánica intracristalina.¹⁰² Los ácidos también atacan los sitios de dislocaciones en el centro de los prismas, produciendo así vacíos en la parte central de la estructura. Cuando la desmineralización es suficientemente ancha, permite el paso libre a las bacterias, lo que ocasiona mayor desmineralización. Es sabido que, durante un ataque ácido, el material que primero se disuelve es el material orgánico. Con respecto a los ataques cristalinos, éstos muestran forma de dona, igual que los observados en el proceso carioso (fig. II.3 b).

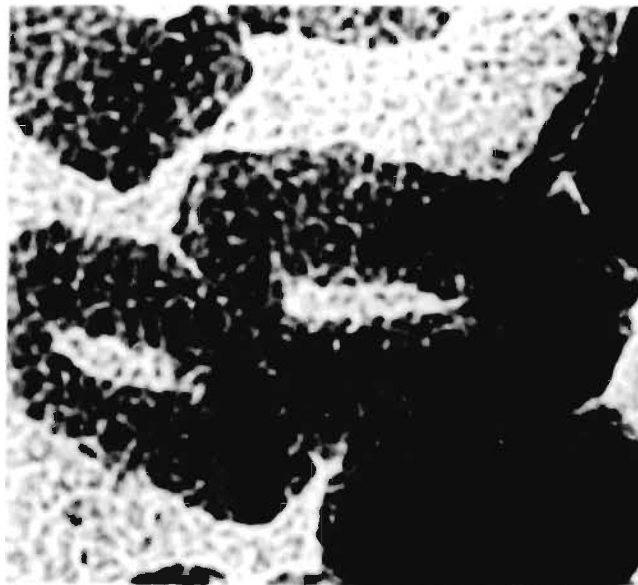


Figura II.3. b) Etapa Inicial de la disolución en los cristales del esmalte dental (M.J.G. Hernández. Tesis Odontológica UNAM 1994.)

El ataque se inicia en el centro del cristal ; es decir, en las CDL. Después se extiende hacia los extremos siguiendo la dirección de los planos (120) y (100), es decir, se efectúa

en dirección perpendicular y paralela a los planos (100) de la HA. Posteriormente se crean aberturas laterales hasta producirse la fragmentación del cristal.

Un ejemplo de disolución es el proceso carioso, caracterizado por la desmineralización del tejido por ácidos como el láctico y el acético, ambos producidos por bacterias. Es primariamente un proceso de lixiviación (separación de sustancias solubles de las insolubles).¹⁰² Los procesos asociados son: densidad baja del mineral, bajo ratio de Ca/P, disminución en la concentración de Mg y carbonatos, y aumento de HPO. Cristalográficamente, existe una expansión del parámetro "a" asociado al enriquecimiento de HPO, una expansión del cristal asociado con la disminución de Mg y CO₃ e incremento de F. El Mg y el CO₃ son elementos preferenciales durante el proceso carioso. Los carbonatos causan mayor susceptibilidad a la dilución y existe facilidad para la hidrólisis de DCPD y OCP. La disolución de los cristales se cree que debe estar gobernada por defectos cristalinos como son las dislocaciones más que por las impurezas. Aunque se sabe que las impurezas pueden afectar directamente las propiedades físicas y químicas del esmalte.³

Conforme avanza la disolución, su velocidad cambia de una reacción de difusión a una de superficie. A mayor temperatura, menor solubilidad. También existen otros factores que contribuyen a la disolución, como el pH, que cuando está entre 3 y 4 propicia que se reduzca la disolución, y entre 5 y 6 ésta no se altera. Se dice que el fluoruro tiene la propiedad de inducir la formación de las apatitas, y es contrarrestado por el carbonato, el magnesio y otros iones que inestabilizan la red de la apatita, al igual que otros agentes como: pirofosfatos y otros fosfatos orgánicos.¹⁰³ La resistencia a la dilución aumenta con la edad, hay aumento de fluoruros y disminución de carbonatos en la superficie del esmalte.⁴

Los dientes temporales son más susceptibles a la dilución. La saliva también contribuye al intercambio iónico y la permeabilidad del EDH.¹⁰⁴

CAPÍTULO III

CONCEPTOS IMPORTANTES

3.1 CRISTALES Y ÁTOMOS

3.1.1 CRISTALOGRAFÍA DEL ESMALTE DENTAL

El objetivo de este capítulo es difundir algunos aspectos teóricos del ordenamiento atómico esenciales para entender cómo se comporta la materia de los compuestos que, en este caso, serán el EDH y sus CDL.

Cada molécula o grupo atómico es un patrón repetido de celdas formadas por átomos, y la cristalografía trata de explicarlos. Se le denomina cristal al ordenamiento de los átomos en una red que se repite.¹⁷ De acuerdo al orden interno de los átomos, los sólidos se clasifican en: cristalinos, amorfos y cuasicristales.⁸ El esmalte dental humano es un biomaterial policristalino, el cual se puede observar en las figs.III. a y b.

Esto puede corroborarse por los anillos concéntricos que forma su patrón de difracción (fig.III.a) : si sólo se formara por puntos en lugar de anillos (fig.III.b) diríamos que el material es monocristalino. Si se observara un solo anillo, esto representaría un material amorfo'.Las sustancias amorfas no tienen un orden establecido y los cuasicristales representan una fase intermedia entre los cristales y los amorfos .⁸

Existe un sistema ya establecido para los materiales cristalinos : los grupos espaciales simétricos están representados por las llamadas "redes de Bravais", tabla 1. Si todos los puntos tienen el mismo alrededor en la red necesariamente son periódicos.¹⁸

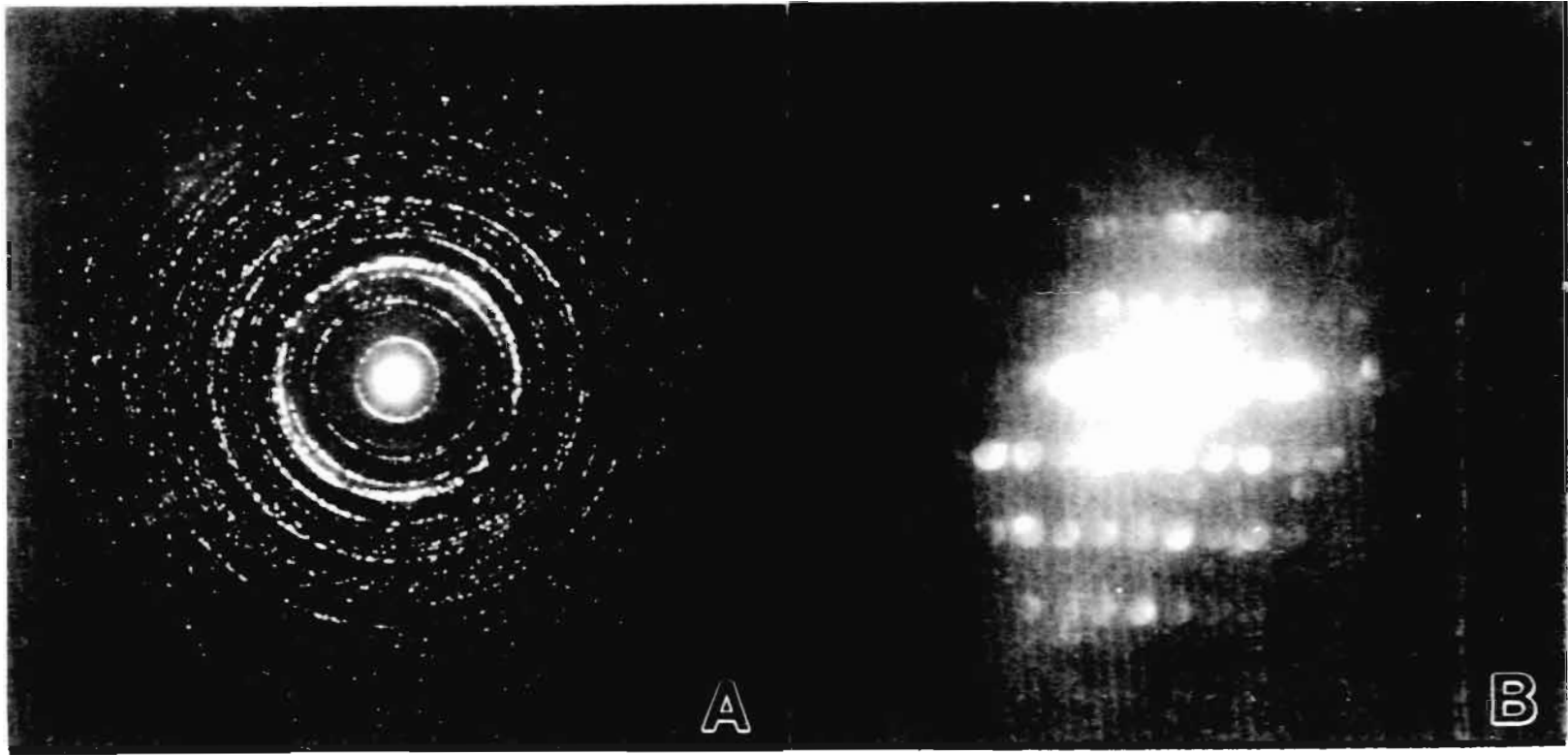


Figura III. MET. Patron de difracción del esmalte dental humano (A) Representa a un material policristalino (B) Difracción de un material monocristalino

Los conjuntos de puntos en los patrones de difracción también se encuentran representados por longitudes de onda en los difractogramas. El difractograma inferior muestra como la señal electrónica interactúa con la muestra del esmalte, los picos son el reflejo de los componentes de cada muestra y los números arriba de los picos son cognotaciones de los planos preferenciales atómicos de los compuestos.

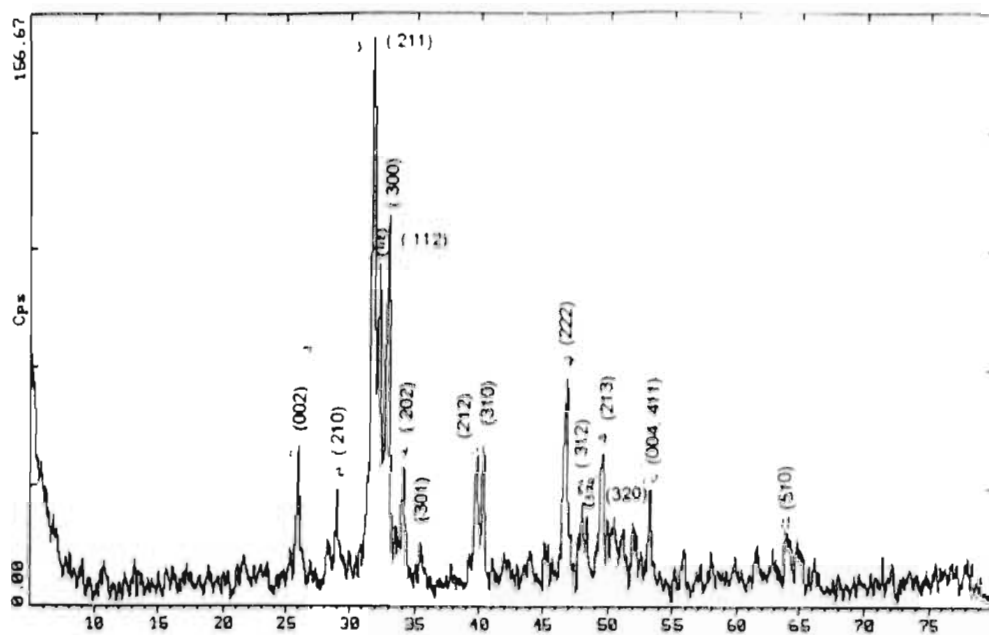


Figura III. c) Difractograma del esmalte dental humano de anciano.

LAS 14 REDES DE BRAVAIS

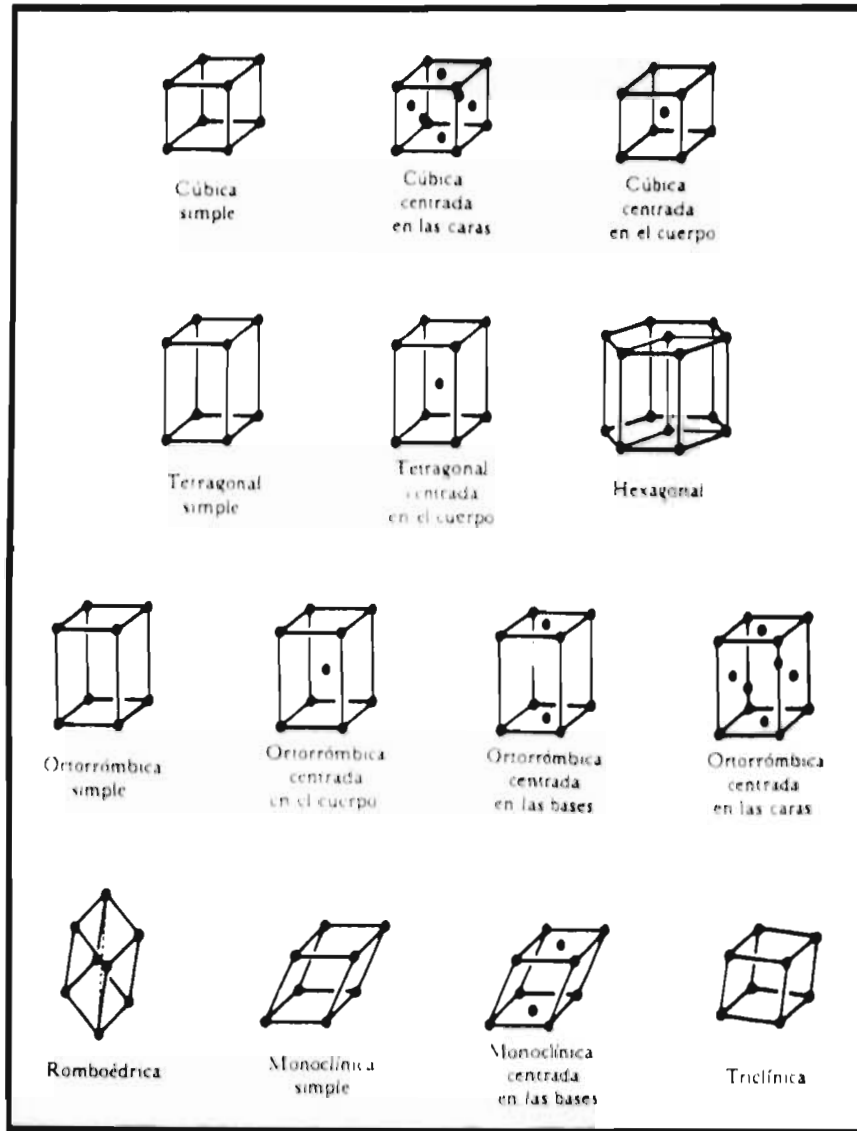


Tabla 1. Los sistemas de estructura cristalina de Bravais.

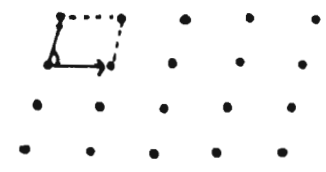




	<p>Paralelogramo</p> $ \vec{a}_1 = \vec{a}_2 \quad \alpha \neq 90^\circ$
<p>Rectangular</p> $ \vec{a}_1 = \vec{a}_2 \quad \alpha = 90^\circ$	
	<p>Diamante o rectangular</p> $ \vec{a}_1 = \vec{a}_2 \quad \alpha = 90^\circ$
<p>Cuadrada</p> $ \vec{a}_1 = \vec{a}_2 \quad \alpha = 90^\circ$	
	<p>Exagonal o romboidal</p> $ \vec{a}_1 = \vec{a}_2 \quad \alpha = 120^\circ$

Tabla 2. En el plano sólo existen 5 redes de Bravais.

El EDH pertenece al sistema hexagonal con eje de tornillo $P6_3m^2$. Se les denomina grupos puntuales a las simetrías alrededor de un punto, y de ellos hay 32 grupos. La combinación de un grupo puntual con la simetría de una red da lugar a lo que se conoce como grupo espacial en 2 dimensiones, obsérvese en la tabla 3



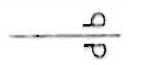



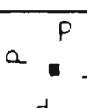
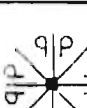
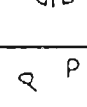
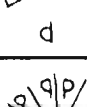
Operación	grupo puntual	símbolo
Identidad		1
Eje 2		2
Línea espejo		m
Eje 2		2m
Eje 3		3
Eje 3 3 línea espejo		3m
Eje 4		4
Eje 4 4 líneas espejo		4m
Eje 6		6
Eje 6 6 líneas espejo		6mm

Tabla 3. Representación de los grupos espaciales en 2 dimensiones.

A la forma externa geométrica de un cristal se le conoce como hábito, que bajo ciertos factores ambientales de crecimiento presenta caras planas y ángulos poliédricos, característica de los cristales. Y al estudio de las simetrías se le llama morfología cristalina.

3.1.2 OPERACIONES SIMÉTRICAS

Se dice que una forma o figura geométrica es simétrica respecto a una transformación si se observa exactamente igual antes y después de que suceda la transformación. A las transformaciones que no causan cambio se les denomina isométricas u operaciones simétricas.¹⁹⁷

Las operaciones simétricas de repetición son:

1. Traslación
2. Rotación
3. Reflexión (como cuando uno se ve en un espejo)
4. Inversión (de cabeza)
5. Combinaciones como :
 - a) Deslizamiento : reflexión más traslación
 - b) Hélice o tornillo : rotación más traslación
 - c) Rotorreflexión : rotación más reflexión
 - d) Rotoinversión : rotación más inversión.

