



153

Universidad Nacional Autónoma
De México

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
E
INSTITUTO DE FÍSICA**

**ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LA UNIÓN
AMELODENTINARIA EN DIENTES
HUMANOS CON TÉCNICAS
DE MICROSCOPIA
ELECTRÓNICA.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
CIRUJANO DENTISTA**

PRESENTA:

ISRAEL MORALES SÁNCHEZ.

TUTOR Y DIRECTOR: DRA. SANTA PONCE BRAVO.

ASESOR: DR. JOSÉ REYES GASGA.

*10 B0
Santa Ponce Bravo*



FACULTAD DE
ODONTOLOGÍA

CIUDAD UNIVERSITARIA 2000.

274511



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LA UNIÓN AMELODENTINARIA EN
DIENTES HUMANOS CON TÉCNICAS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.**

APROBADA POR:

**Dr. Victor M.de la Rosa Huesca.
Revisor.**

**CD. Victor M.de la Rosa Nieto.
Revisor.**

Victor M de la Rosa Nieto

**MC. Manuel Barajas Rodríguez.
Revisor.**

Manuel Barajas R

**Dr. José Reyes Gasga.
Asesor.**

**Dra. Santa Ponce Bravo.
Tutora y Directora.**

Santa Ponce Bravo

RECONOCIMIENTOS.

Agradezco a Dios, a mis Padres y a la UNAM por igual, ya que sin ninguno de ellos no estaría hoy, en el punto de mi vida en que me encuentro. A cada uno de ellos les doy mi más sincera gratitud por permitirme ser quien soy y ayudarme a serlo.

A Santa Ponce Bravo, que puedo decir, una mujer excepcional y única con quien el destino me ha permitido convivir, amiga y compañera, quien siempre me ha apoyado en mis decisiones y orientado en la toma de ellas. Mujer de exorbitante intelecto, pero aún de mayor corazón.

A la Facultad de Odontología, por haberme mostrado la profesión que amo y enseñarme las grandes satisfacciones y responsabilidades que esta conlleva.

A José Reyes Gasga, amigo y asesor en la elaboración de la presente investigación, así como a los miembros del laboratorio de materia condensada del Instituto de Física: Pedro, Roberto y Carlos quienes se esmeraron en enseñarme el "arte" de la preparación de muestras, así como a Jacquelin Cañetas por sus sabios consejos.

A mis abuelas y a la memoria de mi abuelo Jesús por ser parte de sus *cuidados y perspectivas*. Así como al apoyo de los Morales y los González.

A mis hermanos Cecilia e Iván, les dedico la tesis, diciéndoles que el significado de esta es el esfuerzo de años y años, y la verdad, bien vale la pena.

A todas aquellas personas que por olvido omití y fueron impulsores de mis logros y fracasos, ya que de estos, son de los que más aprendí. A mis amigos, por saber el contexto que esta palabra lleva; y a la vida.... a la vida por ser hermosa y permitirme Dios compartir ésta.

ÍNDICE

I. Introducción	01
II. Antecedentes	03
A. Generalidades	03
B. Odontogénesis	04
1. Lámina dental	05
2. Estadio de Yema o Brote	06
3. Estadio de Casquete	08
4. Estadio de Campana	10
5. Composición Química del Esmalte, Dentina y Unión Amelodentinaria	12
6. Diferenciación de Ameloblastos	18
7. Diferenciación de Odontoblastos	20
C. Técnicas de microscopía electrónica	23
1. Microscopía electrónica de transmisión	25
2. Microscopía electrónica de barrido	27
3. Análisis químico con rayos x característicos	28
D. Planteamiento del Problema	29
E. Justificación	29
F. Hipótesis	30
G. Objetivos	30
III. Material y Métodos	32
A. Procedimiento	33
1. Limpieza y preparación	34
2. Corte	35

3. Pulido	37
4. Desgaste	39
5. Erosión iónica	43
6. Recubrimiento de carbón	46
7. Observación al MET	47
8. Revelado de negativos	48
B. Preparación de muestras de MEB	48
1. Observación al MEB	51
2. Revelado de negativos de MEB	52
C. Preparación de hojas de contacto y fotografías	52
D. Materiales	54
1. Equipo	54
2. Soluciones y reactivos	56
3. Varios	57
IV. Resultados	58
A. Microscopía fotónica	58
B. Microscopía electrónica de barrido	61
C. Microscopía electrónica de transmisión	69
D. Análisis químico	76
V. Discusión	78
VI. Conclusiones	82
VII. Bibliografía	83

I. INTRODUCCIÓN.

La cavidad bucal esta constituida por diferentes tejidos, los que se clasifican según su consistencia en duros y blandos: Estos tejidos tienen un orden y equilibrio en estado de salud que involucra la economía en general. Esta homeostasis se puede alterar por alguna patología, en ese momento la función estomatognática se modifica repercutiendo en la economía del sujeto, esto se debe a que no solo involucra la estética del paciente, sino también los movimientos funcionales y fisiológicos de los músculos masticadores, así como en la formación del bolo alimenticio y de la deglución. Por ello, es prioritario prevenir y mantener, o rehabilitar y restablecer el equilibrio de la cavidad bucal.

Todos los tejidos, tanto duros como blandos son de suma importancia. Dentro de los primeros, los dientes son de gran interés científico por su composición, características físicas, químicas y biológicas que en conjunto les dan la biofuncionalidad.

Dentro de las múltiples funciones que desarrolla el odontólogo esta la de prevenir el proceso carioso, así como la rehabilitación de los dientes enfermos. Esto es debido, a que dentro de la composición estructural del diente el esmalte por ser el tejido superficial y por estar en contacto con injurias físicas, químicas y biológicas se convierte en el blanco de ataque, aunado todo esto a la susceptibilidad del mismo. Por ende, a pesar de la gran cantidad de estudios enfocados al conocimiento de esta estructura dental, aún falta entender en su totalidad el comportamiento físico y biológico de los componentes estructurales del diente, y una vez comprendidos estos, se podrán obtener datos acerca de factores que involucran el desarrollo de procesos patológicos, para de esta forma evitar

y/o realizar una terapéutica que pueda ser agresiva y mutilante para el órgano dental.

Para conseguir esto se pueden emplear técnicas que faciliten el estudio y comprensión de los mismos, de ahí que el uso de técnicas de microscopía electrónica han permitido abrir más el campo del conocimiento en el estudio de las estructuras dentarias que a la fecha todavía son un enigma, esto es posible gracias a que se pueden estudiar formas nanométricas, las cuales de no ser por este medio no sería posible. Por lo que estudiar la unión amelodentinaria del diente humano bajo estas técnicas nos brinda un panorama más amplio que puede ser aplicado a la práctica clínica, para de esta forma poder brindar tratamientos de rehabilitación y técnicas de prevención, así como también el poder comprender a través de la morfología normal del diente el comportamiento biológico de ciertos procesos patológicos que ocasionan cambios estructurales y morfológicos.

II ANTECEDENTES.

A. GENERALIDADES.

Durante la tercera semana de vida intrauterina se inicia la formación del estomodeo primitivo, sin embargo los dientes comienzan su formación hasta la sexta o séptima semana de vida intrauterina. El desarrollo dental es un proceso continuo que involucra una serie de cambios morfológicos y fisiológicos para obtener la estructura final del diente. Las etapas que se distinguen durante este proceso son: iniciación, proliferación, histodiferenciación, morfodiferenciación, aposición y calcificación. Sin embargo es imposible marcar límites precisos de cada periodo ya que se dan de modo ininterrumpido (Hattab y cols, 1994).

El ser humano presenta dos tipos de denticiones, las cuales se dan en etapas establecidas. La primera o primaria sirve durante la infancia, los dientes desarrollados en esta dentición reciben el nombre de dientes deciduos (palabra proveniente del latín *decidere*, que significa "caerse"), infantiles, caducos, temporales o de leche, estos dientes se exfolian progresivamente y son sustituidos por los dientes permanentes los cuales deben de durar el resto de la vida (Esponda, 1970).

En total son veinte los dientes que conforman la primera dentición, diez en el maxilar y diez en la mandíbula, cada uno con diferente anatomía, que corresponde a la función destinada, los cuatro dientes anteriores a la línea media se denominan incisivos, (nombre proveniente del latín *incidere*, cortar), los dos adyacentes a la línea media reciben el nombre de Incisivos Centrales y los dos inmediatos a estos se denominan Incisivos Laterales, estos poseen la función de cortar los alimentos, el diente siguiente a estos se llama Canino o Monocúspide el cual se utiliza para el desgarrar de

alimentos; posterior a estos se localizan los molares, el primero y el segundo, los cuales están modificados para la trituración de los alimentos al poseer superficies masticatorias más anchas y aplanadas, además de tener tres o más cúspides que se proyectan. Esta dentición se completa aproximadamente a los dos años de edad y se va a conservar hasta los seis años cuando el niño comienza a exfoliarlos para ser sustituidos por los dientes permanentes, proceso que va desde los seis a los doce años dependiendo de las características orgánicas del individuo (Orban, Ham, 1975; Ten Cate, 1989).