Las combinaciones permisibles de rotación con traslación determinan 230 grupos llamados espaciales. Una red es el arreglo ordenado de puntos que dividen el espacio en porciones iguales. Un punto de red puede coincidir o no con un átomo. La celda unitaria es la mínima subdivisión de una red. La unión de todas las celdas unitarias constituye al cristal. La celda unitaria del esmalte dental humano se encuentra representada en la fig III 1 a

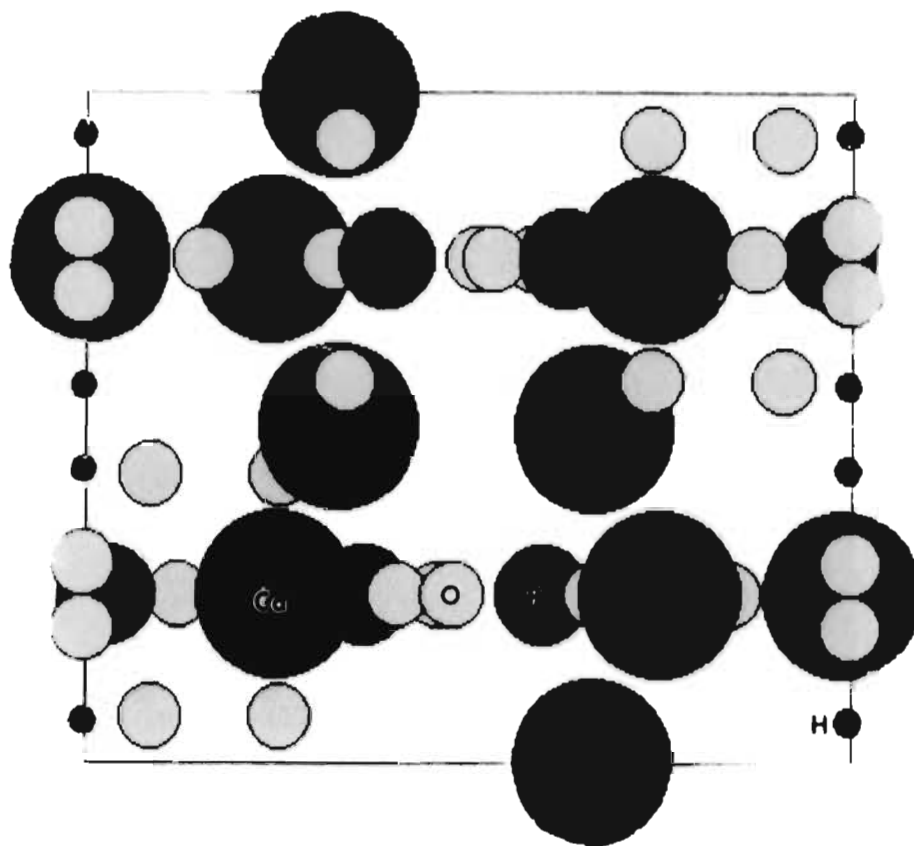


Figura III.1. a) Celda unitaria del esmalte dental humano en el plano 010.

La siguiente figura representa la celda unitaria por medio del procesamiento digital de imágenes que tiene dos propósitos principales: Mejorar la apariencia visual de imágenes y preparar las imágenes para que se midan en cuanto a caracteres y estructuras.

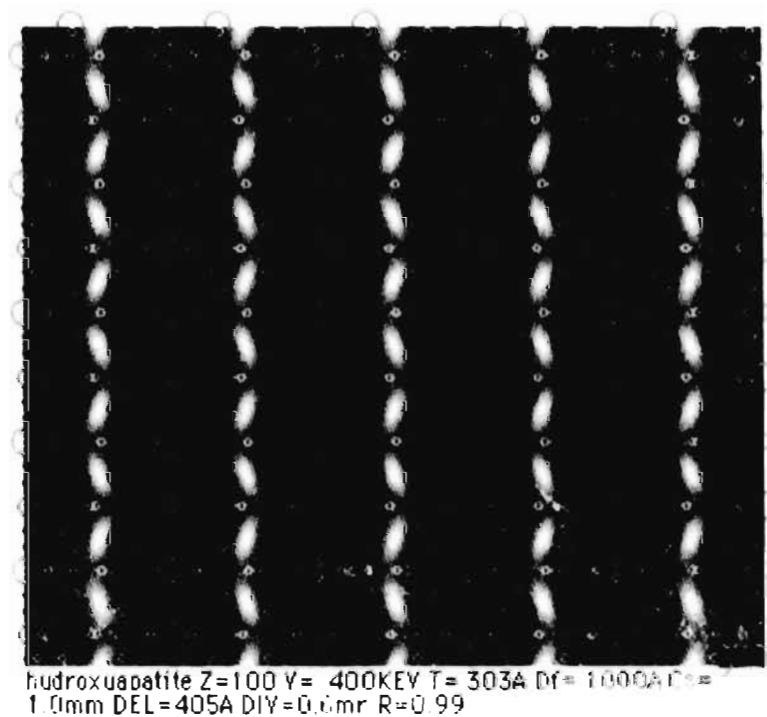


Figura III.1.TEM b) Simulación computacional de la imagen.

Una celda no unitaria puede formarse por un número "n" paralelepípedos. Uno o varios paralelepípedos forman una celda no unitaria (fig III.1. c).

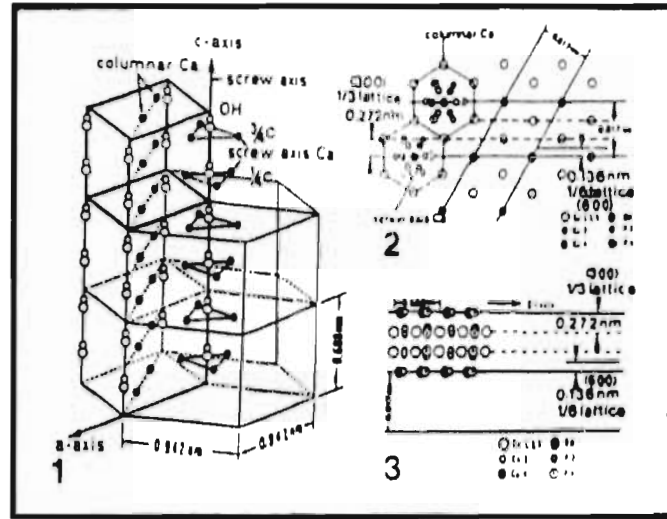


Figura III.1. c) Sistema hexagonal de la estructura de la hidroxilapatita. 1) La región con la línea delgada muestra una sola celda unitaria. 2) Proyección vertical de la misma estructura. 3) Eje c del cristal.

Para facilitar los cálculos matemáticos de las celdas, se le pueden colocar mayor número de puntos, ya sea en el cuerpo de la celda o en las caras, por eso se dice que tal celda está centrada en el cuerpo o en las caras. La celda centrada en el cuerpo contiene puntos en los vértices y en el centro. Y la celda centrada en las caras tiene puntos en los vértices y puntos en los centros de las 6 caras (fig. III.1.d) ¹⁰⁷

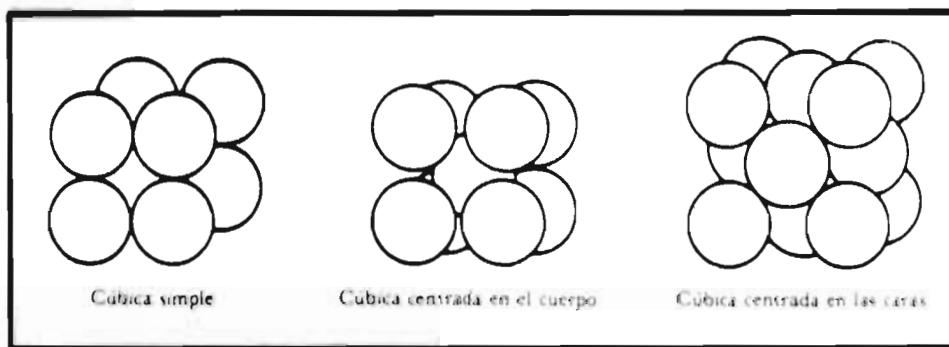


Figura III. d) Modelos para las celdas unitarias cúbica simple (CS), cúbica centrada en el cuerpo (CC) y cúbica centrada en las caras (CCC).

Si las propiedades de un material dependen de sus planos y direcciones se dice que el material es anisotrópico, como lo es el esmalte dental (fig III 1 e). pero si sus propiedades no son idénticas en cuanto a sus planos y direcciones, se dice que el material es isotrópico

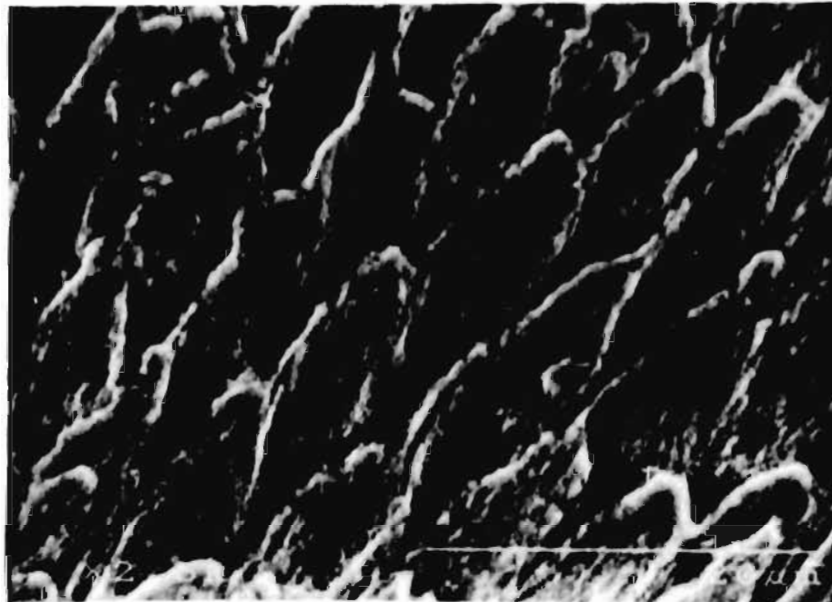


Figura III.1 e) Los prismas del esmalte muestran su anisotropía.

Para localizar los puntos en el espacio se establece un sistema de coordenadas x , y , z donde $x = a$, $y = ab$, $z = ac$, y donde interceptan ahí se marcará el punto. La sucesión de puntos tendrá ciertas direcciones. A representará al "piso" B a la "pared" y C al "techo" (Fig III 1.f)

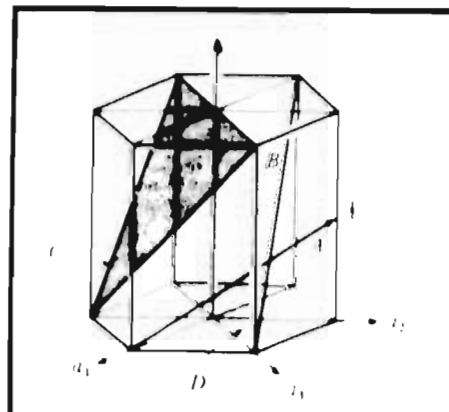


Figura III.1 f) Planos y direcciones en la estructura cristalina

Las direcciones se denotan por medio de corchetes, por ejemplo [0001], y los planos entre paréntesis (0001). Tanto para las direcciones como para los planos se utilizarán los índices de Miller, los cuales se calculan de la siguiente manera:

- a) Se identifican los puntos en los cuales el plano intercepta a los ejes x, y, z en función de parámetros de red. Si el plano pasara por el origen, el origen deberá ser desplazado, pero en el caso del esmalte dental el origen será cero.
- b) Se obtienen los recíprocos de estas intersecciones.
- c) Se encierran las cifras resultantes entre paréntesis. A los números negativos resultantes se les colocará el signo en la parte superior.
- d) Se eliminan las fracciones y/o se reducen los resultados obtenidos de las restas a los números enteros mínimos.
- e) Se colocan entre corchetes []. Si se obtuviera un número negativo, se indicará con un signo negativo encima. Una dirección [1000] no es igual a $[\bar{1}000]$ porque sus direcciones son opuestas.¹⁰⁷ Cuando ciertos grupos de direcciones son equivalentes, se les denomina familia de direcciones <0001>.¹⁰⁸

Los parámetros cristalográficos de la celda unitaria de la hidroxilapatita fueron descritos por primera vez, en 1930, por S. Naray, igual que por M. Mehmel en el mismo año. A las longitudes de los lados de la celda y a los ángulos entre ellos se les denomina parámetros de red, que describen el tamaño y la forma de la celda unitaria.^{12, 111}

Los parámetros de red del EDH para el sistema hexagonal son $a_1 = a_2 = a_3 = 0.9432$ nm y $c = 0.6881$ nm, donde c representa el largo del cristal, con ángulos $\alpha = \beta = 90^\circ$, $\gamma = 120^\circ$,²² y para el sistema monoclinico $a = 0.9557$ nm, $b = 2a$, $c = 0.6872$ nm, $\gamma = 120.36^\circ + 0.04^\circ$. Para la hidroxilapatita pura será $a = 0.9422$ nm y para $c = 0.6880$ nm. α y $\beta = 90^\circ$, $\gamma = 120^\circ$. Para el OCP $a = 1.9715$ nm, $b = 0.9534$ nm, $c = 0.6839$ nm. En el caso del OCP, $\alpha = 90.13^\circ$, $\beta = 92.19^\circ$, $\gamma = 103.36^\circ$.⁴

La fase monoclinica posee un potencial significativo en cuanto a efectos bioeléctricos necesarios para el crecimiento de los cristales. Tanto la forma hexagonal como la monoclinica son el resultado de la acomodación de un estado con baja energía libre. La forma monoclinica es menos soluble que la forma hexagonal y tiene forma casi hexagonal. Cuando los cristales son observados en sección transversal no muestran una forma completamente hexagonal, sobre todo en la dirección [001] con ángulos de reflexión entre 57-65° para [100], [110], [010] y [100].

El número de átomos por celda unitaria puede establecerse mediante el producto del número de átomos por punto de red multiplicado por el número de puntos de la celda unitaria. Cada esquina constituye 1/8 de punto, las caras 1/2 y las posiciones centradas en el cuerpo equivalen a 1 punto.¹⁰⁷ La celda unitaria de la hidroxiapatita contiene 18 iones: 4(Ca²⁺)(I), 6(Ca²⁺)(II), 6(PO³⁻4), 2(OH)²⁻.¹⁰⁸ De las direcciones cristalográficas la [0001] es la más estudiada, la cual posee 3 sitios atómicos principales: 1. Calcio I, 2. Un fosfato, 4 O, un Ca I en la posición de Ca II, 3. 2 iones hidróxidos.

Dirección [1213] : en el primer sitio existen 2P, un calcio en la posición de Ca I y 3 O. En el segundo sitio : 3 Ca, uno en Ca I y 2 en Ca II.

[1210] : hay superposición de un P, un calcio II y un ion hidróxido o dos tipos de estructuras túneles que siempre ocurren por pares.

[1100] : 3P, un Ca II y 3O con cierta cantidad de Cl.

[4510] : 3 Ca II, 3P, 6O y un ion hidróxido. Sitio2 : dos Ca y 4 O.¹⁰⁹

El EDH tiene correspondencia en estas cinco direcciones con la HA, esta correspondencia fue observada por primera vez por Elliot en 1973, con una resolución de 0.25.¹¹⁰

Tres apatitas son estructuralmente muy semejantes : la fluoroapatita, la cloroapatita y la hidroxilapatita. De la fluoroapatita a la hidroxilapatita, a se incrementa pero c no cambia, mientras que en la cloroapatita, disminuye en a y c se incrementa en longitud. Las tres

apatitas tienen morfología hexagonal y monoclinica. La diferencia radica en sus diferencias de tamaño en los triángulos de calcio. La distancia Ca-F en la fluoroapatita es de $2.288 + 0.009 \text{ \AA}$ mientras que en la hidroxilapatita es de $2.355 + 0.009 \text{ nm}$. En las tablas internacionales de rayos X para la cristalografía, la distancia Ca-F ha sido establecida en 2.230 y 2.241 nm . Estas distancias interatómicas de las apatitas fueron descritas por primera vez por R.A. Young y J.C. Elliot en 1966, encontraron que la distancia entre los calcio es de 2.35 nm , del calcio al oxígeno es de 2.38 nm , del calcio al hidrógeno es de 2.70 y del hidrógeno al calcio 3.17 nm . El volumen de la celda unitaria de la hidroxilapatita es de 52.13 (nm)^3 , de la fluoroapatita 52.9 (nm)^3 y de la cloroapatita 54.52 (nm)^3 ""

En cuanto a las CDL, se compone de fosfatos de calcio, cuya fórmula es $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$, es decir (OCP). Este compuesto pertenece al sistema triclinico, con grupo espacial P1(fig.III.1 g)². Su espectro y su imagen pueden observarse en la fig.III.1 h

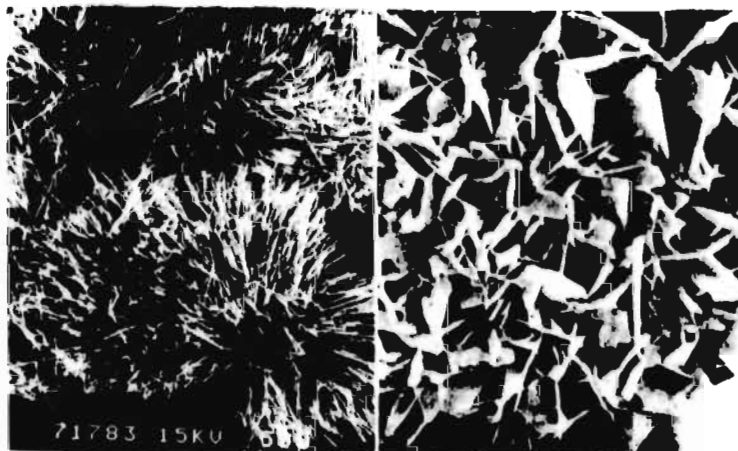


Figura III.1. MET. g) Microrradiografías del fosfato octocálcico [OCP].(Le Geros Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine 1991).

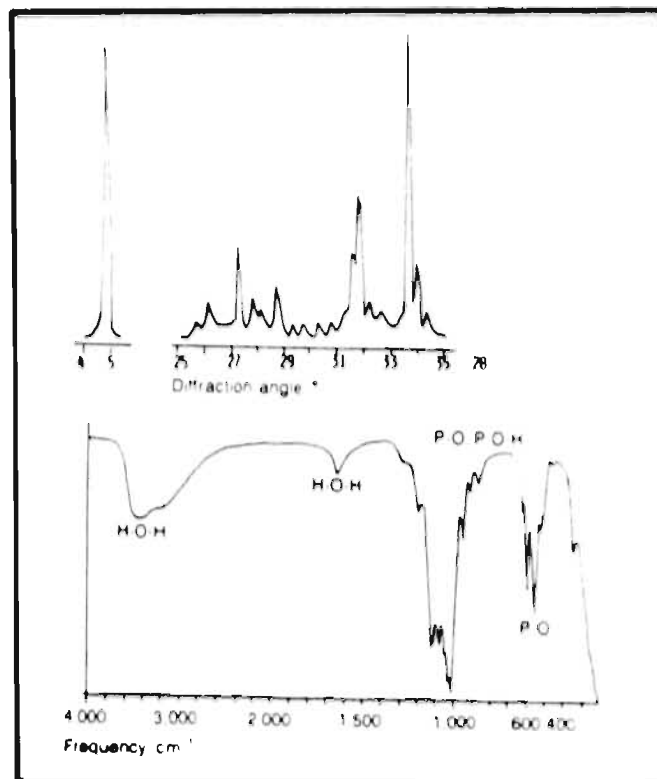


Figura III.1. h) Difractogramas de rayos X. i) Espectro de infrarrojo del fosfato octocálcico.

3.1.3 IRREGULARIDADES DE LOS ARREGLOS ATÓMICOS

Todos los materiales poseen irregularidades llamados defectos. Estas irregularidades son de nivel atómico. Existen tres tipos básicos de defectos en una red: los lineales (dislocaciones), los puntuales y los de superficie ¹⁰⁷

Para el tamaño del grano se utiliza el índice ASTM (grain size number). Es la medida de los granos en un material cristalino, obtenida multiplicando por 100 el número de granos por pulgada cuadrada que hay en una amplificación. Su frontera es el límite entre dos granos y se considera un defecto de superficie. Esto sería lo que corresponde a las vainas del esmalte, que son la frontera entre las franjas de la hidroxilapatita dental.

Se considera vacante el espacio libre que se crea cuando un átomo es retirado de un nodo o punto de red. ¹⁰⁷

Las dislocaciones son de tres tipos: las de tornillo, las de borde y las mixtas' (III.1.3a y b).

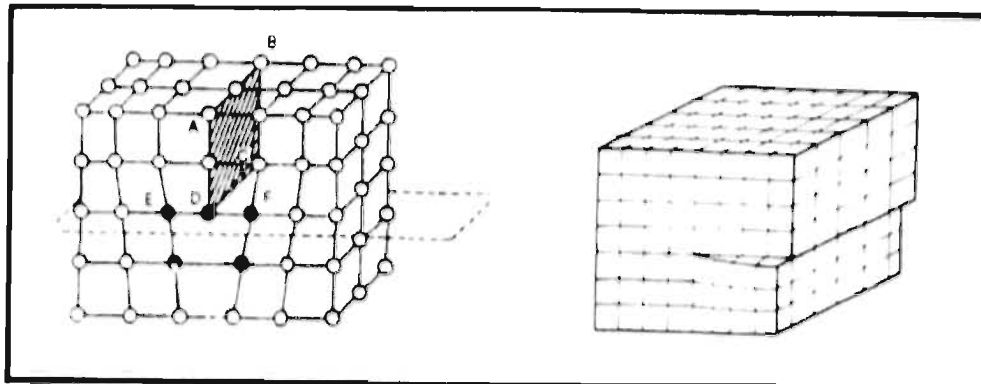


Figura III.1.3 a) Dislocación de borde; b) dislocación de tornillo.

- 1) De borde. Corresponde a un medio plano intercalado en el cristal. Si la dislocación está arriba, se dice que la dislocación es positiva, y si está por debajo, negativa
- 2) De tornillo. Se presenta cuando hay un deslizamiento de una parte del cristal con respecto a otra parte (como un torcimiento).
- 3) Mixta.

El EDH posee gran número de dislocaciones, tanto de borde como de tornillo.¹⁰⁶

La dirección y la distancia en la que se desplaza una dislocación recibe el nombre de vector de Burgers.¹⁰⁶ El movimiento de las dislocaciones ayuda a explicar cómo se deforman los materiales y cómo se incrementa la resistencia mecánica de éstos.

El deslizamiento cruzado ocurre cuando se mueve el plano, encuentra algún obstáculo y se desvía cruzando hacia otra dirección. Cualquier imperfección en la red incrementa su energía interna, los átomos se compactan y existe compresión o son forzados demasiado. Si la dislocación encuentra una zona donde los átomos han sido desplazados, se requiere de un mayor esfuerzo para forzar a que la dislocación pase por una zona de alta energía; por esta razón, el material se vuelve más resistente cuando tiene otros defectos que obstaculizan el paso de las dislocaciones. Los defectos puntuales de una red son la ausencia de uno o varios átomos, se dice que contiene impurezas ¹⁰⁷

El EDH contiene gran número de impurezas, crea un hueco o vacante y representa menos de un punto por millón.¹⁸ Los defectos puntuales distorsionan el acomodo de los átomos vecinos y producen un colapso hacia el defecto, estirando los enlaces entre los átomos, y se produce así un campo de esfuerzo de tracción. Los defectos intersticiales se forman cuando se intercepta un átomo adicional en su intersticio y no en un nodo normal (punto de red). Un defecto sustitucional, como su nombre lo indica, es aquel en que un átomo de red es reemplazado por un átomo diferente. Tanto el defecto intersticial como el sustitucional se presentan como impurezas o pueden ser introducidos como elemento de amalgamación. El defecto de Frenkel es una pareja de defectos puntuales producidos cuando un ion se mueve creando un intersticio y dejando así una vacante. El defecto de Schottkey es un par de defectos puntuales unidos iónicamente. Y para mantener una carga neutral, se deben formar vacancias tanto en el anión como en el catión.¹⁹⁷

3.2 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

El microscopio es un instrumento auxiliar de la observación, herramienta fundamental para la investigación de la microestructura con poder de análisis.² El concepto resolución está relacionado con una de las principales ventajas que tiene un microscopio con respecto a otro, y podríamos definirla como la capacidad de distinguir entre dos objetos separados a una distancia determinada en la realidad.¹⁹ El ojo humano tiene una resolución de 0.1 mm; una lupa, de décimas de milímetro; un microscopio óptico bueno, de 200 nm con aumento aproximado de mil veces; un microscopio electrónico de barrido, de 0.001 nm con aumento aproximado de 10,000 veces; un microscopio de transmisión, 1 nm con aumento aproximado de 200,000 veces, y uno de alta resolución, 0.17 nm con aumento aproximado de un millón de veces. La invención del microscopio óptico se debe al holandés Zacharias Jansen de Middleburg, en 1590, el cual era fabricante de anteojos. Para 1878 Ernst Abbe anunció que el microscopio óptico ya había alcanzado su límite de resolución y que era necesaria una nueva fuente de radiación con longitud de onda más pequeña. Demostró que

el poder de resolución de un microscopio sería la mitad de la longitud de onda empleada para formar imágenes. En 1924, Louis de Broglie dedujo que se podría calcular la longitud de onda esperada para una partícula con cierta masa

De acuerdo con la constante de Planck, una partícula en movimiento es inversamente proporcional a su momento. La naturaleza tiene una doble identidad: es onda y/o es partícula. Toda partícula tiene una longitud de onda y toda onda se asocia con las partículas. Ernest Von Ruka utilizó por primera vez, en 1930, los electrones como fuente de iluminación y construyó el primer microscopio electrónico (fig III 2 a).

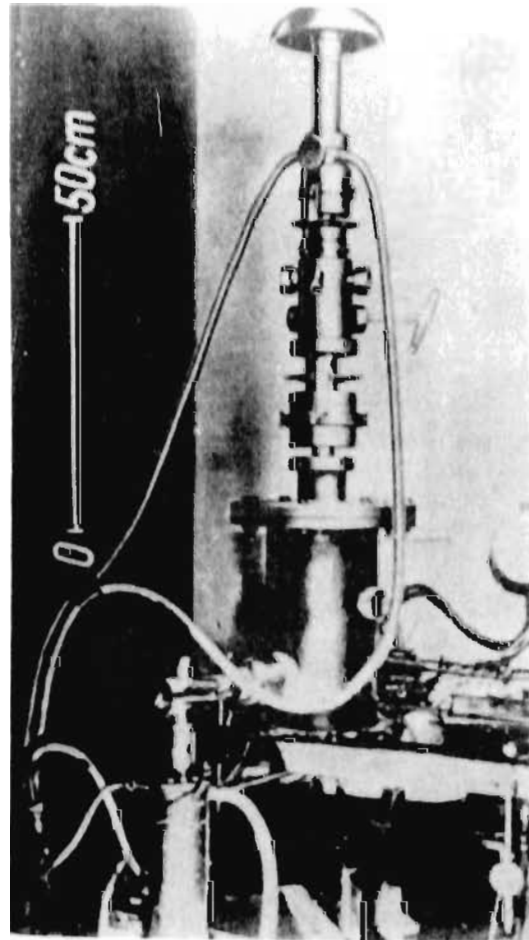


Figura III.2. a) Primer microscopio electrónico, construido por Ernst Von Ruka.

Algunas de las diferencias más importantes entre el microscopio óptico y el electrónico son:

- 1) El microscopio óptico utiliza lentes de vidrio, mientras el electrónico usa bobinas electromagnéticas y por eso se les denomina lentes electromagnéticas.
- 2) El microscopio electrónico trabaja con un vacío de al menos 10^{-7} torr, mientras que en el óptico no es necesario.
- 3) El microscopio óptico tiene una distancia focal fija, y el enfoque y la amplificación se realizan por medio del revólver. En tanto que en el microscopio electrónico el enfoque y la amplificación se realizan al variar la corriente de las bobinas, es decir, de las lentes electromagnéticas.
- 4) El microscopio óptico utiliza lentes tanto convergentes como divergentes, mientras que el electrónico sólo utiliza las convergentes.

3.2.1 MICROSCOPIOS DE ALTO VOLTAJE

La primera generación de microscopios electrónicos apareció en 1932 y fue hasta 1950 cuando se empezaron a utilizar voltajes de 40 a 70 KeV. Más tarde, el máximo voltaje fue de 100 KeV, producido comercialmente. Muestras de 50-300 nm pudieron ser observadas. Posteriormente se producirían generadores con voltajes con mayor seguridad de operación y estabilización del voltaje. Los avances en la electrónica hicieron posible sistemas más compactos, ya que en el pasado se decía que para un voltaje de 500 KeV, se necesitaba de la instalación de todo un edificio (fig. 3.2.b). Afortunadamente, en la actualidad es factible la fabricación de microscopios de 400 Kv, los cuales caben en un gabinete, porque entre mayor sea la energía de aceleración, más corta será su amplitud de onda. Mientras más pequeña sea la longitud de onda, mayor será la resolución.¹⁹

El microscopio de alta resolución del Instituto de Física trabaja con un voltaje de 400 Kv, el cual fue el primero en su clase en América Latina. En la actualidad Japón plantea la posibilidad de tener un microscopio electrónico de ultraalta resolución, el cual trabajaría con un voltaje de 1300 KeV y tendría una resolución de 0.104 nm.

3.2.2 LA IMAGEN

De acuerdo con el mecanismo de Coulomb, la formación de la imagen depende de

- 1 Número atómico de la muestra
- 2 Espesor de la muestra
- 3 Densidad atómica
- 4 Apertura del ángulo
- 5 Voltaje

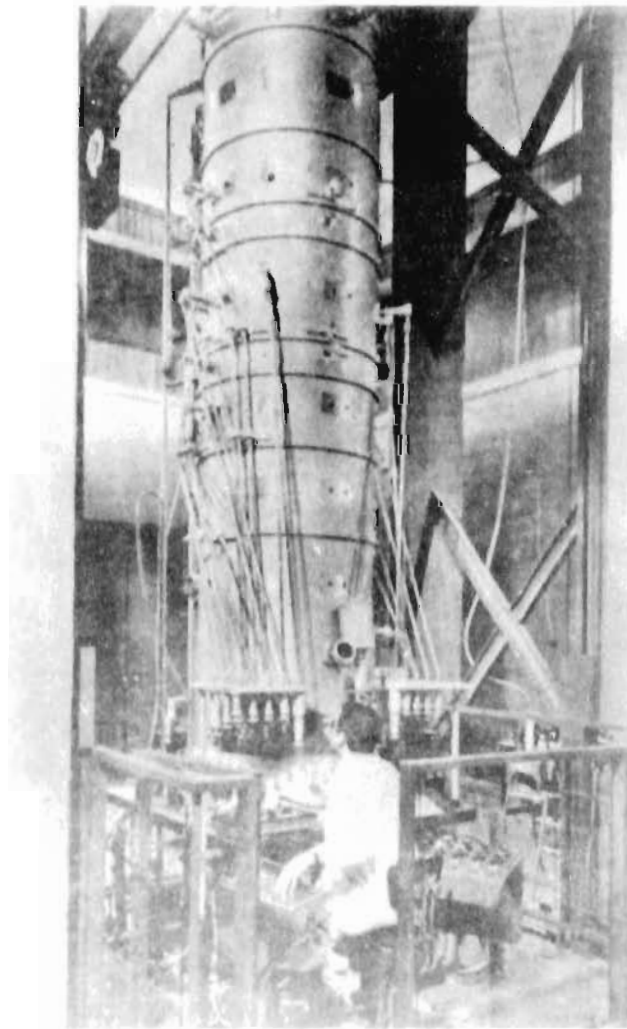


Figura 3.2. b) Antiguamente se necesitaba de grandes espacios para instalar un microscopio electrónico.

Cuando un haz de electrones pasa por la muestra, parte del haz sufre una dispersión elástica (sin pérdidas de energía) y otra parte sufre una dispersión inelástica (con pérdida de energía) la cual puede ser considerable. En la práctica, una buena imagen dependerá en gran parte del voltaje adecuado; entre menos pérdida de energía, mejor será la resolución, entre más gruesa la muestra, mayor pérdida de energía. En algunas ocasiones es necesaria la observación de muestras gruesas, por lo que es preciso que los microscopios sean de alto voltaje. Si bien es cierto que a mayor voltaje mayor resolución, con un voltaje alto no sobrevive el material orgánico. Por eso, nuestro estudio estará enfocado primordialmente al material inorgánico, que constituye 97% del EDH.

Los electrones que se generan en el microscopio son partículas cargadas que viajan con determinada velocidad a través de un campo magnético y con una fuerza perpendicular al plano formado por la dirección de movimiento y la dirección del campo magnético. El electrón es impulsado hacia el eje óptico más una rotación alrededor del mismo.

Onda larga y velocidades de los electrones con energías variables ¹⁴

U (kv)	(nm) λ	v(10 ⁹ cm/s)
40	.00601	1.1216
60	.00487	1.338
80	.00418	1.506
100	.00370	1.644
200	.00251	2.079
500	.00142	2.587
1000	.00087	2.822

3.2.2 MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE TRANSMISIÓN

Consiste fundamentalmente en un cañón de electrones como fuente de iluminación y diferentes tipos de lentes electromagnéticas (fig III 2) Un cable de alto voltaje calienta un filamento de tungsteno hasta la incandescencia, el voltaje oscila entre 2-3 volts, el cual produce una brillantez de 5×10^6 amp/cm La brillantez de un punto de la imagen dependerá de la absorción de luz de diferentes partes de la muestra ¹¹⁸

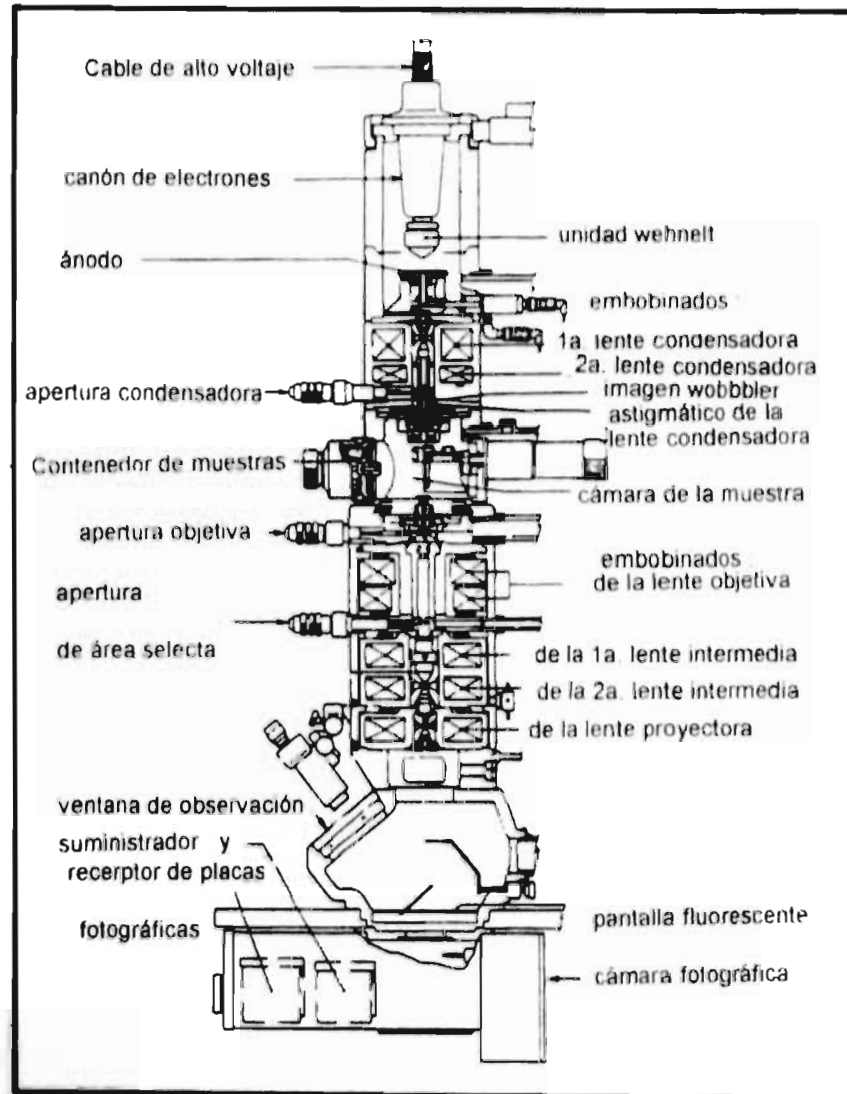


Figura III.2. a) Microscopio electrónico de transmisión, mostrando sus diferentes componentes.