La dentición permanente incluye treinta y dos dientes, dieciséis en cada arcada, en cuanto a su anatomía varía a la de los dientes primarios teniendo en esencia la misma disposición y anatomía pero con un mayor volumen, los dientes frontales se clasifican en Incisivos Centrales y Laterales, junto a ellos los Caninos y por detrás de estos se encuentran primeros y segundos bicúspides o premolares, los cuales ocupan los espacios antes destinados a los molares decíduos. Inmediatamente por detrás de estos se localizan tres molares, recibiendo el nombre de primero, segundo y tercero (Ten Cate, 1989). La tendencia evolutiva predispone a la no formación del germen dentario del tercer molar o a su retención en un alto porcentaje dentro del hueso tanto mandibular como maxilar por lo que el número de piezas dentales se ha modificado de 32 a 28.

B. ODONTOGÉNESIS

Como ya se mencionó, durante la sexta o séptima semana de vida intrauterina se presenta la diferenciación y desarrollo de diversos tejidos, entre ellos se encuentra la formación de los órganos dentarios. En este momento inicia la proliferación de la lámina dentaria, que corresponde a la capa interna del ectodermo, ya que la capa externa viene del epitelio bucal

del estomodeo. Es importante establecer que en la formación de un diente participan dos capas germinativas, que son el ectodermo que da origen al esmalte dental humano y el mesodermo a la dentina, al cemento y a la pulpa dental. La formación de un diente depende fundamentalmente de la interacción ectomesenquimatosa. En este proceso la lámina dentaria prolifera invaginándose en el mesénquima. Durante este período ambas capas germinativas presentan actividad mitótica, lo que les permite presentar una estimulación mutua.

El órgano dentario a través del desarrollo pasa por las etapas de yema, casquete y campana (Ten Cate, 1989) que a continuación se describen.

1. Lamina Dentaria

Al comienzo de la séptima semana de vida fetal (45 días intrauterinos) el embrión mide aproximadamente 15mm de longitud vértex-cóccix, el epitelio de los maxilares embrionarios comienza a engrosarse adoptando una forma de herradura, aquí se encuentran tanto la lámina vestibular como la lámina dentaria, ambas constituidas por células de la capa basal y del estrato espinoso, posteriormente las dos láminas se separan teniendo cada una de ellas diferentes funciones. La lámina vestibular sufre engrosamiento mostrando seis o siete capas celulares y dará origen al epitelio bucal. En tanto que por debajo de la lámina dentaria que dará lugar al desarrollo de los órganos dentarios presentará acumulación de células mesenquimatosas, las cuales tienen núcleos redondos u ovoides. En este estadio ya pueden observarse terminaciones nerviosas en las proximidades de la lámina dentaria, no así en la lámina vestibular (Mjör, 1974).

Durante ésta etapa, la lamina dentaria presenta una continua y localizada actividad para la formación de una serie de proliferaciones dentro del

ectomesénquima, que corresponde a la posición de los futuros dientes deciduos, en este momento se presenta gran actividad mitótica y el desarrollo de las células epiteliales es significativamente bajo en relación a los índices del ectomesénquima subyacente; lo que sugiere que la porción en crecimiento se almacena en el ectomesénquima proliferativo. Para este punto el desarrollo dental precede a los tres estadios siguientes, los cuales describen la morfología del desarrollo del germen dental que presenta durante su formación (Ten Cate, 1989)

2. Estadio de Yema o de Brote

La lámina dentaria al invaginarse en el mesenquima forma un botón (fig. 1) esto se da cuando el embrión mide 23mm (Mjör, 1974), se observa con forma de copa invertida, en ésta etapa el mesénquima crece hacia arriba por dentro de la parte cóncava de la copa epitelial por medio de fenómenos de inducción. Las células epiteliales que revisten la parte interna de la copa sufren el proceso de citodiferenciación lo que las convierte en ameloblastos, los cuales se caracterizan por la producción de esmalte. En tanto que las células mesenquimatosas adyacentes a los ameloblastos se diferencian dando lugar a los odontoblastos, los cuales secretan dentina y forman capas progresivas de ésta, cuya función será el brindar soporte al esmalte. Por consiguiente la corona anatómica de un diente se desarrolla a partir de dos diferentes capas de epitelio. (Mjör, 1974; Ten Cate, 1989).

En el desarrollo dentario, la región de la cresta neural juega un papel importante, debido a que en ésta zona se origina la información para el comienzo de la formación dentaria; iniciando la interacción entre el epitelio y el mesénquima (Ten Cate, 1989). Estudios realizados demostraron que el epitelio mandibular puede inducir al mesénquima del segundo arco a través de la papila dentaria; El ectomesenquima de esta papila se combina con el

epitelio de la piel y asume las características del germen dentario. Esta ha permitido establecer que los inductores o determinantes para la formación dental residen precisamente en el ectomesenquima junto con el epitelio. El estado morfológico del germen dental describe el proceso de desarrollo que tiene por medio de la morfo e histodiferenciación. La clara distinción de los procesos no es posible, por lo que representa un problema en su estudio.

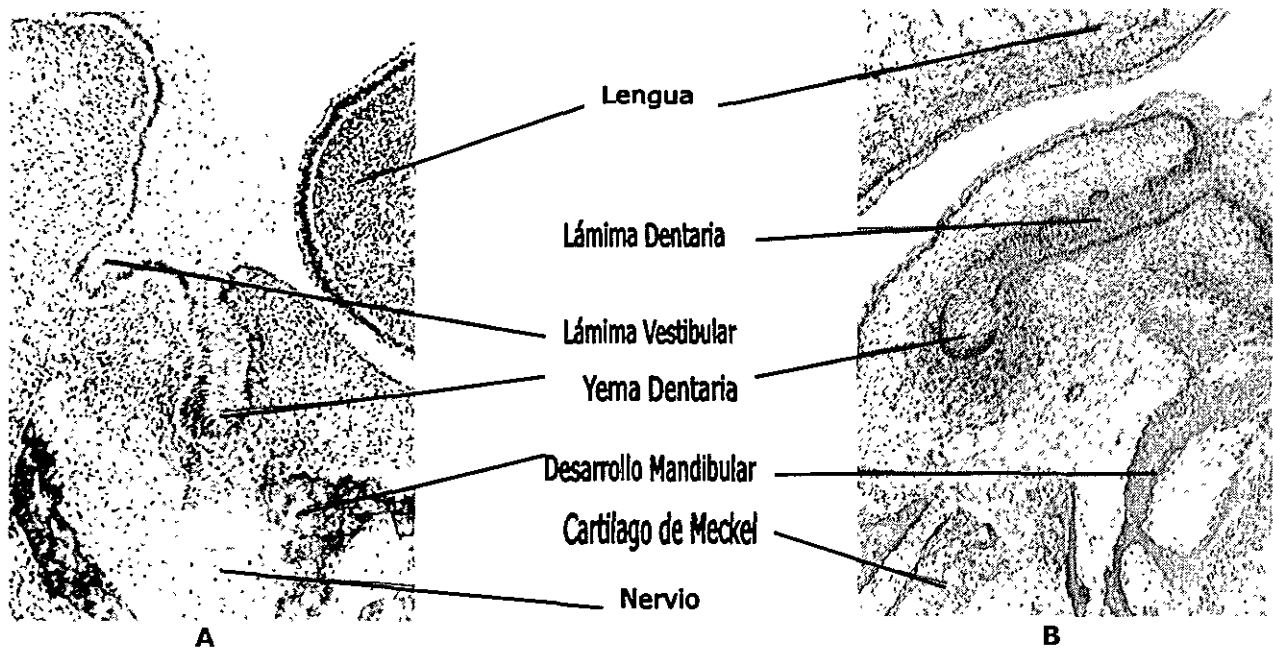


Figura 1: Observación histológica del desarrollo dental en el estadio de brote. a) Vista desde un corte coronal, b) Desde corte sagital. Imagen tomada de Ten Cate. Oral Histology development, structure and function.

El estadio de brote se caracteriza por la incursión del ectomesenquima, en esta etapa las células epiteliales comienzan a formar la línea epitelial alrededor del tejido que forma la estructura. A la par, principia la diferenciación de los odontoblastos ya que es necesaria, no sólo para el desarrollo y maduración de la dentina, sino también para la iniciación de la reparación de esta. La diferenciación empieza en la empalizada ayudada por la presencia de células epiteliales y de sus productos. En este estadio

comienza a formarse el futuro alvéolo óseo e, histológicamente pueden detectarse mucopolisacáridos ácidos en el mesenquima condensado. La yema epitelial contiene ácido ribonucleico (RNA) y enzimas con actividad hidrolítica y oxidativa en cantidades superiores a las del epitelio vestibular, siendo ésta más pobre en glucógeno. (Mjör, 1974).