Los electrones producidos por el filamento de tungsteno quedan encerrados en el cañón de electrones, y son acelerados por el ánodo y la unidad Wehnelt. El haz de electrones es condensado por medio de un par de lentes electromagnéticas. Estas lentes poseen una apertura entre 40 a 100 micras y en seguida encontramos el portamuestras. El haz sigue su recorrido hacia las lentes objetivas; con éstas se logra obtener imágenes de la muestra y patrones de difracción. La imagen "común" o de campo claro se forma en el plano imagen y los patrones de difracción en el plano focal (fig.III.2.2).

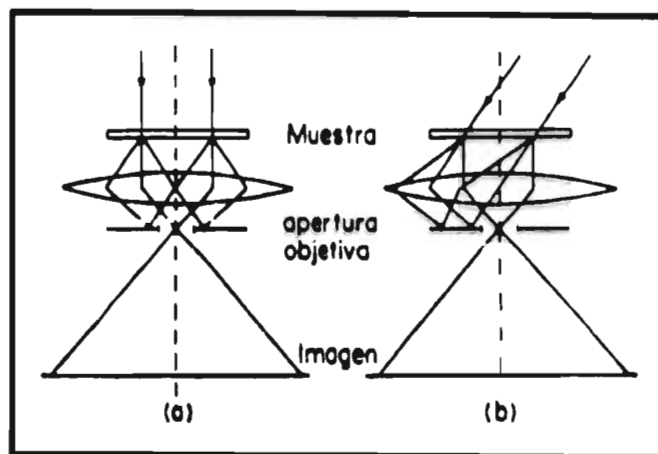


Figura III.2.2. Formación de la imagen en el microscopio de transmisión. a) Campo claro, b) campo oscuro.

El haz continúa su trayecto hacia las lentes intermedias, que junto con las objetivas y las proyectoras amplifican la imagen aprox. 8,000-200,000 x. Debajo se encuentra la ventanilla donde observamos la muestra. En la parte inferior del gabinete encontramos los depósitos de las placas fotográficas y junto a éstos la cámara fotográfica. El microscopio trabaja con un vacío de 10^{-6} o 10^{-7} torr. ¹¹⁸

3.2.4 MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO

El primer microscopio de este género fue construido por Manfred Von Ardenne en 1938. Este tipo de microscopios, en comparación con los ópticos, posee mayor resolución y mayor profundidad de foco. Las señales que no atraviesan la muestra son la base de la microscopía electrónica de barrido" (MEB, fig III.2.4 a); es decir, un fino haz de electrones se enfoca sobre la superficie de la muestra y, debido a las bobinas de reflexión, el haz electrónico barre la muestra de la superficie. Generalmente, si se desea estudiar la topografía de la muestra, se utilizan los electrones secundarios, o cuando se desea examinar la subsuperficie (5 micromicras por debajo de la superficie), se pueden utilizar también electrones retrodispersados con el fin de obtener un mejor contraste de la imagen."

Con MEB podemos lograr imágenes de la morfología y análisis químicos de la superficie y de la subsuperficie, con la posibilidad de obtener información sobre la orientación del cristal, la composición química o el potencial eléctrico del material. Los electrones que quedan dentro de la muestra nos dan información de la conductividad de la muestra.'

3.2.5 MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE ALTA RESOLUCIÓN

La característica principal de este tipo de microscopios (fig.III.2.4.b) es un aumento en la capacidad de resolución a 0.17 nm, es decir, resolución atómica, y sus imágenes consisten de puntos. Posee una lente objetiva de alta calidad que incluye una lente auxiliar que permite disminuir la aberración esférica. En imágenes de alta resolución deben tomarse en cuenta los efectos de aberración y desenfoque de las lentes objetivas para evitar sesgos en la interpretación de las imágenes. Es una de las técnicas que produce información acerca de la forma y estructura atómica de partículas pequeñas. Conforme aumenta la energía de los electrones, la longitud de onda disminuye y la posibilidad de alcanzar resoluciones atómicas aumenta cuando la energía se aproxima a 1 MeV.' Al instrumento que es MEB y TEM, y además posee un detector de rayos X, se le conoce como microscopio electrónico analítico.'"

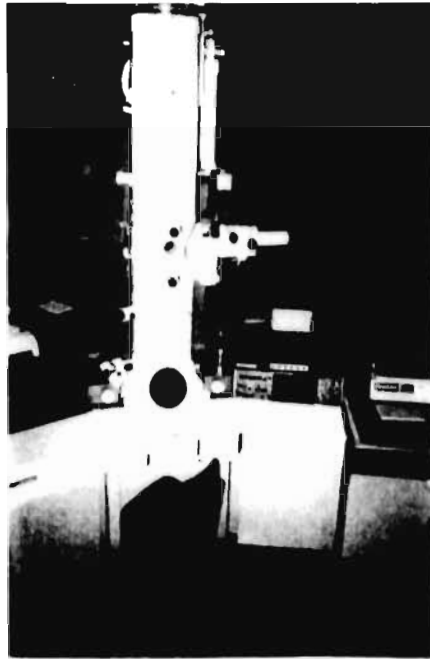
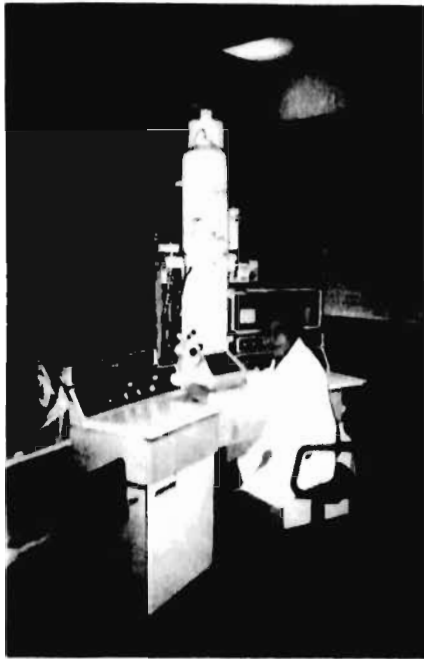


Figura III 2.4 Tipos de microscopios ; a) de barrido, b) de transmisión y c) de alta resolución

3.2.6 TIPOS DE SEÑALES GENERADAS DURANTE LA INTERACCIÓN DEL HAZ ELECTRÓNICO CON LA MUESTRA

Los diferentes diseños de los microscopios dependen de la información que se requiera extraer de la muestra, y su interacción con de los electrones determinará el tipo de análisis.

Existen señales provenientes de los electrones :

1. Retrodispersados
2. Secundarios
- 3 Transmitidos
4. Difractados
5. Auger y rayos X

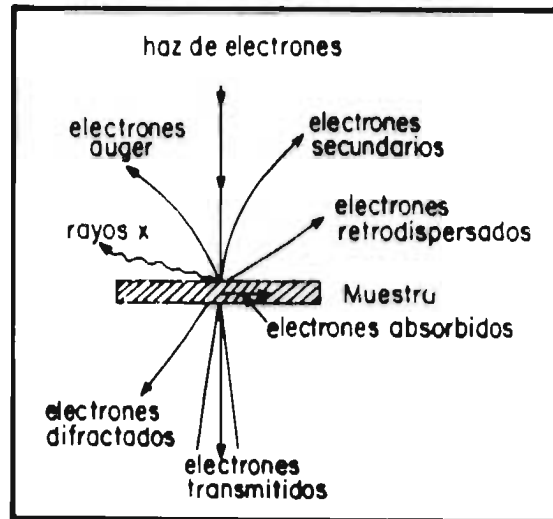


Figura III.2.6 Tipos de señales.

1 y 2. Nos proporcionan información sobre la superficie de la muestra

3 y 4. Dependen de la estructura interna de la muestra y nos dan información de la estructura atómica

5. Dependen de la composición química de la muestra."

Para estudiar la estructura de algún material, como sucede con el EDH, también podemos utilizar técnicas complementarias, como es el campo claro y el campo oscuro. El campo claro se obtiene permitiendo que el haz central de un patrón de difracción forme la imagen y se produzca en el plano imagen de la lente objetiva, como se puede apreciar en la fig.III.2.6 a. El campo oscuro es el resultado de dejar pasar uno de los haces difractados, como se aprecia en la fig.III.2.6 b. Estas técnicas nos permiten conocer aspectos cristalográficos y morfológicos de la muestra, tamaño del grano de la muestra, así como planos atómicos que se producen en el plano focal. ⁵

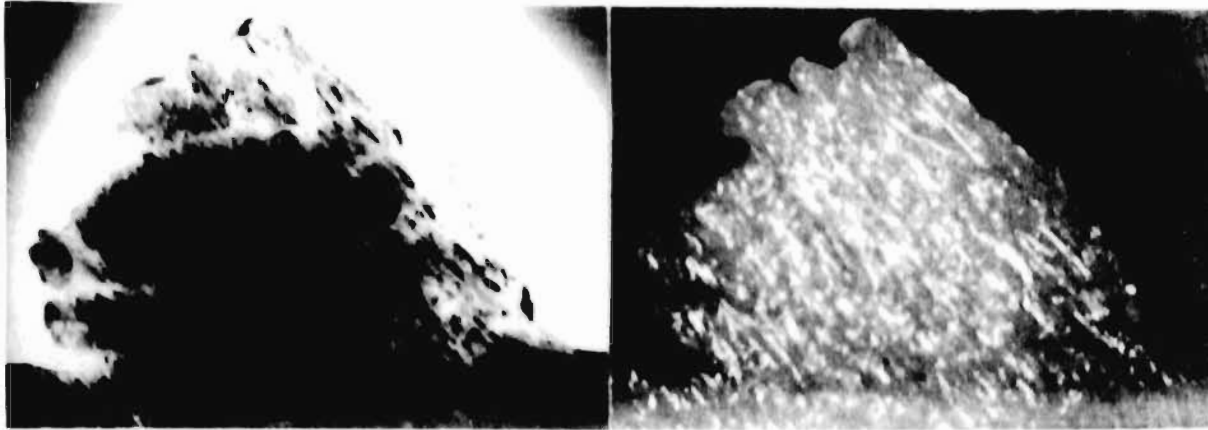


Figura III.2.6 MET. a) Imagen en campo claro del esmalte dental; b) imagen en campo oscuro del mismo biomaterial.

3.2.7 LA DIFRACCIÓN

En México, las técnicas de difracción han alcanzado un papel relevante tanto para la industria como para la investigación científica. Los estudios de difracción son importantes porque pueden utilizarse para la identificación de estructuras no conocidas mediante de las distancias de red del material ; para el caso del EDHI y las CDL, ya se encuentran establecidos estos parámetros de red y fueron descritos en el capítulo 3 sobre cristalografía. Gracias a estos estudios, es posible identificar básicamente: los arreglos espaciales que van del punto central a cada uno de los extremos y las intensidades de estos puntos que van del punto central a los puntos extremos ; también podemos conocer la longitud de los enlaces, las conformaciones y configuraciones de los materiales por medio de las orientaciones del cristal, si existen direcciones preferenciales o defectos en el material."*

Los primeros estudios sobre el comportamiento ondulatorio y la difracción se debieron a Grimaldi (1655), Huygens (1690) y Young (1807), y fueron consolidados por Rowland (1881) y Kirchhoff (1876). La naturaleza de la radiación de los rayos X, precisada por Roentgen en 1895, quedó establecida a través de los experimentos con la difracción. En 1924, L. de

Broglie postularía que un electrón está asociado con un comportamiento ondulatorio. Es decir, se establecería que una partícula se podría comportar ya sea como corpúsculo o como longitud de onda bajo ciertas condiciones. Por lo tanto, se pensó en la posibilidad de utilizar la función de longitud de onda para obtener las intensidades de los haces difractados. Si los electrones, los fotones provenientes de los rayos X y los neutrones se consideran como partículas, tendrán diferentes comportamientos al considerarse cómo es que chocan o colisionan las partículas con el material, qué fue lo que los generó y cómo se detectaron. En cambio si a éstos se les considera por su propagación a través del espacio sin pérdida de energía, las radiaciones pueden considerarse como ondas. En el caso de los rayos X, las ondas se producen cuando un electrón salta de un nivel a otro de energía, sin embargo, en el caso del fotón y del electrón, su origen no se puede precisar y se dice que aproximadamente es la media de la longitud de onda.¹⁹ El patrón de difracción consta de un arreglo de puntos luminosos que, en el caso del esmalte dental, formará una figura geométrica hexagonal, producto del choque del haz de electrones con los átomos de la muestra (figs. III.1 a y b). El fenómeno de la difracción ocurre cuando, al incidir un haz de electrones sobre un cristal, el haz se dispersa. La luz no se propaga en línea recta cuando pasa por cada uno de los extremos de la superficie, sino que se "dobla". a esto se le denomina difracción, fenómeno que se debe a las vibraciones de los distintos puntos de la superficie de la onda. Las ondas se refuerzan unas con otras y eso se llama interferencia constructiva.²⁰

Algunas de las diferencias en los patrones de difracción entre los diferentes grupos de edad del EDH fueron descritos por J. Reyes y col. en 1994; describían que las muestras de esmalte de dientes deciduos con la apertura del área selecta mostraban un semiarco intenso y con orientación preferencial sobre el eje mayor. El esmalte de jóvenes presentaba arcos concéntricos, había desaparecido el plano (002) y también presentaba dirección preferencial. Y se afirmaba que en el esmalte de anciano no mostraba direcciones preferenciales.²¹

3.2.8 LEY DE BRAGG

En todos los fenómenos de difracción existe una relación entre la dirección del haz incidente, la orientación del cristal y la dirección del haz difractado, que es lo que se conoce como ley de Bragg. Esta ley expresa que las amplitudes de dispersión debidas a un número muy grande de centros dispersos, situados en los puntos de red, deben estar en fase perfecta. Los haces dispersados interfieren constructivamente en determinadas direcciones después de que interactúa el haz con la muestra, el ángulo de extensión de la incidencia, entre el haz primario y el secundario, es el ángulo de difracción 2θ (fig III.2.8)

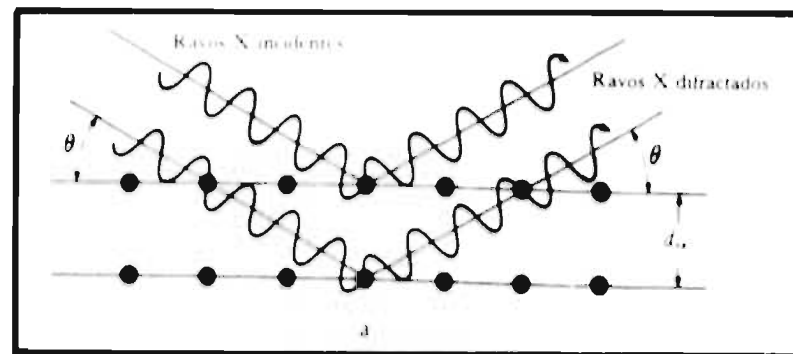


Figura III.2.8 a) Interferencia constructiva.

Para calcular la amplitud de onda difractada en una celda, debemos tomar en cuenta el factor de estructura, que se utiliza para determinar las amplitudes de las ondas difractadas en las diferentes direcciones del cristal, y que se define como la amplitud de la onda difractada por celda elemental en una determinada dirección cuando el electrón difracta en un punto tomado como el origen.¹¹⁹

3.2.9 INDEXACIÓN DE PATRONES DE DIFRACCIÓN

El problema de la indexación consiste en que los datos experimentales sólo son posibles si conocemos las distancias interplanares y la relación entre ellas, a través de los parámetros de red de la muestra analizada

1. Se miden las distancias de un punto a otro, denominados punto R1 y R2, respectivamente, los cuales separan al punto central (haz transmitido) de los dos puntos más cercanos G1 y G2
2. La constante de cámara λ (que se obtiene con el voltaje del microscopio) se convierte a distancias interplanares d_1 y d_2 . Se checan las tablas interplanares y se eliminan todos los planos que se encuentren muy alejados
3. Se mide el ángulo alfa que hay entre los puntos elegidos y se compara con los ángulos de las tablas, y quedan sólo 2 o 3 familias que se acoplan tanto a las distancias como a los ángulos.
4. Se suman los vectores de los planos, se compara el valor obtenido con la distancia del punto central a los puntos G1 y G2, y se eliminan las combinaciones para que quede sólo una.
5. Para seleccionar la dirección del haz, se efectúa el producto vectorial entre dos puntos del patrón de difracción. La dirección perpendicular al plano de red recíproca (la fotografiada) es casi paralela a la dirección del haz, siendo los ángulos muy pequeños. Ya existen programas computacionales que calculan las distancias interplanares, como el MACTEMPAS, ALAEP e INXPAN, que facilitan estos cálculos.

Algunos de los datos interesantes interpretados por la técnica de difracción han sido reportados por Reyes y col. en 1996, donde describen el orden y desorden estructural de la hidroxilapatita, la densidad de los defectos, la modulación estructural y el efecto en el tamaño de los granos.¹⁹

CAPÍTULO IV

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

4.1 ORIGEN DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS

Se trabajó con 15 dientes extraídos en la clínica de exodoncia de la Facultad de Odontología por razones ortodónticas o periodontales y dientes deciduos al término de su exfoliación. Los quince dientes fueron seleccionados de la manera siguiente: cinco dientes de niños al término de su exfoliación, cinco premolares de jóvenes hasta 25 años de edad y cinco dientes de ancianos con más de sesenta años. Ninguno de los dientes presentaba alguna alteración morfológica aparente, no estaban cariados ni obturados. Sólo se tomó en cuenta una sola muestra con caries para ver la disolución que se presentó en el material. Se realizaron aproximadamente 3 cortes por diente, siempre y cuando los dientes no estuvieran muy cóncavos.

Una vez extraídos y lavados con agua destilada, fueron transportados inmediatamente al laboratorio de Materia Condensada del Instituto de Física.

Primero fueron lavados nuevamente tres minutos con agua destilada y se desinfectaron con dos gotas de thymol. Inmediatamente se procedió al corte. Los dientes fueron cortados tanto transversal como longitudinalmente mediante una recortadora marca Jean Wirtz (fig. IV.1) con disco de diamante de 4 por 3 pulgadas de diámetro.

4.2 PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA MEB

El diámetro del corte para las muestras de barrido fue de 2 mm por 4 mm de longitud. Y para transmisión y alta resolución fueron más pequeños que las rejillas que se iban a utilizar. Se realizaron un total de 32 cortes.

Cada corte se pegó en el portamuestras de la pulidora con termoplástico derretido, y ya fría se procedió a desbastarla en la pulidora (fig. IV.2) hasta lograr que quedara plana con terminación espejo.

Los cortes no debían tener rayaduras para que pudieran observarse en el MEB, se grabó con ácido fosfórico por tres minutos, se lavó profusamente la muestra con agua destilada, se

dejó secar y luego se depositó una capa fina de carbón u oro sobre ella en la evaporadora (fig. IV.3) para que la muestra se hiciera conductora

4.3 PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA MET

Las muestras para MET deben ser menores que las muestras para MEB. Primero se procedió a desbastar la muestra grande con la pulidora hasta obtener espesores menores que 150 micras, no debía tener ralladuras y debía pulirse con un paño mojado en alúmina de grano muy fino por un lado, hasta lograr una terminación espejo. Y a partir de este momento, pasaría al dimpler (fig. IV.3.1), con el objeto de obtener muestras con espesores menores que 12 micras y pulidas del otro lado, también fue necesario para la observación posterior desbastar la muestra en forma de cazuela y pulirla con alúmina. Ésto se realizó con un disco delgado que tiene el aparato. El material así procesado se veía casi transparente.

Una rejilla de cobre con un orificio en el centro se adhirió sobre la muestra, y se verificó que la cazuela hecha por el dimpler quedara centrada. La rejilla se pegó con silicón Devcon "5 minutos" y esperamos de 10 a 15 minutos a que quedara bien fija.

Para un desbaste más fino, la muestra se trasladó al dual ion mill (aparato que desbasta iónicamente por capas) el cual puede observarse en la fig. IV.3.2. La finalidad era una perforación pequeña central, necesaria para poder observar las muestras por el microscopio electrónico de transmisión y el de alta resolución. También las muestras deben recubrirse para hacerlas conductoras.

4.4 ANÁLISIS QUÍMICO DE LAS MUESTRAS

Realizar microanálisis de los materiales es fundamental para conocer el tipo de elementos con que cuenta el material, dónde y cómo se encuentran éstos organizados.

Existen cuatro técnicas principales para efectuar microanálisis, tanto cualitativa como cuantitativamente. La primera es la microsonda electrónica, que usa dos tipos de espectrómetros: el de dispersión de energía (EDS) y el de dispersión de onda (WDS). El EDS que utilizamos usa un detector para muestras sólidas, que al interactuar con los rayos X (radiaciones electromagnéticas entre 0.05 y 125 KeV) produce un pulso eléctrico proporcional a la energía de los rayos X. Si se conoce el número de pulsos y su intensidad, puede medirse la energía de los rayos X y la composición química de la muestra, ya sea en

forma de polvo o de pastilla ; detecta desde el Na con peso atómico de 11 hasta elementos muy pesados. El WDS posee menores ventajas que el EDS, sobre todo en cuanto a su resolución, de 200 en EDS a 10 eV en WDS. La segunda técnica es la espectroscopia de electrones Auger : recoge y cuenta los electrones Auger emitidos dentro de una banda de energía de átomos del sólido. La tercera es la espectroscopia de emisión iónica, que mide la razón carga/masa de los iones secundarios. La cuarta técnica es la microsonda láser, la cual sólo detecta elementos químicos con peso atómico mayor que 10.

El análisis utilizado para el análisis estructural del EDH se hizo por medio de espectroscopia por pérdida de electrones (EELS: electron energy loss spectroscopy), método auxiliar para la detección de electrones ligeros, espesor de la muestra, tipo de enlace atómico que constituye la estructura. Este análisis se realiza en el TEM y puede realizarse por dos métodos: a partir de la imagen o por medio de la difracción explicada en la sección 3.2.7.

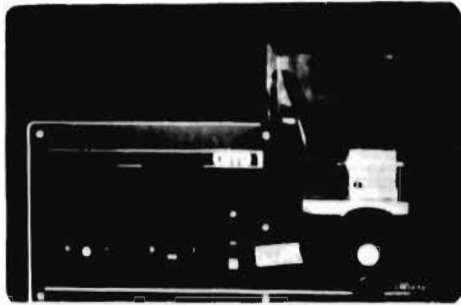


fig IV.1 Recortadora

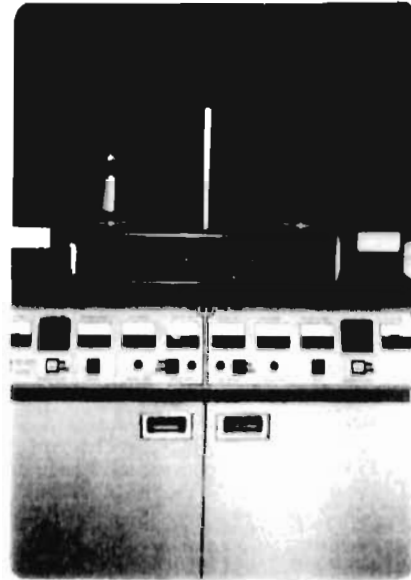


fig IV 3 2 Dual ion mill

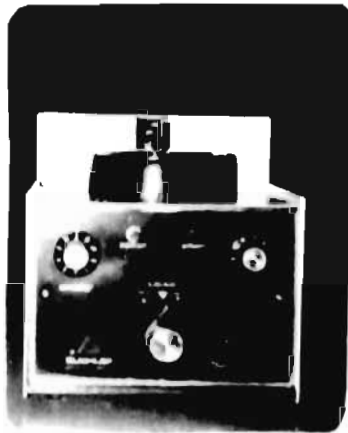


fig.IV 2 Pulidora



fig.IV 3 Evaporadora

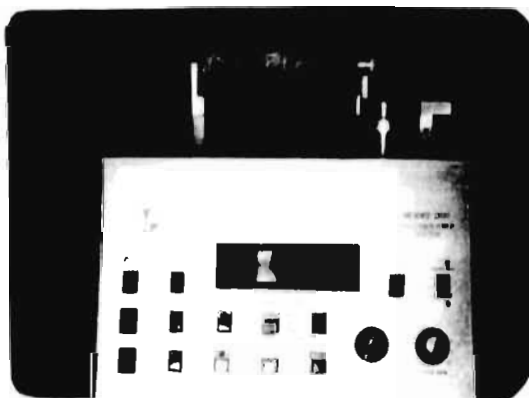


fig.IV.3.1 Dimpler

CAPÍTULO V

RESULTADOS

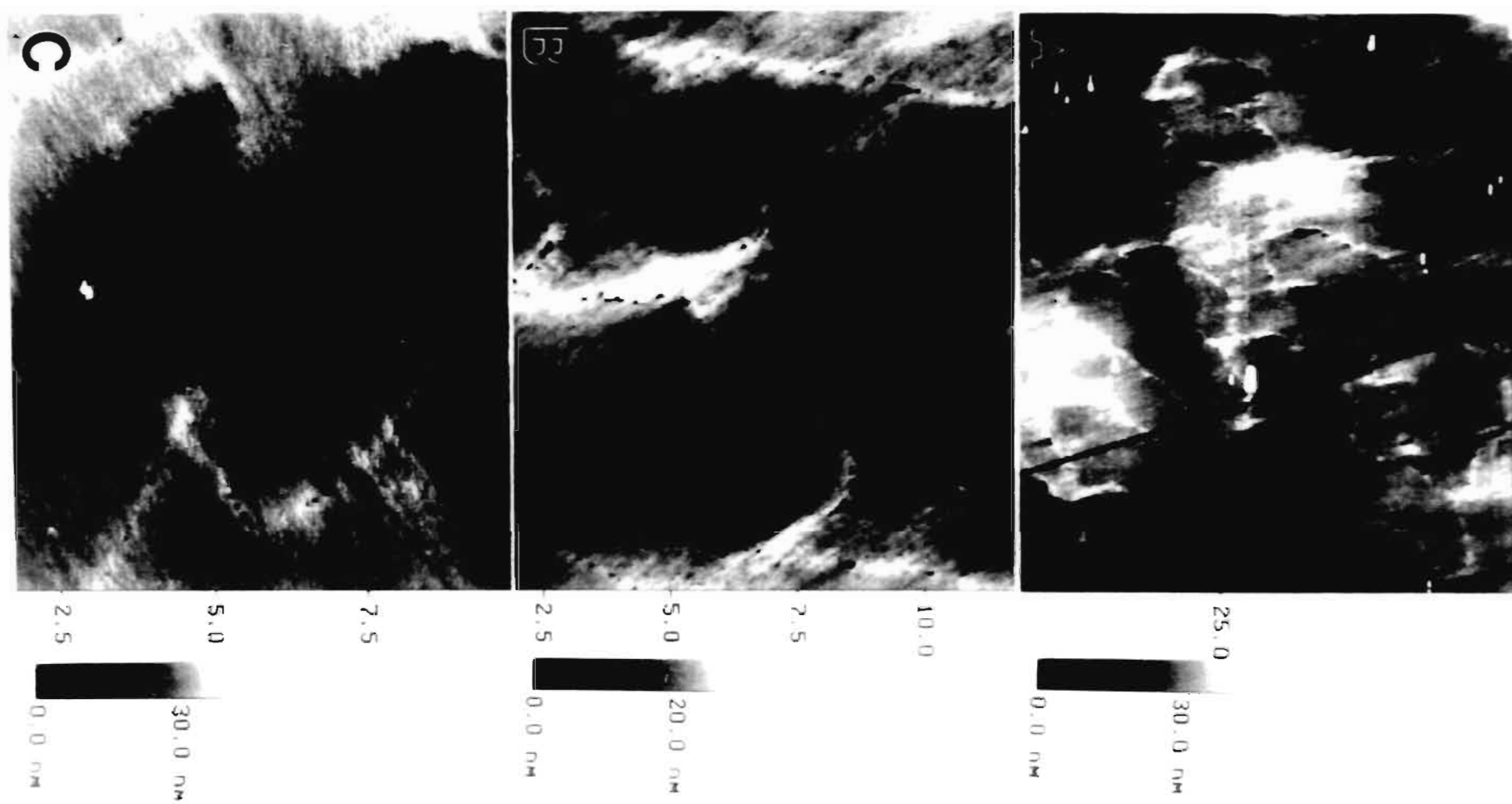
En este capítulo se presentan los resultados obtenidos de los análisis tanto estructurales como químicos realizados en el EDH mediante diferentes técnicas

Las muestras fueron observadas por microscopía electrónica de transmisión y de barrido, así como por técnicas de análisis de rayos X. Con el uso de estas técnicas en sus versiones más modernas, nos permitió obtener mayor información sobre las características estructurales del esmalte dental

5.1 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO DEL ESMALTE DENTAL

La microscopía electrónica de barrido nos permitió observar las unidades estructurales básicas del EDH, conocidas como prismas o varillas. Éstas se observan en las figuras 1 de la página 2, en donde además se puede observar la superficie del esmalte a baja amplificación (fig. 1 a, b) y los cambios de contraste a medida que se aumenta la amplificación. Los prismas o varillas están altamente calcificados y los separa una pequeña capa de material orgánico llamada vaina. Estas vainas se muestran en las figs. 1.5 e y f, donde la zona vacía que rodea al prisma fue originalmente ocupada por material orgánico. El espesor del prisma es de aproximadamente 5 micras, variando cerca de 1-3 veces en la superficie exterior con relación a su tamaño en la unión amelodentinaria. Los prismas también se observaron por microscopía de fuerza atómica (fig. V), en donde se puede apreciar que el contraste no cambia mucho respecto a lo observado en las imágenes de microscopía electrónica de transmisión. En este caso, no fueron grabadas por ácido fosfórico, por lo cual el material orgánico todavía se encuentra rodeando a los prismas y no existen concavidades grandes, como en el caso de la microscopía electrónica de barrido (fig. 1 a y b).

Figura V Las imagenes tomadas por microscopia de fuerza atómica muestran todavia su material organico alrededor de los prismas



5.2 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN DEL ESMALTE DENTAL

Al observar los prismas por MET, se comprueba que están formados por un conjunto de granos nanométricos, como se observa en la fig.III.2.6 a y b. Estos granos están formados por celdas unitarias de HA, lo cual se confirma por los patrones de difracción obtenidos. En las figs.III. se presentan los patrones de difracción de los granos cristalinos. La fig. III a muestra el patrón de difracción producido por un conjunto numeroso de granos, el cual al ser indexado presenta las distancias interplanares de la HA. La fig.III b presenta el patrón de difracción producido por un solo grano del esmalte dental. Al indexar estos patrones de difracción, se encuentra que son consistentes con una celda unitaria hexagonal de dimensiones $a = 0.943 \text{ nm}$ $c = 0.6881 \text{ nm}$, que corresponden a la forma hexagonal de la hidroxiapatita. En la fig.III.1.a se muestra la celda de la HA, y la distribución en ella de los átomos de calcio, fósforo, oxígeno e hidrógeno. La forma en que se apilan las celdas unitarias de la HA para formar los granos del esmalte dental se presenta en la fig.III 1 d.

Como se comentó anteriormente, los granos del EDH presentan, como parte de su contraste en las micro-radiografías de MET, una línea en su parte central, la conocida línea oscura. La dependencia de esta línea oscura respecto al desenfoque se muestra en la fig.II.2, en donde también se observa el grano del esmalte dental por microscopía electrónica de alta resolución en la fig.V.I.a, tiene presente la línea oscura, sin embargo, en la fig.V I.b esta ha desaparecido.

El contraste que presenta la CDL en las imágenes de microscopía de alta resolución puede mejorarse o incluso eliminarse por técnicas de procesamiento de digitalización de imágenes. Esto se muestra en la fig.V.I en donde la técnica de procesamiento de digitalización de imágenes se ejemplifica. En la fig.a se muestra una porción del grano del EDH en alta resolución.