3. Estadio de Casquete o Gorra.

Cuando el embrión mide 35 mm comienza el llamado estadio de casquete que se caracteriza por la invaginación del epitelio del germen dentario en el seno del mesenquima subyacente (Mjör, 1974)

Continúa la proliferación dentro del ectomesenquima incrementando la densidad celular en la zona adyacente al epitelio invaginado, este proceso se denomina "*condensación*" del ectomesenquima resultando en una agrupación local de células, responsables de la producción de la sustancia extracelular. En este estadio del desarrollo dental ya es posible la identificación de elementos formativos de los tejidos (Ten Cate, 1989). El estadio del embrión de 60 mm se caracteriza por la formación de una capa interna y externa del epitelio dentario apareciendo una zona de células centrales en el epitelio dentario, dispuestas en forma muy apretada que constituyen el llamado "*nódulo del esmalte*" (Mjör, 1974). El epitelio invaginado en su superficie asemeja una gorra, este es el sitio de la condensación ectomesenquimatosa donde se generará el órgano dental cuya función es la formación del esmalte del diente y también es responsable de la determinación de ciertos factores en la formación de la dentina y el establecimiento de la unión dentogingival. La papila dentaria es la responsable de la formación de la dentina y del tejido pulpar. La condensación ectomesenquimatosa limita la papila dentaria y encapsula el

órgano dentario (folículo dental), dando un soporte a los tejidos del diente (Ten Cate, 1989)

Cuando el órgano dentario se encuentra sobre la papila semeja una gorra, por lo que a este estadio en el desarrollo dental se le denomina como *estadio de gorra o casquete*. El órgano de la papila, junto con el folículo forman el germen dental (fig. 2). (Ten Cate, 1989).

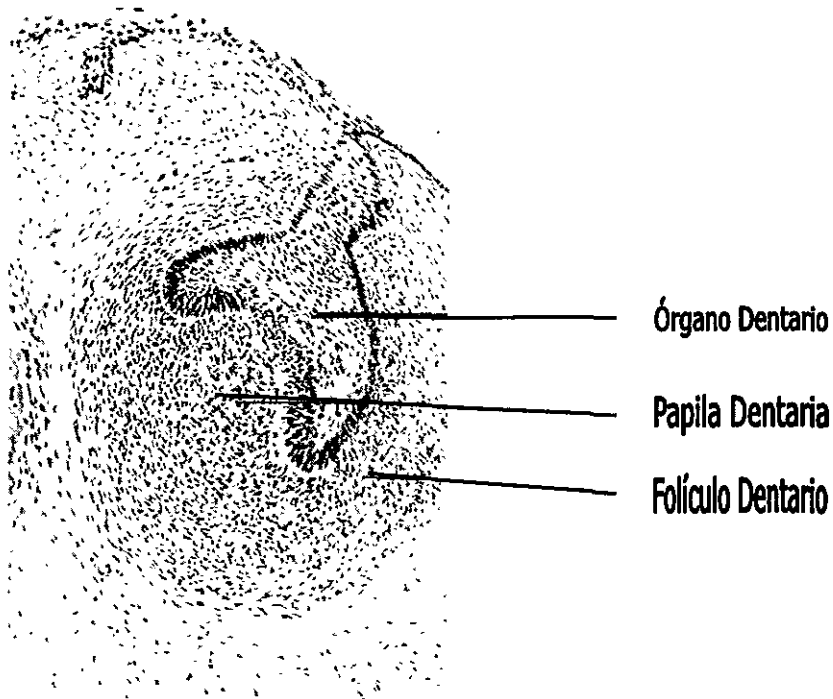


Figura 2: Corte histológico durante el estadio de casquete. El epitelio del órgano dentario se sitúa sobre un acumulo de células ectomesenquimatosas, la papila dental se extiende solo por el borde del órgano dentario formando el folículo dentario. Imagen tomada de Ten Cate. Oral Histology development, structure and function.

Histoquímicamente comienza un incremento en la actividad de fosfatasa alcalina, los mucopolisacáridos ácidos aparecen en pequeñas cantidades en

la sustancia intercelular de las áreas centrales del epitelio dentario. (Mjör, 1974).

4. Estadio de campana.

Este estadio se alcanza cuando el feto mide 70 mm. El órgano dentario está diferenciado en las capas externas e internas del epitelio dentario, del estrato intermedio y del estrato reticular. El desarrollo característico del tejido reticular estrellado, de la porción central no se completa hasta que los vasos del tejido conectivo circundante aparecen y se invaginan hacia la porción externa del epitelio dentario externo; además de aparecer un acumulo alargado de células compactas llamado "*cordón del esmalte*" (figura 3), estructura que no desaparece hasta que el feto mide 110 mm (Mjör, 1974). Las células en el centro del órgano dentario continúan sintetizando y secretando glucoaminoglucanos en la sustancia extracelular de las células epiteliales. Los glucoaminoglucanos son hidrofílicos, por lo que tiran del agua hacia dentro del órgano dentario en incremento de los fluidos extracelulares que incrementan el volumen extracelular del órgano dentario (Ten Cate, 1989).

En este estadio el órgano dentario parece una campana por debajo del epitelio de gorra. Importantes cambios dados en el estadio de casquete continúan durante el desarrollo del germen dentario. Estos cambios terminan con una histodiferenciación dando similitud de las células epiteliales transformándolas con mayor frecuencia en distintos componentes. El centro del órgano dental está lleno de retículo estrellado y la periferia presenta células cuboidales, las cuales forman una capa externa (Ten Cate, 1989).

Las células del borde de la papila dentaria se diferencian en dos tipos histológicamente diferentes. Los inmediatamente adjuntos a la papila asumen una forma cuboidal que se caracterizan por un alto contenido de glucógeno. Las otras forman una línea interna del epitelio y cuya subsecuente diferenciación junto con el retículo estrellado generan células llamadas de estrato intermedio; estas células se caracterizan por la gran actividad de la enzima fosfatasa alcalina. La función singular de las células del epitelio interno es la responsable de la formación del esmalte. Este epitelio dentario interno dental, junto con el epitelio externo dental, ambos del órgano dentario dan como resultado de esta unión una zona conocida como "*lazo cervical*". (Ten Cate, 1989).

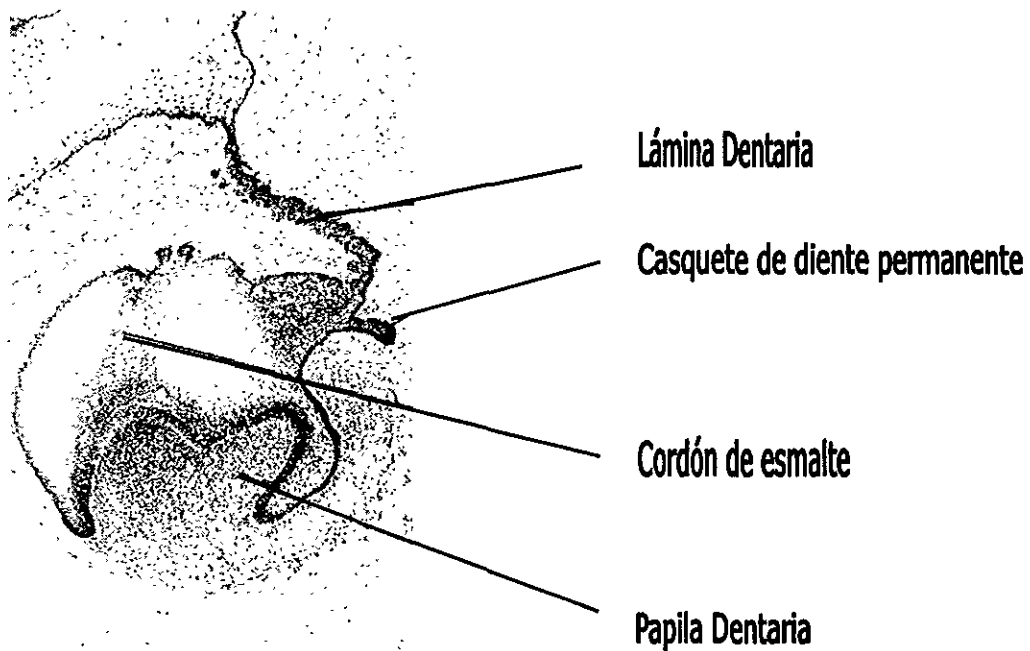


Figura 3: Estadio de campana. Se observa la división del órgano dentario en dos por medio del cordón de esmalte. Imagen tomada de Ten Cate. Oral Histology development, structure and function.

La primera formación de predentina tiene lugar cuando el feto alcanza una longitud de 120 mm. Siendo posible el detectar el primer depósito de sales minerales, además de ser el momento del comienzo de la amelogénesis. El germen dentario queda rodeado por el saco dentario, el cual es un haz de fibras colágenas orientadas y condensadas. Periféricamente con respecto al sáculo, el alveolo crece alrededor del germen dentario (Mjör, 1974).

Histoquímicamente disminuye el colágeno en las áreas centrales, y a medida que se desarrolla el retículo de elementos estrellados, las porciones interna y externa del epitelio dentario, así como en el estrato intermedio se enriquecen en este polisacárido. La actividad de fosfatasa alcalina se lleva a cabo en el retículo de elementos estrellados y en el estrato intermedio. En cambio la porción interna del epitelio dentario no demuestra actividad alguna. Aumenta la presencia de mucopolisacáridos ácidos entre las células del órgano dentario y cuando comienza el proceso de mineralización existen grandes cantidades de mucopolisacáridos en el retículo de elementos estrellados y entre las células del estrato intermedio. Desciende el contenido de RNA de la porción externa del epitelio dentario al tiempo que aumenta en la porción interna del mismo (Mjör, 1974).

5. Composición Química del Esmalte, Dentina y Unión Amelodentinaria.

El esmalte y la dentina, son los primeros tejidos que se forman durante la odontogénesis, se caracterizan por su dureza principalmente el esmalte. Los ameloblastos son derivados del ectodermo (Kukita et al, 1992) en tanto que los odontoblastos provienen de la cresta neural y sufren un proceso de diferenciación en la papila dentaria (Ten Cate, 1989). Se sabe que el esmalte se encuentra constituido en un 96% de materia inorgánica, mientras que la dentina sólo posee un 70% de materia inorgánica, 20% de

materia orgánica y 10% de agua. Ambos tejidos contienen hidroxiapatita como componente principal, en el caso de la dentina también contiene colágena tipo I con inclusiones de glucosaminoglucanos, proteoglucanos, fosfoproteínas, glucoproteínas y otras proteínas plasmáticas y se ha encontrado colágena tipo III durante la diferenciación de los odontoblastos, ya no detectándose posteriormente (Limeback, H. 1986).

De la unión de estos dos tejidos surge la unión amelodentinaria (fig. 4), estructura cuya complejidad ha sido difícil de estudiar.

El esmalte dental por su ubicación y condición es uno de los tejidos más susceptibles al ataque de agentes físicos, químicos y biológicos sin importar la dureza que presenta, aún siendo el tejido más mineralizado y duro del organismo; puede alterar su estructura y por ende su composición química. Reportes de la literatura sugieren que la unión amelodentinaria le da resistencia a la caries por lo que es una estructura susceptible al desarrollo de lesión cariosa (Reyes, 1995).

La unidad estructural del esmalte es el prisma el cual va desde la dentina hasta la superficie, en su corte transversal posee forma de "ojo de cerradura". Su composición se basa en granos cristalinos de hidroxiapatita, encontrándose un espacio interprismático constituido por proteínas (Reyes, 1995). Topográficamente el esmalte va a mostrar zonas de alto contenido orgánico denominadas "laminillas, penachos o husos adamantinos", así como estructuras asociadas al crecimiento, una de las estructuras más enigmáticas es la llamada "línea oscura", la cual lleva una trayectoria paralela al eje longitudinal del prisma y posee un grosor de aproximadamente 1nm. esta línea se presenta tanto en la dentición decidua como en la permanente y se puede observar negra, blanca o no observarse según el "foco" que se le de en microscopía electrónica de transmisión

(sobre enfocado, poco enfocado o totalmente en foco, respectivamente), además se observó "in vitro" en estudios anteriores la predilección de las injurias para el ataque de la línea oscura, disolviéndose el esmalte en este sitio primariamente (Reyes, 1997), en esta razón radica la importancia y una de las interrogantes que es el poder establecer la constitución de este en la zona adyacente a la unión amelodentinaria, así como sus factores de vulnerabilidad.

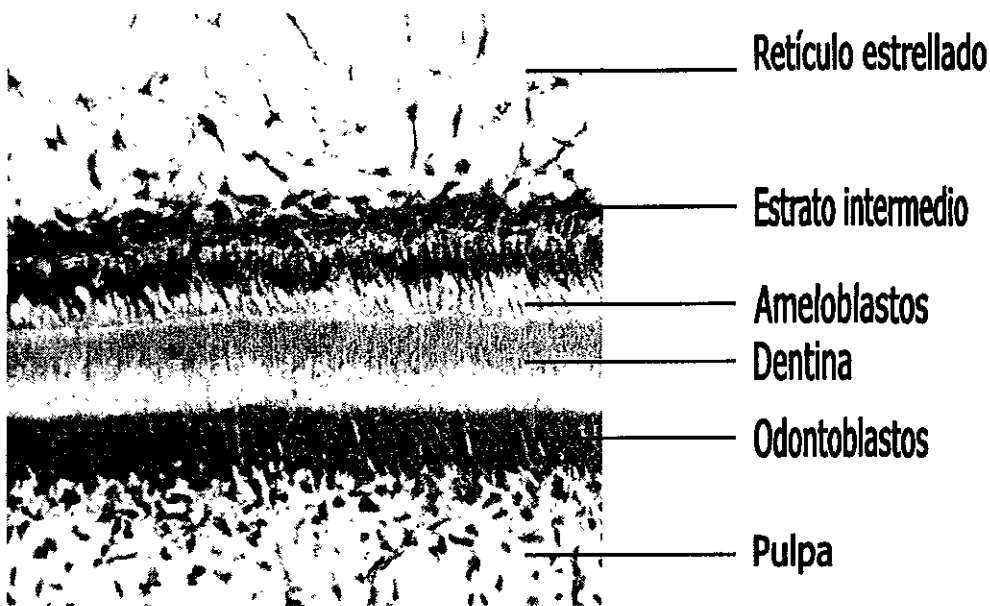


Figura 4: Microfotografía de un corte efectuado a nivel de la unión amelodentinaria posterior a la formación de la dentina. Imagen tomada de Ham, AW. Tratado de histología.

El esmalte cubre la corona anatómica del diente y es el tejido con mayor grado de mineralización del cuerpo humano, así como de todos los vertebrados, puede llegar a constituirse de 96% de material inorgánico y 4% de material orgánico y agua. Estudios realizados han demostrado que el esmalte contiene cantidades mínimas de CO^3 , Mg y Na (Le Geros, 1990). El esmalte inmaduro tiene del 5 al 20% de mineralización, mientras que en su

estado maduro lo tiene del 70 al 80%. En cuanto al contenido proteico este desciende conforme la edad, de un 20 a 30% en estado formativo a un 2 a 3% en la madurez, mientras que la concentración de agua varia descendiendo con el tiempo (Robinson et al, 1988).

La citodiferenciación epitelial de la lámina en ameloblastos y la síntesis de la matriz extracelular del esmalte es regulado por una región ectomesenquimatosa específica (Kollar 1983, Ruth 1985, Slavkin 1984). Ocurriendo los mayores cambios en la morfogénesis del esmalte en el estadio de campana. Bioquímicamente los ameloblastos van a presentar dos clases de proteínas del esmalte, localizadas estas durante la amelogénesis y en la formación del esmalte. Las proteínas de la amelogénesis, se localizan en la matriz extracelular, se caracterizan por ser hidrofóbicas (Catalano, 1994), de bajo peso molecular, con elevados niveles de prolina, ácido glutámico, bucina e histidina (Ficham et al, 1985, Termine et al, 1980).

La biomineralización del esmalte dental esta dominada por la hidroxiapatita cálcica, la cual esta organizada en cristales. Los cristales del esmalte se encuentran en etapas iniciales dentro de una matriz orgánica única, compuesta principalmente por proteínas y lípidos entre otros (Simmer y Snead, 1995).