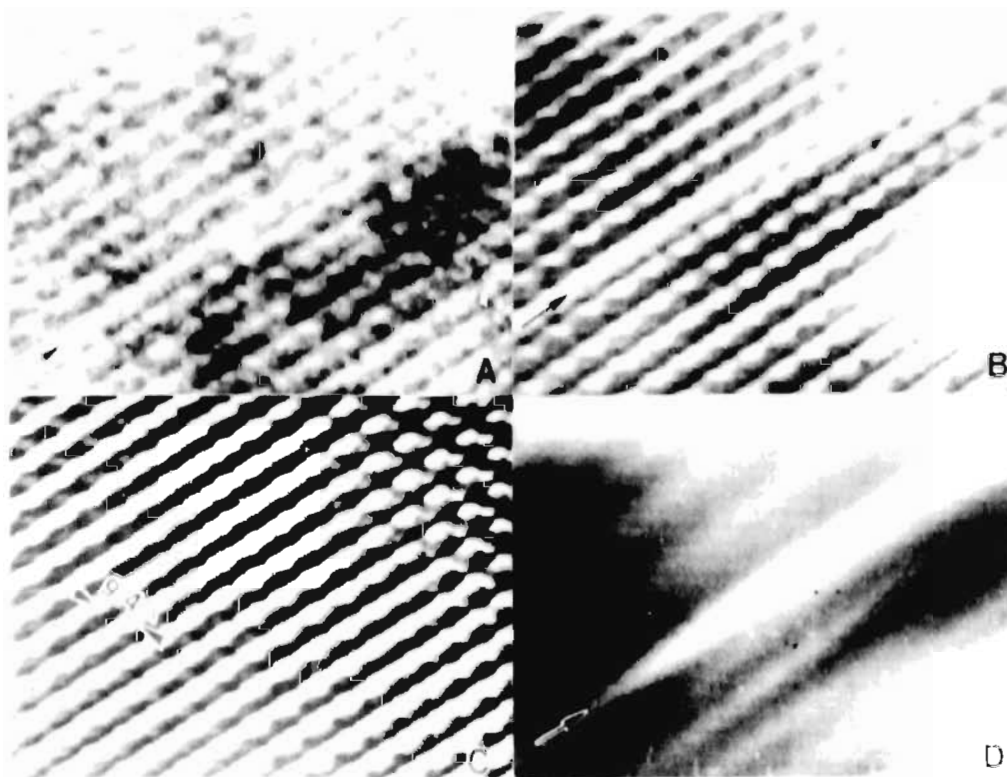
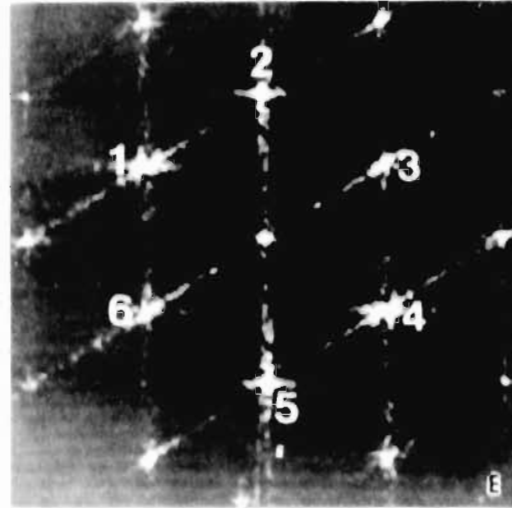


Figura V 1 Procesamiento digital de la imagen. Los puntos del patron de difraccion de e⁻ puede ser mejoradas en a y b ; c) eliminación de la linea oscura. d) dejar contraste de la linea

En la figura V.1 e, la imagen fue procesada por medios ópticos y se obtuvo su patrón de difracción, cuyos puntos pueden ser manipulados de tal forma que se puede mejorar el contraste de la imagen (fig.V.1 b) o incluso eliminar la imagen de la CDL (fig.V.1 c) o bien dejar únicamente el contraste de la CDL (fig.V.1.d). De esta manera, con la técnica de procesamiento de digitalización de imágenes el contraste de la CDL puede realzarse y mostrarse con más detalle su estructura, como lo muestra la fig.V.2., en donde se ha señalado con flechas la posición de la CDL.

5.3 ANÁLISIS QUÍMICO DEL ESMALTE DENTAL

El análisis químico del EDH, realizado por rayos X con la técnica de polvos, nos muestra que la estructura de éste se compone de HA de una forma homogénea. En la fig V.3.1 observamos el espectro obtenido por espectroscopia de división de energía de rayos X (EDS), el cual nos muestra los elementos principales de la HA. En este espectro también se muestran algunos elementos adicionales, como sodio, magnesio, aluminio y silicio. Esto nos demuestra que el esmalte dental está formado por una HA impura, es decir, porque contiene varios elementos sustitucionales. Debemos mencionar aquí que la concentración de carbono se debe principalmente a la película delgada con la cual se cubrió la superficie del esmalte para hacerlo de conductor y poderlo observar por microscopía electrónica.

La distribución de todos los elementos presentes en el esmalte dental se muestra en la gráfica 1.

Otro modo de operación de la señal obtenida por (EDS) es la posibilidad de obtener la imagen de la muestra utilizando solamente los rayos X de un solo elemento contenido en ésta. A este modo de operación se le conoce como mapeo químico. En la fig.V.3.2 se muestran los mapeos químicos obtenidos para diferentes elementos del EDH.

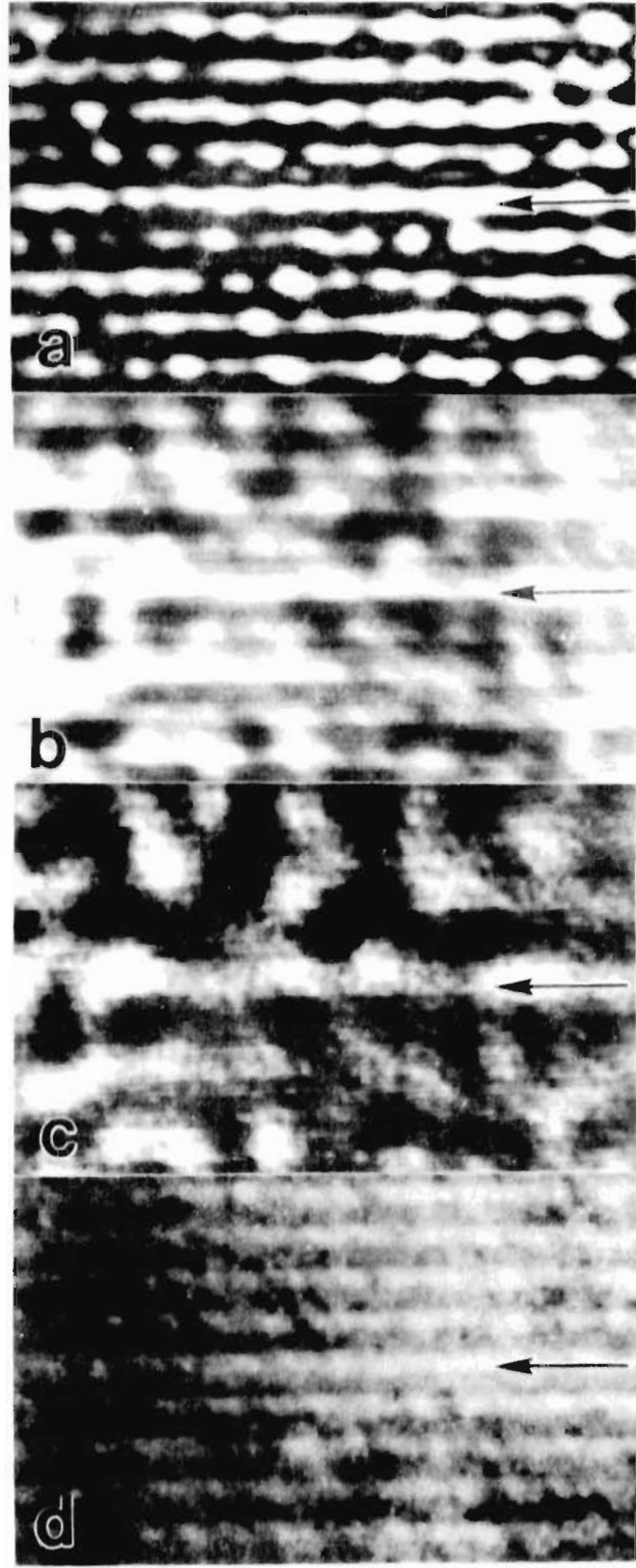


Figura V 2 La digitalización de esta imagen permite realizar la línea obscura para su mejor observación

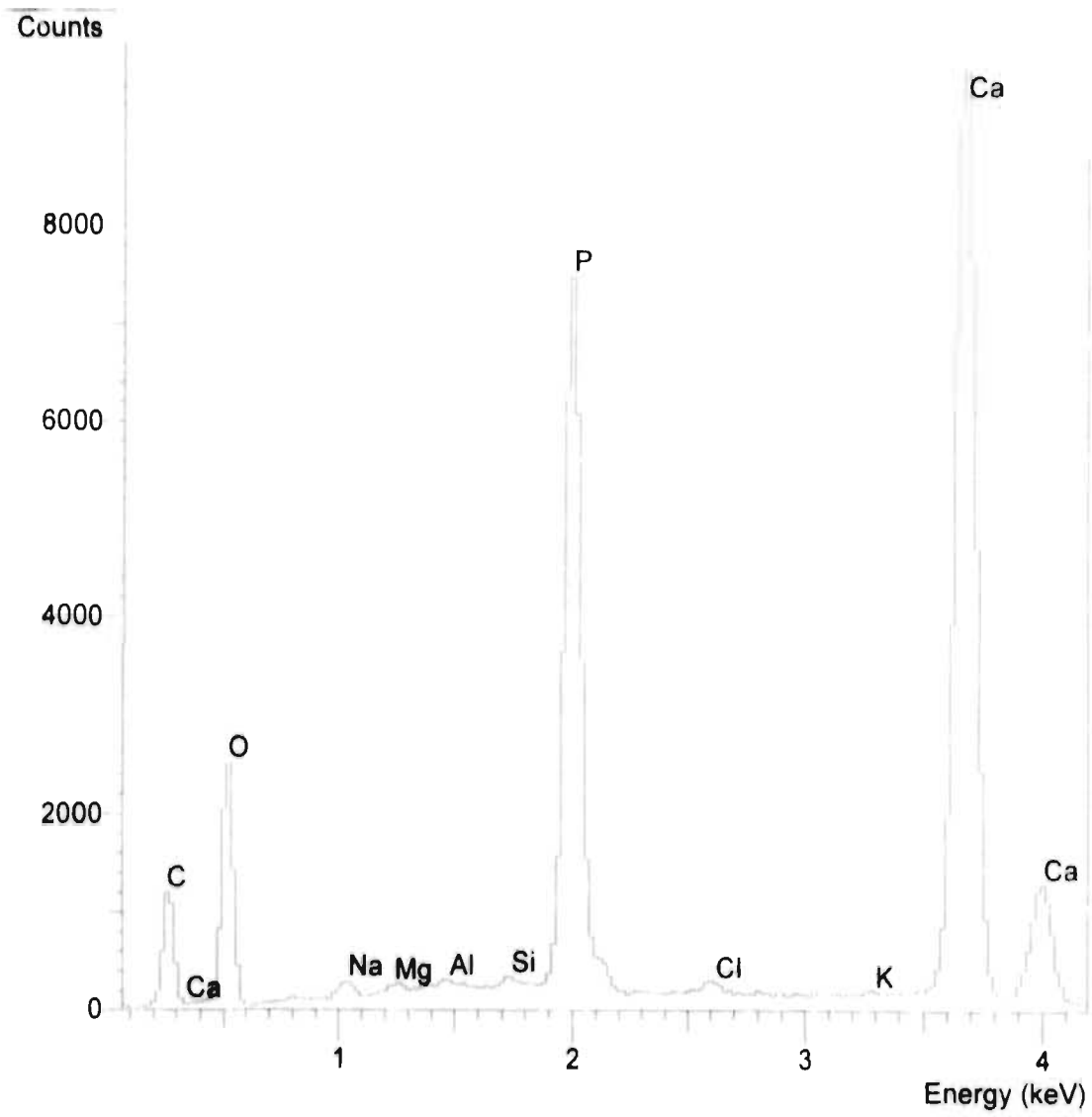


Figura V 3 1 . (EDS) En el espectro obtenido por rayos X, muestra que el esmalte es una hidroxiapatita impura

DISTRIBUCION DE LOS ELEMENTOS QUIMICOS
DEL ESMALTE DENTAL HUMANO

Facultad de Odontología e Instituto de Física.

U N A M. 1996



└ P 13.35%

└ Cl 0.33%

└ K 0.19%

└ Ca 39.27%

└ O 40.40%

Elmt	Apparent Conc.	Stat. Sigma	Inten Corrn.	Std Corrn.	Element %	Sigma %	Atomic %	Compound	Compound %
Na K	1.281	0.132	0.722	0.97	0.82	0.04	0.85	Na ₂ O	1.10
Mg K	0.372	0.094	0.704	0.98	0.24	0.03	0.24	MgO	0.40
Al K	0.391	0.094	0.811	0.98	0.22	0.02	0.20	Al ₂ O ₃	0.42
Si K	0.284	0.109	0.912	0.98	0.14	0.03	0.12	SiO ₂	0.31
P K	52.154	0.375	1.291	0.99	18.56	0.06	14.36	P ₂ O ₅	42.52
Cl K	0.698	0.100	0.906	0.99	0.35	0.02	0.24		0.00
K K	0.458	0.132	1.120	0.99	0.19	0.02	0.12	K ₂ O	0.23
Ca K	85.485	0.464	1.005	0.99	39.08	0.08	23.37	CaO	54.68
O					40.40	0.08	60.52		
Total					100.00		100.00		99.65
									Cation sum

* = <2 Sigma

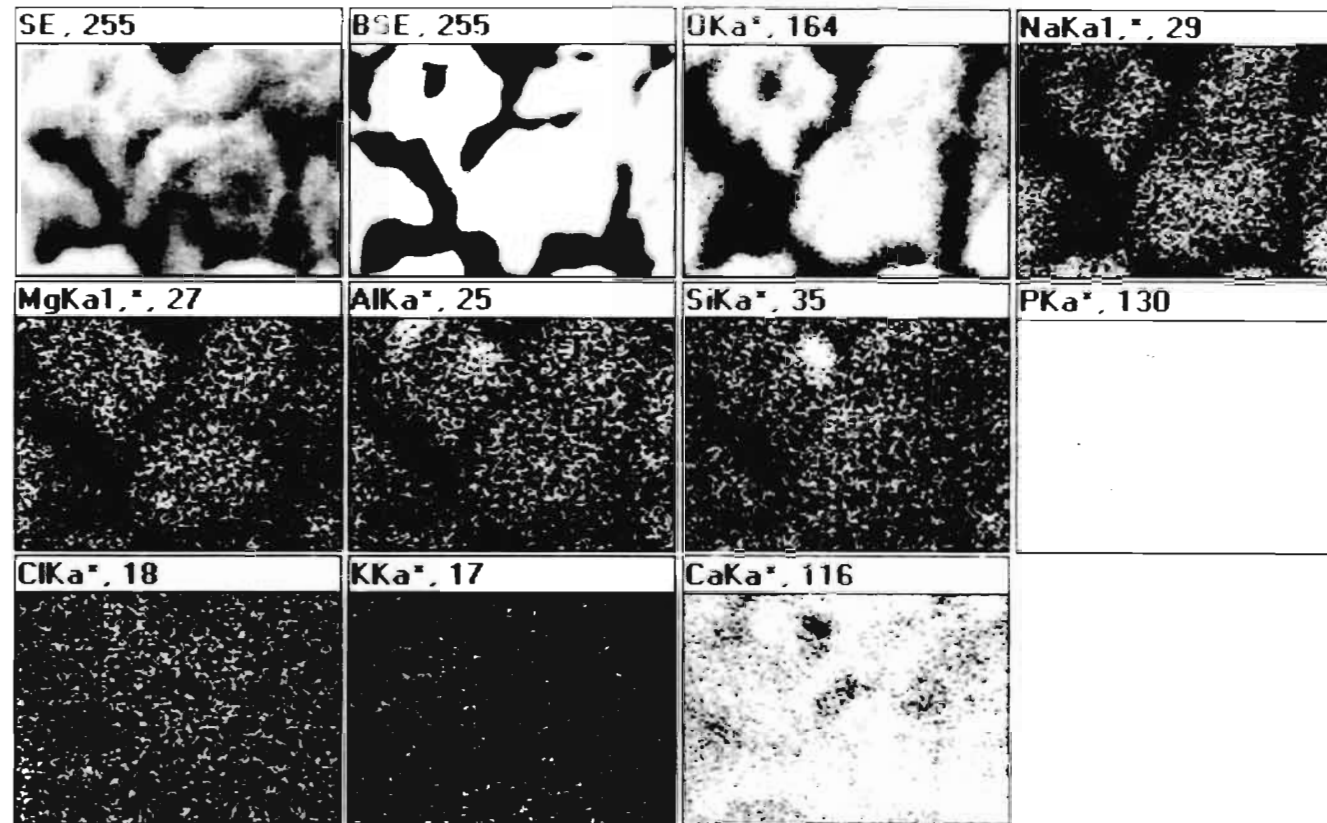


Figura V.3.2 a) Mapeo químico del esmalte dental

Obsérvese la alta homogeneidad de la muestra para el calcio y el fósforo, pero que disminuye considerablemente para el oxígeno. Las imágenes para potasio y cloro son casi imperceptibles, es decir, su concentración es relativamente ínfima. La imagen para silicio nos muestra que éste proviene de granos espureos, posiblemente residuos de la preparación de la muestra. Las imágenes de sodio, magnesio y aluminio nos muestran que éstos son elementos de baja concentración en el esmalte.

El análisis químico por (EDS) se puede realizar también por MET, y de esta manera se obtiene información de diferentes granos que conforman el prisma del esmalte dental. En la fig. V.3.3 se muestran diferentes espectros provenientes de diferentes granos del esmalte. Se puede observar que la concentración de los elementos principales del esmalte tiende a variar de uno a otro. Nótese principalmente la altura de los picos de calcio y fósforo, lo cual significa una variación en la razón Ca/P de 1.67 en comparación con la HA pura, de 1.67.

El análisis químico realizado en diferentes partes de un grano del esmalte dental nos da también variaciones interesantes (fig. V.3.4). Hemos realizado análisis por (EDS) a lo largo de la línea (figs. a y b) y a los lados de ella (figs. c y d) dentro del mismo grano. Sin embargo, aunque existen variaciones presentes en la concentración de los elementos, éstas no son concluyentes, ya que la película de carbón tiende a distorsionar los resultados. A pesar de esto, podemos concluir que los espectros y las concentraciones mostrados en la figura V.4 indican que la línea oscura presenta una mayor concentración de calcio (figs. a y b) que en el resto del grano (figs. c y d). Éste es un resultado importante por una razón doble: nos muestra que la concentración de Ca en la línea oscura es mayor que en cualquier otra parte del grano del esmalte, dando un valor de Ca/P de 1.33 en la línea oscura contra el valor de 1.67 en todo el grano; y, por otro lado, es la primera vez que se obtiene experimentalmente este tipo de análisis químico de la línea oscura.