Durante la formación del esmalte el 90% del total de las proteínas se localizan en la amelogénesis. La formación del esmalte posee proteínas hidrofílicas, las cuales representan del 1 al 3% de las proteínas de la matriz (Termine et al, 1980). Con la mineralización del diente, el agua y las proteínas son remplazadas por hidroxiapatitas biológicas $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ principalmente fluorapatita e hidroxiapatita de calcio (Reyes, 1995) que llegan a formar hasta un 99.9% de la porción inorgánica del esmalte. Para esta mineralización, se ha observado in vitro que son necesarios factores

Antecedentes

exógenos de la matriz para poderse realizar; aunque nuevas hipótesis hablan de la regulación dictada por programas genéticos intrínsecos independientes de factores humorales exógenos, teniendo resultados de formación de cristales de hidroxiapatita de calcio, dando una distribución prismática en el esmalte bajo estricto control del genotipo. Las amelogeninas son el principal componente proteico de la matriz extracelular del esmalte dental en desarrollo (60 al 90%), en general regulan la iniciación, propagación, terminación y maduración de los cristales de hidroxiapatita del esmalte. En el hombre se ha identificado el gen amelogenina (AMEL) en ambos cromosomas sexuales X e Y (Watson y cols, 1992). El cual puede causar defectos en el esmalte (amelogénesis imperfecta).

Las enamelinas o no ameloeninas (componente proteico descubierto en el esmalte maduro) se encuentran involucradas directamente en la maduración del esmalte, estas son proteínas glucosiladas en la matriz y se encuentran enlazadas a los cristales de apatita; siendo de alto y bajo peso molecular (Strawich, 1993). Strawich y Glimcher en 1990 reportan que las enamelinas contienen albúmina, extractos de λ - globulina, α - 2HS glucoproteína, fetuina y una proteína salival rica en prolina.

Características Ultraestructurales del Esmalte

La topografía y ultraestructura de los prismas del esmalte en los diferentes tercios son diferentes, así como la disposición cristalina del esmalte de la superficie, en comparación con el adyacente a la unión amelodentinaria; teóricamente se maneja que el esmalte superficial es perpendicular a la superficie del diente e interprismáticamente paralelo, en cambio en la parte interior los cristales presentan un mayor grado de desorganización en

cuanto al patrón, ya que observamos una disposición ondulada y en forma de abanico (Reyes, 1997. Reyes, 1995).

El diámetro promedio de los ameloblastos es de 4 μm que es comparable con el espesor de un prisma del esmalte y se va a desarrollar un prisma de esmalte por cada ameloblasto. Éste es considerado como un tejido acelular que no tiene la capacidad de regenerarse (Simmer y Snead, 1995). El potencial de formación odontogénico es derivado de la cresta neural del ectodermo del segundo arco branquial (Kollar, 1987).

Hay trabajos publicados que indican que con algunas limitaciones, es posible tratar órganos dentales bajo tratamiento criógeno, con la ventaja de preservar la arquitectura de los ameloblastos, permitiendo la inmunolocalización de las proteínas del esmalte en microscopía electrónica de transmisión, evitando así alteraciones en la estructura y composición de las células y tejidos causados por métodos convencionales (Nanci, 1994).

En cuanto al análisis químico del esmalte, éste es de gran atención ya que pueden obtenerse los constituyentes y observarse todos los elementos con excepción del hidrógeno. De ahí que podamos obtener un índice de frecuencia y un mapeo que muestre el lugar en la muestra de donde se encuentre determinado elemento.

Estudios con microscopía electrónica de barrido, han reportado la presencia de prolongaciones citoplasmáticas de los odontoblastos que cruzan el esmalte dental, pero no se ha corroborado con microscopía electrónica de transmisión, esto ni su composición química.

6. Diferenciación de los Ameloblastos.

En el estadio de campana, la capa interna del epitelio dentario esta constituida por células alargadas con núcleo central, y son llamados preameloblastos que al iniciarse la dentinogenesis se interrumpe su nutrición procedente de la pulpa, los núcleos se sitúan más basalmente llamándose en ese momento ameloblastos. Los cuales al comenzar su secreción son células columnares alargadas uniformes de unas 40 μm de altura y 7 μm de diámetro. Cada una de estas células morfológicamente se puede dividir en tres porciones, una basal, una nuclear y una apical a partir de la cual se extiende el proceso o fibra de Tomes hacia el esmalte (Mjör, 1974).

Amelogénesis.

El esmalte es un tejido constituyente del diente, derivándose del epitelio bucal, las células formadoras son los ameloblastos, diferenciados del epitelio interno dental a partir del órgano dentario. En la odontogénesis los ameloblastos se dirigen a la periferia formando esmalte, previa formación de la dentina. El esmalte es el único tejido duro que se deriva del ectodermo, siendo los otros tejidos duros derivados del tejido conectivo, por lo que su formación un proceso complejo dividido en dos estadios, la secreción y la maduración.

En el **estado de secreción** se genera una matriz orgánica celular diferente del epitelio dental, esta es parcialmente mineralizada, ya que se constituye en un 65% de agua, 20% de material orgánico (proteínas) y un 15% de materia inorgánica (hidroxiapatita) (Ten Cate, 1989). Algunos autores presentan el contenido de materia inorgánica del esmalte en un 25% del peso (Mjör, 1974). Se secreta una porción mineralizada continua que sigue con la formación del esmalte modificando la matriz orgánica, la cual consiste

en dos familias de proteínas: Las amelogeninas que son hidrofóbicas (proteínas de alto peso molecular mayor a 25,000 Daltons) y enamelinas, las cuales son ácidos glucosados, (fosfoproteínas con un peso molecular mayor a los 55,000 Daltons), (Ten Cate, 1989; Catalano, 1994; Simmer, 1995).

Las amelogeninas exceden a las enamelinas en proporción de 19:1. El gen formador de enamelinas ha sido identificado y clonado determinando la secuencia de los aminoácidos (Yeh, 1987; Ten Cate, 1989; Walson, 1992; Colin, 1995; Simmer, 1995).

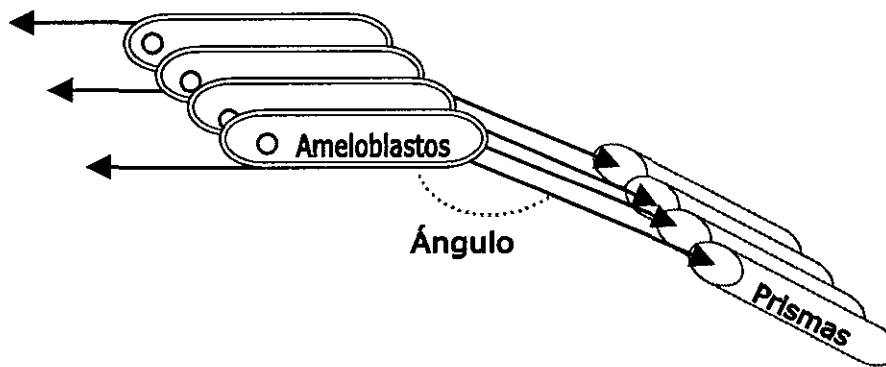


Figura 5: Esquemización de la formación de los prismas del esmalte donde la trayectoria de los prismas no es paralela con el eje longitudinal del ameloblasto. Esquema modificado de Mjör, IA. Hystology of the Human Tooth.

Los primeros cristales depositados en esta matriz tienen forma de agujas finas, formadas por hidroxapatita cuyo cambio principal en su forma será el aumento de espesor (Mjör, 1974). Una mayor secreción de proteínas del esmalte disminuye el peso molecular, causando proteólisis extracelular, incrementando la anchura de los cristales. (Ten Cate, 1989). Cuando la capa de esmalte formado alcanza cierto espesor, los ameloblastos desarrollan una

prolongación en forma de cono llamado "*proceso de Tomes*" En esta fase la mineralización se da en un 30% presentando una consistencia suave (Mjör, 1974).

En la etapa de maduración el proceso consiste en la formación de cristales y la disminución del agua y proteínas. La maduración comienza en el centro en la unión amelodentinaria, por debajo de las cúspides, se mineraliza el esmalte inmaduro de toda esta región irradiándose este proceso a toda la superficie removiendo el material proteico durante la maduración selectivamente hacia las amelogeninas y las enamelnas de alto peso molecular dejando en la superficie los cristales de hidroxiapatita. Si el contenido de agua es mayor la mineralización del esmalte será muy porosa (Ten Cate, 1989). El esmalte va aumentando de espesor a medida que se mineraliza y produce más matriz, con la consecuencia de que los ameblastos se vayan alejando de la unión amelodentinaria. Sin embargo la trayectoria de movimiento no es a lo largo del eje mayor de las células, sino formando cierto ángulo con el mismo (figura 5).

Finalmente la maduración total del esmalte se da con la adición de minerales en los poros (Ten Cate, 1989).

7. Diferenciación de Odontoblastos.

Los odontoblastos se derivan a partir de las células de la papila dentaria, son células altas de unas 40 μm de altura y 7 μm de diámetro, a menudo están tan densamente condensadas que es difícil distinguir los bordes celulares por medio de microscopia fotónica.

Citoquímicamente el odontoblasto posee un alto contenido de RNA y una actividad de enzimas oxidativas e hidrolíticas, sobre todo en la porción distal de la célula. El odontoblasto no contiene glucógeno (Mjör, 1974).

Dentinogénesis.

Posteriormente a la diferenciación de los odontoblastos se da la formación de una matriz orgánica consistente de colágena tipo I y sustancias fundamentales. La síntesis de la colágena en el odontoblasto es similar a la que se da en los fibroblastos involucrando al retículo endoplásmico, complejo de Golgi, vesículas secretoras y sustancia extracelular. La disposición de la colágena en la dentina es por medio de fibras de 0.1 a 0.2 mm de diámetro las cuales se agregan a la estructura subyacente inmediata a la lámina interna del epitelio dentario (Ten Cate, 1989).

Posterior a la secreción de las fibras por los odontoblastos estas van a aumentar su tamaño. Los odontoblastos son movilizados desde el centro de la pulpa acentuándose por el aumento de la extensión principal de la célula, durante la introducción de cristales de apatita "*hidroxiapatita*". Los cristales rápidamente se generan por la mineralización de la matriz, los cuales son depositados siguiendo las fibras colágenas de la matriz con la disminución de esta y la denominación de "predentina" siguiendo con la mineralización por los odontoblastos formando un manto coronal de dentina de aproximadamente 150 μm (Ten Cate, 1989). La capa de predentina esta presente no solo durante la dentinogénesis, sino también reviste interiormente la capa pulpar de la dentina en los dientes totalmente desarrollados y funcionales, ya que la formación de la dentina continua lentamente durante toda la vida (Mjör, 1974).

La mineralización comienza cuando la predentina se ha formado en todo su espesor.

Posteriormente aumenta el tamaño de los odontoblastos, eliminando el espacio extracelular, se genera más matriz orgánica por los odontoblastos a partir de sustancias propias e iniciando la formación de proteoglucanos que son secretados en la unión del cuerpo de la célula y el proceso. La síntesis de proteoglucanos se acompaña por la síntesis de colágena, que será la encargada de la alineación de los túbulos dentinarios. Finalmente los odontoblastos adicionan lípidos, fosfoproteínas y carboxiglutamato protéico. La presencia de los lípidos obedece a su demanda en la matriz vesicular. (Ten Cate, 1989).

La mineralización es globular o calcosférica dada por una calcificación de depósitos de cristales en diferentes áreas de la matriz al mismo tiempo, en forma de placa, formándose unos agregados esféricos llamados "*calcosferitas*" que van creciendo y llegan a fusionarse (Mjör, 1974). Continuando con una calcificación en masa. El tamaño de las calcosferitas disminuye dependiendo del grado de formación de dentina (Ten Cate, 1989).

C. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.

La invención del microscopio electrónico (ME) fue posible gracias a las numerosas teorías y experimentos realizados por el físico francés Louis Victor de Broglie en 1924. Actualmente los científicos usan el ME en diferentes áreas de la investigación incluyendo: Medicina, biología, química, metalurgia, entomología y física. Este moderno y sofisticado equipo se introdujo en los años treinta y revolucionó el estudio microscópico tanto de estructuras como de superficies. En 1938 se fabricó en Alemania el primer modelo comercial de MET, mientras que el primer MEB se distribuyó en Inglaterra en el año de 1952 (Microsoft, 1999).

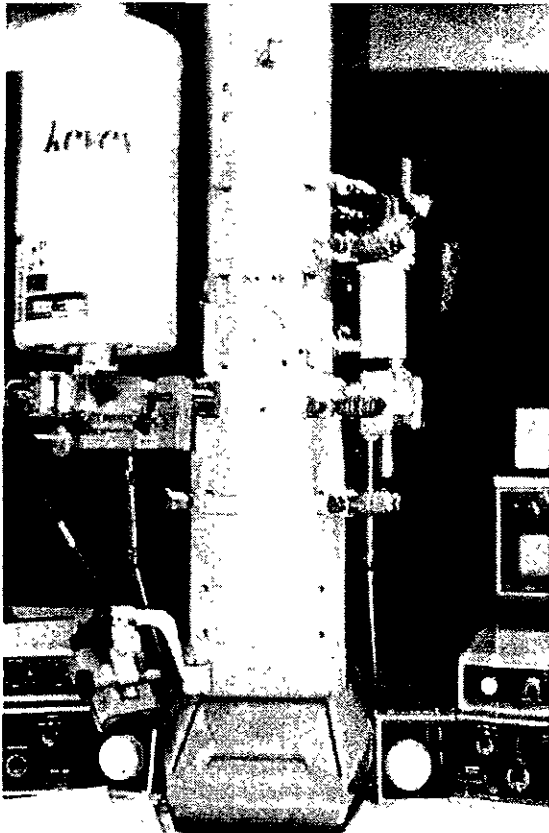


Figura 6: A la derecha se observa el MET JEOL 100 CX equipado con un sistema microanalizador de rayos X EDS-KEVEX. Arriba el MEB JEOL 5200 con resolución de 100 Å.

El proceso físico que se requiere para la formación de imágenes en un ME es igual al requerido en un microscopio fotónico (MF), pero también se encuentran diferencias marcadas como la composición de las lentes, ya que las del MF son de vidrio, mientras que las del ME son bobinas electromagnéticas. La columna del ME tiene que estar por lo menos con un vacío de 10^{-7} torr (1Torr = 1mm. de Hg), por lo que no permite el estudio de materia viva. Las lentes del MF poseen una distancia focal fija, el enfoque y amplificación se realizan por medio del cambio de objetivo, en tanto que en el ME se logra al variar la corriente de las lentes electromagnéticas (Yacamán, 1995).

Las amplificaciones alcanzadas en un MF son de dos mil, mientras que un ME moderno alcanza amplificaciones aproximadas a un millón de aumentos, esto es gracias a que la onda del haz de electrones es de 1 \AA , en tanto que la de la luz visible es de $4,000 \text{ \AA}$ (Microsoft, 1999). Permitiendo observar con un poder de separación de \AA y no solo de 0.2 \mu m que es el mayor poder mediante MF (Grolier, 1988).

Cuando el haz de electrones interacciona con la muestra se generan varios tipos de señales, las cuales son electrones retrodispersados, secundarios, absorbidos, Auger, transmitidos, y rayos X característicos. Los primeros dos dan información sobre la superficie de la muestra, los cuales son la fuente de información para MEB; los electrones absorbidos dan información sobre la resistencia de la muestra; los auger y los rayos X característicos dependen de la composición química de la muestra, por lo que permiten un análisis químico de ella; los electrones que atraviesan la muestra se clasifican en dos tipos, transmitidos y difractados y son los requeridos en MET (fig. 7) (Yacamán, 1995).

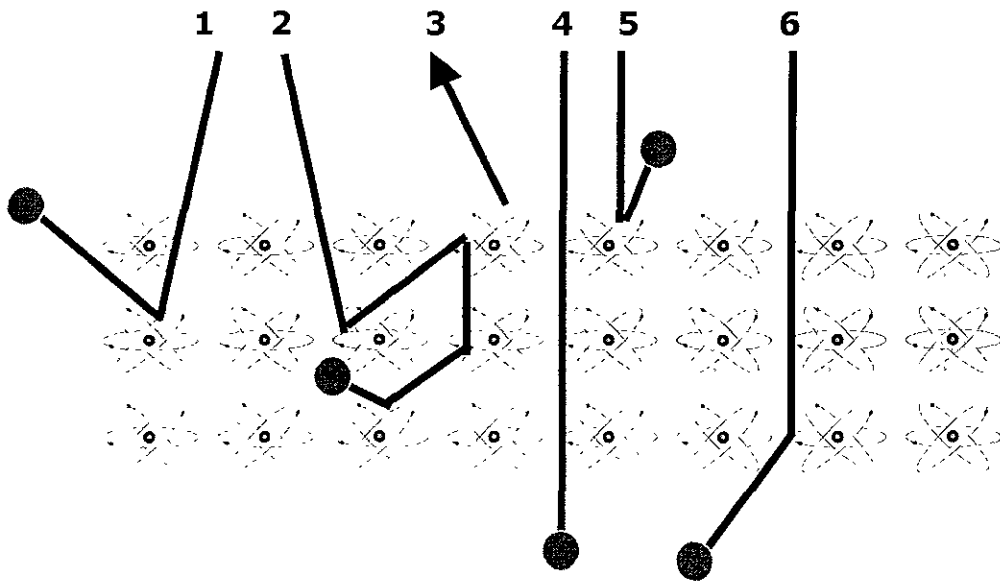


Figura 7: Tipo de señales producidas con la interacción del haz de electrones.
 1) Electrón secundario, 2) Electrón absorbido, 3) Rayos X característicos, 4) Electrón transmitido, 5) Electrón retrodispersado, 6) Electrón difractado. Esquema modificado de Zamora, MC. Análisis de la estructura y Composición del Esmalte y la Unión Amelodentaria.