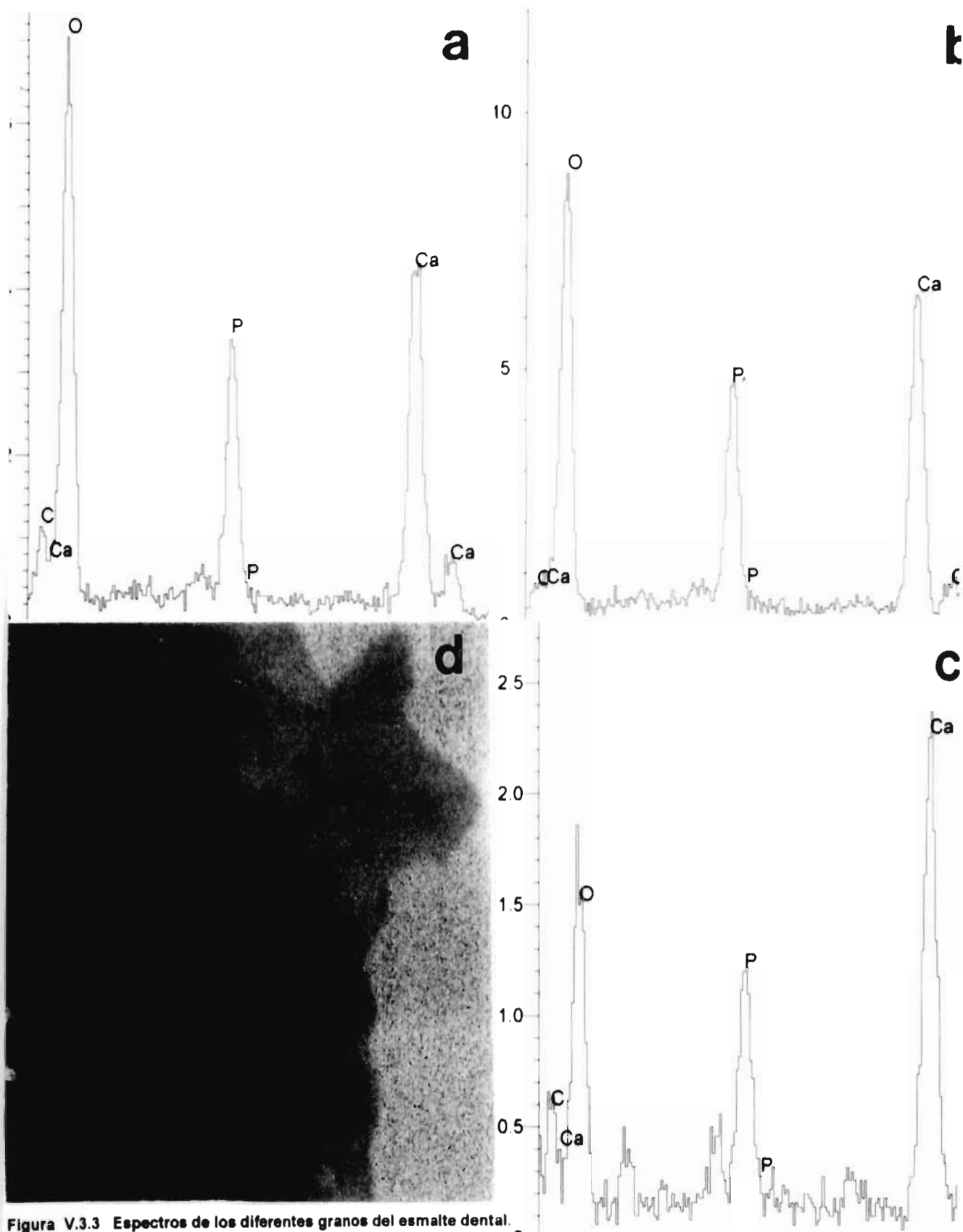


Figura V.3.3 Espectros de los diferentes granos del esmalte dental.

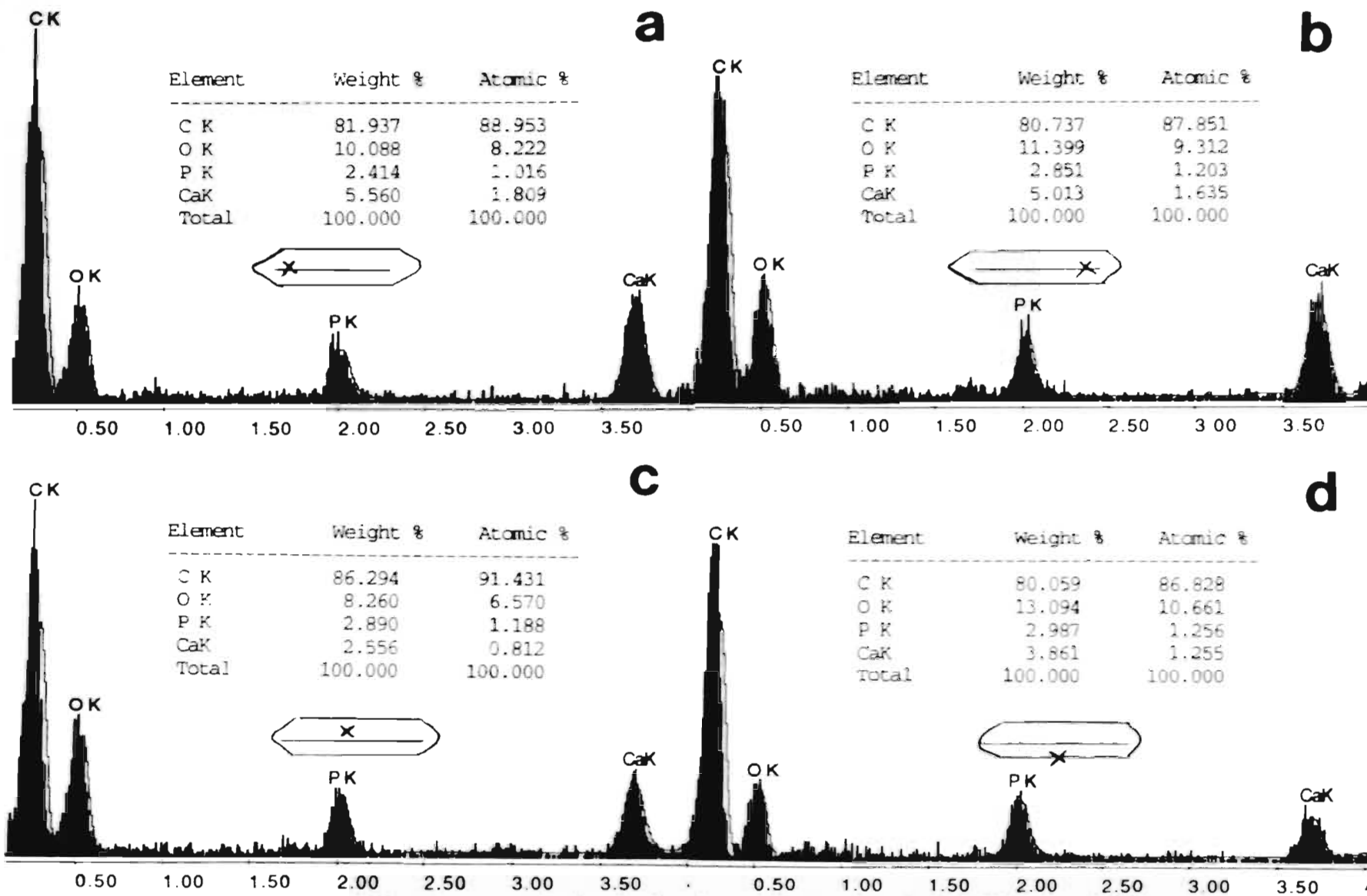


Figura V.3.4. Espectros y concentraciones de elementos en diferentes sitios alrededor de la zona central del

grano que corresponde a la línea oscura.

CAPÍTULO VI DISCUSIÓN

Los resultados del presente trabajo de tesis nos permiten adentrarnos aún más en el conocimiento de la estructura atómica tanto del EDH como la que presentan los granos de la línea oscura. Nos ha permitido obtener información adicional sobre la composición química y el comportamiento de los granos nanométricos del esmalte. En este capítulo comentaremos la importancia de los resultados que consideramos más relevantes y que complementan los obtenidos anteriormente dentro del proyecto "Estudio de la estructura del EDH por microscopía electrónica de transmisión", presentados en trabajos previos^{74,81,122}

Las características estructurales mostradas por MEB no mostraron diferencia alguna en la morfología de los prismas del EDH en los casos de niño, adulto y anciano. Nos permitió analizar con detalle los componentes estructurales del esmalte, como son los prismas, las vainas, las líneas de Retzius, etcétera. Lo mismo sucedió al observarlos por MET, la línea oscura se observa en muestras tanto en sección transversal como longitudinal, indicándonos que este defecto estructural en realidad es un defecto planar y no un defecto lineal.

En lo que respecta a los resultados obtenidos por MET, después de realizar un realce de contraste por procesamiento digital de imágenes, no se encuentra una diferencia estructural entre la posición de los átomos a lo largo de la línea oscura y los átomos de ambos lados de ésta en los granos del esmalte. Esto significa que, independientemente de la diferencia entre fases de la línea oscura y la de los granos del esmalte, los parámetros cristalográficos de ambas fases deben ser idénticos. Y si hay alguna variación entre ellos, debe ser realmente pequeña, casi imperceptible.

Varios autores han interpretado este defecto planar como indicio de la descalcificación que sufre el diente durante el proceso carioso. Sin embargo, las observaciones hechas en el presente trabajo y en los anteriormente reportados se han utilizado dientes sanos y la CDL.

ha estado siempre presente, incluso se ha observado en estadios iniciales del crecimiento del esmalte, además, el análisis químico que hemos realizado a lo largo de la línea nos indica una mayor concentración de calcio que en el resto del grano. Por lo tanto, es más factible que la línea oscura tenga su origen en el proceso de nucleación del esmalte dental durante la amelogénesis y que sea un resultado de la presencia de una fase necesaria para el crecimiento de la HA. Le Geros ha demostrado experimentalmente que los parámetros de la HA y el fosfato octocálcico son altamente compatibles. De aquí que cualquier hipótesis que sobre la nucleación y el crecimiento del esmalte dental se desarrolle debe tomar muy en cuenta la compatibilidad y transformación de fases entre HA y el fosfato octocálcico. Esto hace pensar que el origen de la línea oscura tiene que ver con la nucleación de los granos del esmalte, en que se debe generar una fase rica en calcio, tal vez el fosfato octocálcico, y sobre ésta se deposita la hidroxiapatita creciendo epitaxialmente. Ya que los parámetros no son diferentes, no se presentan defectos alrededor de la línea oscura, ya que los parámetros cristalográficos son casi idénticos.

A pesar de todo lo anterior, no podemos descartar la posibilidad de que a lo largo de este defecto planar se inicie el proceso carioso, puesto que, siendo un defecto de naturaleza, implica que la probabilidad de que se inicie la destrucción del cristal en este lugar sea alta. Incluso en los experimentos de disolución del esmalte dental que se han llevado a cabo, se ha demostrado que este proceso se inicia en el centro de los cristales, lo que apoya la idea de que este plano represente una zona de vulnerabilidad. Experimentalmente, la línea oscura no es fácil de observar, debido principalmente a sus dimensiones nanométricas, a su dependencia respecto al foco, y al contenido de hidrógenos y oxígenos. La dependencia respecto al desenfoque es la causante de que, en las fotografías de MET de los granos del esmalte dental, la línea oscura no se observe en todos los granos. De hecho, durante su observación en el MET es difícil analizarla. Algunas veces no es sino hasta después del revelado de las fotografías que se corrobora su presencia. Por lo tanto, es necesario trabajar en un proceso experimental que se lleve a

cabo mediante la preparación del esmalte dental para su observación con MET y que nos permita realzar el contraste de la línea oscura para alcanzar las condiciones de observación y que podamos efectuar un análisis in-situ de su estructura.

Finalmente, debemos comentar que, aunque los experimentos desarrollados en este trabajo de tesis son significativos y que de hecho es la primera vez que se efectúan, tal vez a nivel mundial, ya que no sabemos de algún reporte que sobre este campo se haya realizado donde se reporte el análisis químico de la línea oscura, no podemos decir que los resultados sean concluyentes. Es necesario seguir realizando experimentos con el objetivo de conocer más sobre la composición química y la estructura atómica de la línea oscura así como del esmalte , ya que aun todavía existen varias incógnitas por resolver.

CONCLUSIONES

Estructuralmente hablando, no existe diferencia alguna entre las posiciones atómicas de los átomos que forman la línea oscura y la de los átomos de la hidroxiapatita en los granos del esmalte. Tampoco se detectó, al menos con la resolución de los equipos utilizados, la presencia de defectos alrededor de la línea oscura. Esto quiere decir que tal vez se dé un crecimiento epitaxial entre la fase que da origen a la línea oscura y la hidroxiapatita.

Además, uno de los resultados obtenidos por medio del análisis químico, por primera vez realizado y que debemos destacar, es la mayor concentración de calcio que muestra el grano del esmalte dental en la zona de la línea oscura. Esto nos indica que la naturaleza de la línea oscura es una fase diferente de la HA; es altamente probable que es el OCP como lo indican los resultados experimentales reportados en la literatura sobre la transformación de fase de la HA.

RECOMENDACIONES DE INVESTIGACIONES A FUTURO

1. La microscopía electrónica en el desarrollo de investigaciones odontológicas
2. Intervención del RNA mensajero en la formación dental
3. Susceptibilidad y estructura atómica de la caries
4. Determinación de la estructura atómica en general de los diferentes tejidos orales
5. Inmunolocalización de proteínas orales
6. Determinación de la función de los carbonatos en el desarrollo dental
7. Analizar la trayectoria de los canales de calcio
8. Establecimiento de los defectos e impurezas que contienen los tejidos orales

BIBLIOGRAFIA

1. Yacamán, M.J., y J. Reyes-Gasga: *Microscopía electrónica. Una visión del microcosmos*, Fondo de Cultura Económica-CONACYT, 1995.
2. Eisberg, R.M.: *Fundamentos de la física moderna*, Ed. Limusa, 1978, 571.
3. Le Geros, R.Z.: *Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine*, Howard M. (ed.), San Francisco, California, 1991.
4. Ten Cate, A.R.: *Histología Oral*, 2a. ed., Ed. Panamericana, 1986.
5. Reyes-Gasga, J.: "La microscopía electrónica y el esmalte dental humano", *Ciencia y Desarrollo*, 1995, 31-43.
6. Millán-Malo, B.: *Difracción de rayos X por el método de Debye-Scherrer para detectar cambios dimensionales pequeños en la celda unidad de los cristales*, tesis, Facultad de Ciencias, UNAM, 1991.
7. Rönholm. "The amelogenesis of human tooth as revealed by electron microscopy II. The development of the enamel crystallite", *J. Ultrastruct. Res.*, 1962, 227-238.
8. Nylen, *et al.*: "Crystal Growth in rat enamel", *J. Cell Bio.*, 1963, 18, 109-123.
9. Frazier, P.: "Adult human enamel: An electron microscopy study of crystallite", *J. Ultrastruct. Res.*, 1968, 22, 1-11.
10. Thoda, H.; Takuma, S.W. Tanaka: "Intracrystalline structure of enamel crystals affected by caries", *J. Dent. Res.*, 1987, 66, 647-653.
11. Thoda, H., *et al.*: "Growth and fusion of apatite crystals in remineralized enamel", *J. Elect. Microsc.*, 1990, 39, 238-244.
12. Náráy-Szabó, "The structure of apatite (CaF) Ca₄ (PO₄)₃" *Zeits, Krist.* 1930, 75, 387.
13. Brés, *et al.*: "High resolution electron microscope and computed images of human tooth enamel crystals", *J. Ultrastruct. Res.*, 1985, 261-274.
14. Brés, E.F., J.C. Voegel and M. Frank: "High resolution electron microscopy of human enamel crystals" *J. of Microscopy*, 1969, 160 (2), 183-201.
15. McLean, J.D., y D.G.A. Nelson: "High resolution N-beam lattice images of hidroxyapatite", *Microm.* 1982, 13, 409-413.
16. Ichijo, T.A.: "On the basic structural features of human enamel crystals", *J. Oral Bio., Quintessence Tokyo.* 1983, 25, 615-634.
17. Kanaya, K., N. Baba, Shinohara y T.A. Ichijo: "A digital Fourier harmonic superposition method for the structural analysis of human tooth enamel obtained by electron microscopy", *Micron Microsc., Acta* 1984, 15, 17-35.
18. Eanes, F.D.: "Chemistry, structure and properties", *J. Dent. Res.*, 1979, 58 (B), 829-834.
19. Cusiner, *et al.*: "Human Amelogenesis. High resolution electron microscopy study of ribbon-like crystal", *Calif. Tissue Int.*, 1991, 51, 259-268.
20. Holcomb, D.W., y R.A. Young: "Thermal descomposition of human tooth enamel", *Calif. Tissue Res.*, 1980, 31, 189.
21. Robin, J.A.C.: "Loss of carbonate during the first stages o enamel caries", *Caries Res.*, 1973, 7, 345.
22. Kay, M.I., R. A. Young, y A. Posner: " Crystal structure of hidroxyapatite", *Nature* 1964, 204, 1050.
23. Brés, E.F., *et al.*: "HREM. Study of irradiation damage in human dental enamel crystals", *Ultramicroscopy*, 1991, 35, 305-322.

24. Warshawsky, H. *et al.*: "The development of enamel structure in rat incisors as compared to the teeth of monkey and man", *Anat. Rec.*, 1981, 200, 371.
25. Johnston, M.J.C., A. Brakdinaronk y Y.C. Reid. "An expanded role of the neural crest in oral and pharyngeal development in oral sensation and perception development in the fetus and infant", Ed Bosma, no. 73-5446, Department of Health, 1973, 37.
26. Kollar, E.J., y G.R. Baird: "Tissue interactions in embryonic mouse tooth germs. I. Reorganization of the dental epithelium during tooth-germ reconstruction", *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 1970, 24, 159.
27. Lumsden, A.G.S.: "Tooth morphogenesis: Contributions of the cranial neural crest in mammals in *toothmorphogenesis and differentiation*", Ed INSERM, Paris, 1985, 29.
28. Ruch, J.V.: "Epithelial-mesenchymal interactions in formation of mineralized tissues *In the chemistry and biology of mineralized tissues*", Ed Ebsco Media, Birmingham, Ala., 1985, 54.
29. Kollar, E.J., y G.R. Baird: "Tissue interactions in embryonic mouse tooth germs. II. The inductive role of the dental papilla", *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 1970, 24, 173.
30. Garant, P.R., y M.I. Cho: "Ultrastructure of the odontoblast, *in the chemistry and biology of mineralized tissues*", Ed. Ebsco Media, Birmingham, Ala., 1985, 22.
31. Kollar, W.E., y A.G.S. Lumsden: "Tooth morphogenesis: The role of the innervation during induction and pattern formation", *J. Biol. Buccale*, 1979, 7, 49.
32. Slavkin, H.C., *et al.*: "The fine structure of the extracellular matrix during epithelio-mesenchymal interactions in the rabbit embryonic incisor", *Anat. Rec.*, 1969, 165, 237.
33. Slavkin, H., C. Zeichner, M. David y M.A.Q. Siddiqui: "Molecular aspects of tooth morphogenesis and differentiation in *Molecular Aspects of Medicine*", Ed. Pergamon Press, Oxford, 1981, 1 (2).
34. Sodek, J., y S.M. Mandell: "Collagen metabolism in rat incisor predentin in vivo: Synthesis and maturation of type I (I) trimer and type V collagens", *Biochemistry*, 1982, 21, 2011.
35. Sawada, T., T. Yanagisawa y S. Takuma: "Epithelial-mesenchymal junction area in an early stage of odontogenesis in macaques", *Adv. Dent. Res.*, 1987, 1, 141.
36. Warshawsky, H.: "The fine structure of secretory ameloblasts in rat incisors", *Anat. Rec.*, 1968, 161, 211.
37. Linde, A.: *Dentin and Dentinogenesis*, CRC Press, Boca Raton, Fla., 1984, vols. 1 y 2.
38. Ruch, *et al.*: "Epithelial-mesenchymal interactions in tooth germs: mechanisms of differentiation", *J. Biol. Buccale*, 1983, 11, 173.
39. Kallenbach, E.F.: "Structure of differentiating ameloblasts in the kitten", *Am. J. Anat.*, 1976, 145, 283.
40. Slavkin, *et al.*: "Sequential time and position of enamel protein expression during embryonic fetal neonatal and early postnatal stages of mouse molar organogenesis", *Proc. Finnish. Dent. Soc.*, 1987, 83, 225.
41. Warshawsky, H., y I.A. Vugman: "Comparison of the protein synthetic activity of presecretory and secretory ameloblasts in rat incisors", *Anat. Rec.*, 1977, 188, 143.
42. Reith, E.J.: "Ultrastructural aspects of dentinogenesis in *Dentine and Pulp: Their structure and reaction*", Symons, N.B.B., Ed. Churchill, Livingstone, Edinburgh, 1968, 19.
43. Weinstock, M., y C.P. Leblond: "Synthesis migration and release of precursor collagen by odontoblast as visualized by radioautography after (3H) proline administration", *J. Cell Biol.*, 1974, 60, 92.
44. Bevelander, G., y H. Nakahara: "The formation and mineralization of dentin", *Anat. Rec.* 1966, 156, 303.
45. Ten Cate, A.R.: "A fine structural study of coronas and root dentinogenesis in the mouse: observations on the so-called Ilvon Korff fibres and their contribution to mantle dentine", *J. Anat.*, 1978, 125, 183.
46. Warshawsky, H.: "The presence of atypical collagen fibrils in EDTA decalcified predentine and dentine of rat incisors", *Arch. Oral Biol.*, 1972, 17, 1745.

- 47 Weinstock, A., M. Weinstock y C.P. Leblond: "Autoradiographic detection of H-fucose incorporation into glycoprotein by odontoblasts and its deposition at the site of the calcification front in dentin", *Calcif. Tissue Res.*, 1972, 8, 181.
- 48 Slavkin, H.C., *et al.*: "Amelogenin gene expression during epithelial-mesenchymal interactions in *The role of extracellular matrix in developments*", Ed. Allan R. Liss, Nueva York, 1984, 221.
- 49 Warshawsky, H.: *Teeth, Cell and Tissue Biology*, 5a ed., L. Weiss (ed.), Elsevier Science, Nueva York, 1983, 607.
- 50 Weinstock, M., y C.P. Leblond: "Synthesis, migration, and release of precursor collagen by odontoblasts as visualized by radioautography after (3H)proline administration", *J. Cell Biol.*, 1974, 60, 92.
- 51 Thomas, H.F.: "The effect of various aires on the extent of the odontoblast process in human dentine", *Arch Oral Biol.*, 1983, 28, 465.
- 52 Thomas, H.F., y R.C. Payne: "The ultrastructure of dentinal tubules from erupted human premolar teeth", *J Dent Res.*, 1983, 8 (62), 532.
- 53 La Fleche, R.G., R.M. Frank y P. Steuer: "The extent of human odontoblast process as determined by transmission electron microscopy: The hypothesis of a retractable suspensor system", *J. Biol. Buccale*, 1985, 13, 293.
- 54 Bonucci, E.: "Fine structure of early cartilage calcification", *J. Ultrastruct. Res.*, 1976, 20, 22.
- 55 Anderson, H.C.: "Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage", *J. Cell Biol.*, 1969, 1, 59.
- 56 Warshawsky, H.: "Formation of enamel and dentin. A Critical Review", *C.R.C. Critical Reviews in Anatomy and Cell Biology*, 1968, 1, 4.
- 57 Warshawsky, H., y K. Josephsen: "The behavior of substances labeled with 3H-proline and 3H-fucose in the cellular processes of odontoblasts and ameloblasts", *Anat. Rec.*, 1981, 200, 1.
- 58 Slavkin, H.C., *et al.*: "Sequential time and position of enamel protein expression during embryonic fetal, neonatal and early postnatal stages of mouse molar organo-genesis", *Proc. Finnish Dental Soc.*, 1987, 83, 225.
- 59 Hauschka, P.V.: "Osteocalcin and its functional domains. In *the chemistry and biology of mineralized tissue*", Ed. Ebsco Media, Birmingham, Ala., 1985, 33.
- 60 McDougall, *et al.*: "Dentine phosphoprotein expression during in vitro mouse tooth organ culture in *chemistry and biology of mineralized tissue*", Ed. Ebsco Media, Birmingham, Ala., 1985, 177.
- 61 Warshawsky, H.: "Ultrastructural studies on amelogenesis in *the chemistry and biology of mineralized tissue*", Ed. Ebsco Media, Birmingham, Ala., 1985, 33.
- 62 Warshawsky, H., y C.E. Smith: "Morphological classification of rat incisor ameloblasts", *Anat. Rec.*, 1974, 129, 423.
- 63 Smith, C.E., y H. Warshawsky: "Movement of entire cell populations during renewal of the rat incisor as shown by radioautography after labeling with H-thymidine", *Am. J. Anat.*, 1976, 145, 225.
- 64 Holland, G.R.: *Nerves in dentine in recent progress in oral biology lisney*, Eds. University of Bristol, 1986, 168.
- 65 Smith, C.E., y Warshawsky: "Movement of entire cell populations during renewal of rat incisor as show by radioautography after labeling with H-thymidine", *Am. J. Anat.*, 1976, 145, 225.
- 66 Smith, C.E.: "Histological and three dimensional organization of the odontogenic organ in the upper incisor of 100 gm rats comparison with the lower incisor", *J. Anat.*, 1975, 142, 431.
- 67 Warshawsky, H., P. Bai y A. Nanci: "Lack of evidence for rhythmicity in enamel development in *tooth morphogenesis and differentiation*", Ed. INSERM, Paris, 1985, 125, 241.

66. Nanci, A., y H. Warshawsky: "Relationship between the quality of -fixation and the presence of stippled material in newly formed enamel of rat incisor", *Anat. Rec.* 1984, 208, 15.
69. Warshawsky, H.: "A light and electron microscopic study of the nearly mature enamel of rat incisors", *Anat. Rec.*, 1971, 169, 559.
70. Symons, N.B.B.: "Globular structures associated with the completion of the enamel matrix in the matrix in the rat", *J. Dent. Res.*, 41, 55, 1962.
71. Kallenbach, E.: "Fine structure of rat incisor ameloblasts in transition between enamel secretion and maturation stages", *Tissue Cell*, 1974, 6, 173.
72. Kallenbach, E., E. Sandborn y H. Warshawsky: "The Golgi apparatus of the ameloblast of the rat at the stage of enamel matrix formation", *J. Cell Biol.*, 1963, #29.
73. Senger, B., E.F. Brés y J.L. Hutchinson: "Ballistic damages induced by electrons in hydroxyapatite (OHAP)" *Philosophical Magazine*, 1992, 65 (3), 665-682.
74. Alcántara-Rodríguez, C.: *Caracterización del esmalte dental por microscopía electrónica de transmisión*, tesis, Facultad de Odontología, UNAM, 1993.
75. Flautre, B., *et al.*: "Evaluation of hydroxyapatite powder coated with collagen as injectable bone substitute: microscopy in rabbit", *J. of Material in Medicine*, 1996, 7, 63-67.
76. Hirai, G.: "Calcification and crystallization in bovine enamel", *J. Dent. Res.*, 1982, 61 (1), 57-59.
77. Catalanos, J., A. Palmon y B.D. Deutsch: "Amino acid secuencia de mayor human amelogenin protein", *J. Dent. Res.*, 1993, 72 (2), 1566-1572.
78. Solomon, C.D.: "Fine structural study on the extracellular activity of alkaline phosphatase and its role in calcification", *Calcif. Tissue Res.*, 1970, 5, 91.
79. Newman and Newman: *The Chemical Dynamical of bone Mineral. University of Chicago.*, 1958.
80. Warshawsky, H.: "Shape of enamel crystals", *Scan. Micros.*, 1987, 1 (4), 1913-1923.
81. Hernández, G.M.J.: *Proceso de disolución in vitro del esmalte dental humano por MET*, tesis, Facultad de Odontología, UNAM, 1994.
82. Joegbloed, J., *et al.*: *Calcif tissue, Res.*, 1975 (19), 109.
83. Voegel, C., y Frank: "Stages in the dissolution of human enamel crystals in dental caries", *Calcif Tissue Res.*, 1977 (24), 19-27.
84. Nelson, D.G.A., G.J. Wood y Barry, J.C.: "The structure of (100) defects in carbonated apatite crystallites: A high resolution electron microscope study", *Ultramicroscopy*, 1986, 19, 253-266.
85. Hammarlud-Essler: "A microradiographic-microphotometric and X-ray diffraction study of human enamel", *Trans. R. School Dentistry*, Stockholm and Umea, 1958 (4), 15-25.
86. Crabb, H.S.M.: "The pattern of progressive mineralization of human dental enamel", *Proc. Roy. Soc. Med.* 1959, 52, 118-122.
87. Brés, *et al.*: "Theoretical detection of a dark contrast line in twinned apatite biocrystals and its possible correlation with the chemical properties of human and enamel crystals", *J. Biophys*, 1986, 50, 1185-1193.
88. Dalcusi, G., y B. Kerebel: "Some ultrastruct aspects of biological apatite and possible role of dislocations", *J. Biol. Buccale*, 1977, 5, 1185-1193.
89. Driessen, *et al.*: "Mineral caries and strontium: Tooth development and caries", Boca Ratón, CRC. PRESS, 1986, 116-126.
90. Le Geros: "Microbeam electron diffraction and lattice fringes studies of defect structures in enamel apatites", *Calcif. Tissue Int.*, 1985, 37, 651-658.
91. Marshall, *et al.*: "TEM study of cental dark line in enamel crystallites", *J. Dent. Res.*, 1981, 60 (10), 773-

92. Warshawsky "External Shape of enamel crystals". *Scanning Microscopy*, 1987, 1 (4), 1913-1923.
93. Dalcusi y Kerebel "High-resolution electron microscope study of human enamel crystallites. Size, shape and growth". *J. Ultrastruct. Res.*, 1978, 65, 163-172.
94. Brown, W.E. "Mechanism for growth of apatite crystals, in: *Tooth enamel*", 1, M.V. Stack y R.W. Fearned (eds), Wright, Bristol, 1965, 11-14.
95. Le Geros, R.Z., R. Kijkowska y J.P. Le Geros "Formation of octacalcium phosphates, OCP. A preliminary report", *Scan Microsc.*, 1984, (IV), 1771-1777.
96. Hirth, J.P., y J. Lothe *Theory of dislocations*, 2a ed., Nueva York, 1982.
97. Le Geros, *et al.* "Scanning electron microscopy and probe microanalysis of crystalline components of human and animal dental calculi", *Scan Microsc.*, 1988, 2, 345-356.
98. Chickerur, N.S., M.S. Tung y W.E. Brown "A mechanism for incorporation of carbonate into apatite", *Calcif. Tissue Int.*, 1980, 32, 55-62.
99. Fowler, B., E.C. Moreno, W.E. Brown "Infrared spectra of hydroxyapatite octacalcium and pyrolyzed octacalcium phosphates", *Arch. Oral Biol.*, 1966, 447-492.
100. Fox, J.L., W.I. Higuchi "Two site model of human dental enamel", *J. Dent. Res.*, 1962, 153, 939.
101. Lazzari, Eugene P. *Bioquímica Dental*, Ed. Panamericana, 236-248.
102. Gray, J.A. "Kinetics of the Dissolution of Human Dental Enamel in Acid", *J. Dent. Res.* 41, 633-645.
103. Staple, P.H. *Advances in Oral Biolog.*, Nueva York, Academic Press. The vol. (1).
104. Silverstone, L.M. "The significance of Remineralization in Caries Prevention", *Ass. Dean for Research*, 157.
105. Nylen, M. "Electron microscope and allied biophysical approaches to the study of enamel mineralization", *J. Roy. Soc.*, 1964, 83, 135-141.
106. Frazier, D. "Adult human enamel. An electron microscopic study of crystallite. Size and morphology", *J. Ultrastruct. Res.*, 1968, 22, 1-11.
107. Askeland, D. *La ciencia de los materiales*, Edit. Panamericana, 1987.
108. Buerger, M.J. *Elementary Crystallography* Library of Congress Catalog Number 1956, 55-9511.
109. Tehuacanero, S. "Técnicas de Procesamiento digital de imágenes", III Congreso de la Asociación de Cristalografía, UNAM, 1996.
110. Ichijo, Y., Yamashita y T. Terashima "Observations on structural features and characteristics of biological apatite crystals", *Bull. Tokyo Med. Dent. Univ.*, 1993, 40, 193-205.
111. Mehmel, M.J., "Über die Struktur des Apatits", *Zeits. Krzt.* 1930, 75, 323.
112. Senger, B., *et al.* "Ballistic damages induced by electrons in hydroxyapatite (OHAP)", *Phil. Magz.*, 1992, 65 (3), 665-682.
113. Elliot, J.C., P.E. Mackie y R.A. Young "Falta nombre del artículo", *Science*, 1973, 180, 1055-1057.
114. Elliot, J.C., y Young "Atomic scale bases for several properties", *Arch. Oral Biol.*, 1966, 11, 699-797.
115. Yacamán, M. J., A. Gómez, D. Romeu y R. Rioja: *Notas de Física*, UNAM, 1981, 4.4.
116. Heimendhal, M.V.: *Electron Microscopy of Materials*, Academic Press, 1980.
118. Reyes-Gasga, J.: *Manual para los usuarios del laboratorio de microscopía electrónica*, Instituto de Física, UNAM, 1987.
119. Hernández, R.: "Técnicas de Preparación de Muestras para MEB y MET", III Congreso de la Asociación de

- Microscopía, UNAM, 1996.
120. Reyes-Gasga, J.: "*Difractometría*", III Reunión Nacional de Difractometría, *Asociación Mex. De Microscopía*, 1996.
 121. Braun, E.: *Arquitectura de sólidos y líquidos*, Fondo de Cultura Económica, 1995.
 122. González, A.M y A. Madrigal: *Análisis estructural y químico del esmalte dental humano por técnicas de microscopía electrónica*, Tesis, UNAM, 1994.
 123. Sasaki, S y Shimokawa : "The amelogenin gene" *Int J Dev Biol*, 1995, 39: (1), 127-133
 124. Brdicka R; Siegllov and aacute.Z.: "The human genome- chromosome Y" *Cas Lek Cesk*,1995,134-24(13):798-800.

CURRICULUM VITAE

NOMBRE : Laura Esther Vargas Ulloa

LUGAR DE NACIMIENTO : México D.F. 12 de enero

NOMBRE DE LOS PADRES : Ignacio Vargas Zayas
Estela Ulloa Paul

ESTUDIOS PROFESIONALES

Licenciatura : Universidad Latinoamericana
Carrera de Cirujano Dentista 1983-1984

Universidad Nacional Autónoma de México 1985-1986

ESPECIALIZACION : Universidad Nacional Autónoma de México 1989-1990
Ortodoncia

MAESTRIA : Universidad Nacional Autónoma de México 1994-1995
Microscopia

EXPERIENCIA DOCENTE : Profesora titular de Ortodoncia
Hospital Infantil "Federico Gómez"
1992-1994

Profesora de Posgrado
Universidad Nacional Autónoma de México 1997.

TELÉFONO : Consultorio 5-59-21-64