1. Microscopía Electrónica de Transmisión (MET).

El MET se basa en un haz o cañón de electrones como fuente de iluminación, lentes condensadoras, lente objetiva, lentes intermedias y lente proyectora. El cañón electrónico es la única lente electrostática, las demás son lentes electromagnéticas (Yacamán, 1995). El filamento emisor es de tungsteno y por el se hace pasar un voltaje eléctrico que varía dependiendo la capacidad del MET y puede ser desde los 20,000 hasta los 400,000 Volts. Este acelera los electrones y junto con las lentes electromagnéticas condensa los electrones en un solo haz, además de enfocarlos por medio de las lentes objetivas; El haz pasa por el espécimen emitiendo los electrones en diferentes direcciones dependiendo de la densidad del material y

proyectándose sobre una pantalla fluorescente o en películas de plata (Microsoft, 1999).

El tipo de señal que se emplea para MET son tanto los electrones transmitidos que pasan a través de la muestra sin ser desviados de su dirección incidente y electrones difractados que son aquellos que si se desvían, siendo los empleados al proporcionar el patrón de difracción (Yacamán, 1995). Ya que estos pasan a través de la muestra y aportan información de las características estructurales de la misma; además pudiendo observar un arreglo de haces difractados y transmitidos denominado "*patrón de difracción*" (fig. 8), este presenta el haz transmitido rodeado de haces difractados presentando el arreglo geométrico característico de la muestra, por lo que el análisis del patrón nos permitirá el estudio de la estructuración a nivel atómico de la muestra.

El MET cuenta con tres aperturas: 1) La condensadora, que permite obtener un haz más homogéneo, disminuyendo la aberración cromática. 2) La siguiente apertura solo permite el paso de un haz de todo el conjunto de haces difractados, con ello se puede realizar observaciones de campo oscuro. 3) La apertura de área selecta permite seleccionar con alta precisión el área de donde proviene el patrón de difracción (Zamora, 1999).

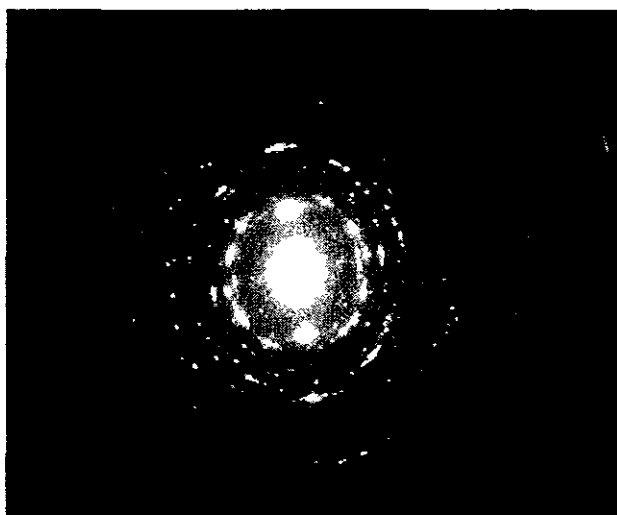


Figura 8: Patrón de difracción del esmalte, donde el punto central es el haz transmitido y los circundantes son los haces difractados.

2. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).

Esta técnica se basa en el barrido de la superficie de la muestra con un haz electrónico que genera una imagen punto a punto de ella cuya señal es captada y amplificada para ser enviada a un monitor de televisión, si se repite esta operación varias veces se puede captar las características topográficas de la superficie (fig. 9). El haz de electrones debe de poseer un diámetro menor a 1 nm y este va a generar varias señales, las cuales podemos tomar según las características deseadas de la observación, tenemos que los electrones retrodispersados provienen de la región a 0.5 μm por debajo de la superficie, los electrones secundarios solo logran penetrar de 5 a 10 nm por lo que la resolución de la observación con estos es mayor. (Yacamán, 1995).

Algunas de las ventajas del uso de MEB son su brillantez, la cual no disminuye con la amplificación, no hay rotación de la imagen como en el MET y el sistema fotográfico es externo dando lugar a una mejor toma por la eliminación de desgasificación de las películas fotográficas. El MEB tiene un rango de amplificación entre 20x a 200,000x, produciendo imágenes tridimensionales de la superficie de los objetos mientras que en el MET solo se perciben imágenes bidimensionales (Microsoft, 1999).

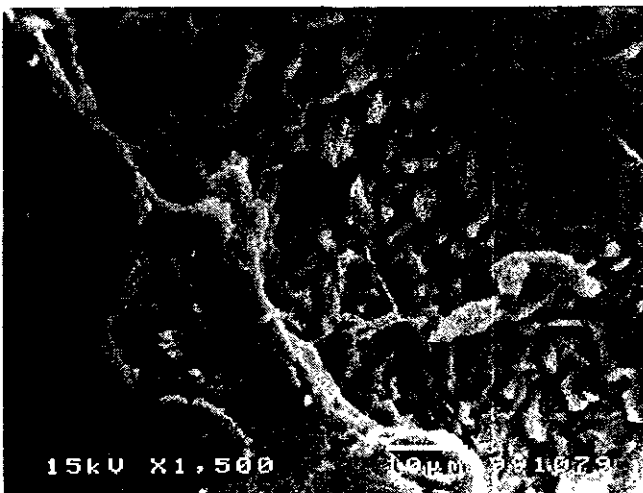


Figura 9: Fotografía de MEB de la unión amelodentinaria, en donde se pueden observar las características tridimensionales de los tejidos.

3. Análisis Químico con Rayos X Característicos.

Esta técnica se da por el desbordamiento de electrones que se ocasiona por la colisión del haz con los átomos de la muestra que pierden su energía, estas colisiones son de dos tipos: Las elásticas en donde los electrones del haz pasan a través de la muestra sin pérdida considerable de energía; y las colisiones inelásticas (que son la mayoría) con una emisión de energía de entre 0 a 50 eV. (Zamora, 1999). La colisión puede dar ocasionalmente la emisión de electrones de las capas internas de átomos de la muestra siendo sustituido por un electrón de las capas exteriores, dando como consecuencia la emisión de un fotón las cuales producen un espectro característico de rayos X o la emisión de un electrón de una capa superior conocidos como electrones Auger (fig. 10). Ambas señales son determinantes para el análisis químico, por ser característicos del elemento que los emitieron. Por lo que la medición de estas energías permite el análisis químico de la muestra (Yacamán, 1995).

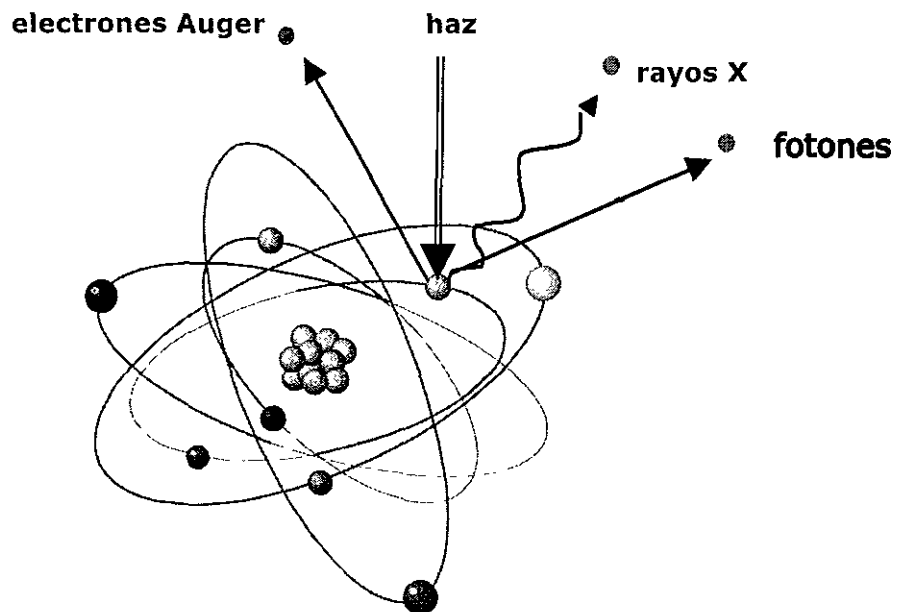


Figura 10: Producción de rayos X característicos dados por el bombardeo del haz de electrones con los átomos de la muestra, emitiendo fotones y electrones Auger. Esquema modificado de Zamora, MC. Análisis de la estructura y Composición del Esmalte y la Unión Amelodentinaria.

D. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Por lo que al desconocer las características estructurales, arreglo y composición química de la unión amelodentinaria nos impide establecer *¿Cuáles son las propiedades físicas y químicas de ésta?, así como conocer ¿Cuál es el papel que juega la unión amelodentinaria en el proceso carioso? y también ¿Cómo influye en la dureza del esmalte y de la dentina?.*

E. JUSTIFICACIÓN.

Por consecuencia, y basado en lo ya citado, el proceso carioso puede ser más agresivo en dientes con alteraciones morfológicas, así como aquellos que presenten mayor susceptibilidad, no sólo por sus cambios en la estructura sino también en su composición química. Por lo que es necesario analizar las características estructurales y químicas de la unión amelodentinaria.

El saber que el proceso carioso inicia en el esmalte es de gran preocupación, por ello el estudio de este desde todos los aspectos es obligado; para poder establecer nuevos conocimientos desde el punto de vista ultraestructural en la composición de la unión amelodentinaria, en base a la distribución y organización de los cristales de esmalte en dientes humanos sanos para poder de esta forma establecer parámetros de normalidad y así definir el comportamiento del esmalte y de la unión amelodentinaria ante agentes nocivos tanto físicos, como químicos y biológicos. Para de esta forma establecer la existencia de alguna organización y/o estructura diferente a las reportadas en la literatura.

En este estudio se tomará en cuenta tanto las técnicas de microscopía electrónica de barrido (MEB), microscopía electrónica de transmisión (MET)

Antecedentes

y la difracción de rayos X para la obtener la composición química de la unión amelodentinaria.

F. HIPÓTESIS.

Hipótesis de trabajo

Estructural y topográficamente la organización y composición de la unión amelodentinaria influye en el comportamiento mecánico de la misma.

Hipótesis nula.

Estructural y topográficamente la organización y composición de la unión amelodentinaria no influyen en el comportamiento mecánico de la misma.

G. OBJETIVOS

Objetivo General.

Estudiar y analizar tanto química como estructuralmente los granos del esmalte en la región de la unión amelodentinaria, así como también las propiedades mecánicas del esmalte en la unión amelodentinaria de las coronas dentarias por medio de microscopía fotónica, electrónica, tanto de transmisión como de barrido y la difracción de rayos X; poniendo mayor énfasis en las técnicas de MET.

Objetivos Específicos.

- Analizar la composición estructural y química de la unión amelodentinaria y del esmalte dental cercano a la unión.

- Establecer las características ultraestructurales de los cristales del esmalte adyacentes a la unión amelodentinaria.
- Analizar las propiedades mecánicas del esmalte en la unión amelodentinaria.

III. MATERIALES Y MÉTODOS.

Metodología.

Se recolectaron 50 dientes sanos extraídos por tratamiento protésico o quirúrgico, estos dientes se lavaron y se mantuvieron en agua bidestilada inmediatamente después de su extracción hasta su procesamiento. Primero se catalogaron los órganos dentales de acuerdo a la edad del paciente y condición física del diente, se eliminaron aquellos con proceso carioso, ya que esto repercute en la organización estructural, química por la presencia de los microorganismos responsables de dicho proceso. Por consiguiente la principal fuente de dientes para el procesamiento de muestras fue el Departamento de Ortodoncia de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la UNAM.

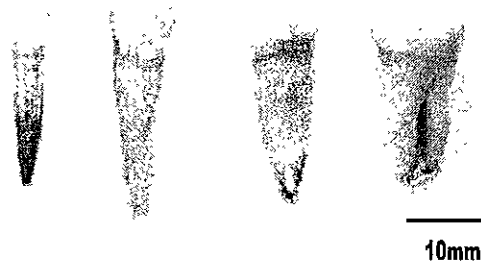


Figura 11: Observación de los requerimientos de los especímenes dentales para su procesamiento.

VARIABLES DEPENDIENTES

- Unión amelodentinaria
- Esmalte adyacente a la unión amelodentinaria
- Dentina adyacente a la unión amelodentinaria

VARIABLES INDEPENDIENTES

- Esmalte superficial
- Unión dentina-pulpa
- Unión cemento-esmalte
- Unión cemento-dentina

CRITERIOS DE INCLUSIÓN.

- Premolares obtenidos de pacientes de entre 10 y 30 años de edad.
- Dientes erupcionados o incluidos.
- Dientes libres de procesos cariosos.
- Dientes libres de restauraciones.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.

- Dientes con proceso carioso.
- Dientes con restauraciones.
- Dientes fracturados.

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN.

- Muestras que se fracturaron al momento de su procesamiento.

A. PROCEDIMIENTO

Se registró el nombre, edad, sitio y motivo por el cual se extrajo el diente.

1. Limpieza y Preparación de las Muestras.

Las muestras se prepararon dentro del Laboratorio de Microscopia Electrónica del Departamento de Materia Condensada. Para realizar el estudio se emplearon diferentes técnicas de microscopía como la fotónica, electrónica de transmisión y de barrido, así como el análisis químico por medio de difracción de rayos X, el cual se llevó a cabo en el microscopio de transmisión. Cada una de las técnicas requirió de la preparación de muestras siguiendo la metodología específica propia, teniendo etapas en común pero obteniendo especímenes acordes con las necesidades de cada una de ellas.

Primero se limpió el diente de todo el tejido adyacente, como ligamento periodontal y encía, con el uso de una espátula de lecrón afilada cortando los restos macroscópicos de manera que tanto la corona como la raíz quedarán libres de estos, posteriormente se tallaron con un cepillo dental y detergente líquido para eliminar los restos sanguíneos y de saliva. Devolviendo el diente al medio húmedo donde permanecieron hasta su procesamiento.

Se preparó un cajón de acetato de forma columnar de 10 x 10 x 20 mm. el cual no contaba con una de las bases para vaciar la mezcla de poliacrilato de metilo (acrílico autopolimerizable), la mezcla se realizó colocando polvo en un godete de vidrio con goteo del monómero hasta obtener una mezcla proporcional, se vació en el cajón de acetato hasta los dos tercios de su capacidad, se introdujo la raíz dental en el acrílico hasta la polimerización del acrílico, esto con la finalidad poder manipular y prensar bien el diente para su corte en la recortadora con disco de diamante. En este paso se separaron las metodologías de cada técnica, ya que el tamaño y disposición del espécimen durante el corte es diferente para microscopía electrónica de transmisión (MET) y de barrido (MEB).

2. Corte de las Muestras

Por medio de una recortadora con disco de diamante (este disco carece de dientes) se realizaron los cortes de los dientes obteniéndose varias muestra, para lo cual el disco se posicionó de manera que quede asegurado; posteriormente se marcó con lápiz la trayectoria que tuvo éste en el diente para recortar la muestra de tal forma que quedara centrada la unión amelodentinaria. El bloque de acrílico se fijó en el portamuestras de la recortadora, el cual se montó en la base de la recortadora, se dirigió hacia el disco de diamante quedando paralelo al eje longitudinal del diente y deteniendo el portamuestras a la base por medio de tornillos, en sentido horizontal unidimensional, de tal manera que la muestra avanzó hacia el lado izquierdo o derecho los milímetros necesarios para coincidir el eje del disco con el del diente. Se apretó la palanca fijadora de este dispositivo para evitar que en el momento del corte la muestra pudiera correrse a los lados y llegar a fracturar el disco de diamante; se colocó lubricante en el depósito de la recortadora, que cuenta con una bomba con un regulador de corriente, para que de esa manera no varíará la velocidad de bombeo expulsando la cantidad de lubricante requerida para la zona de fricción al momento del corte, el lubricante baña el diente en la zona de corte, controlando el chorro de agua. Se colocó el capelo como una medida de protección. Es importante que la muestra quede separada del disco de diamante por lo menos 2mm. al inicio del corte, esto a causa de la fragilidad del disco, se regula la velocidad del giro del disco de diamante a 1000 RPM, las revoluciones por minuto se indican en una pantalla digital. La distancia empleada para las muestras fue de 0.3mm/min.

En el caso de los especímenes para MET esto se repitió realizando cuatro cortes perpendiculares entre sí, formando una figura cuadrada centrando la trayectoria de la unión amelodentinaria, posteriormente se acomodó la

muestra de tal manera que se realizó un corte paralelo al primero con una profundidad de 2.0mm desprendiendo el segmento deseado.

Para la obtención de muestras de MEB se realizaron cortes que mostraron la trayectoria de la unión, no importando la forma del perímetro ni el grosor, siempre que la muestra no excediera 1 cm³, ya que esta técnica se basa en la observación de la superficie de la muestra. No obstante se pueden emplear los cortes para transmisión también para barrido.

Se colocaron las muestras en un portamuestras de cristal y se observaron en el microscopio fotónico "Zeiss" con luz transmitida y difractada con objeto de detectar la presencia de fracturas en la estructura dental que pudieran hacer fracasar el procesamiento de la muestra (cuando la muestra no era apta para procesarse se eliminaba y se reemplazaba con otra).

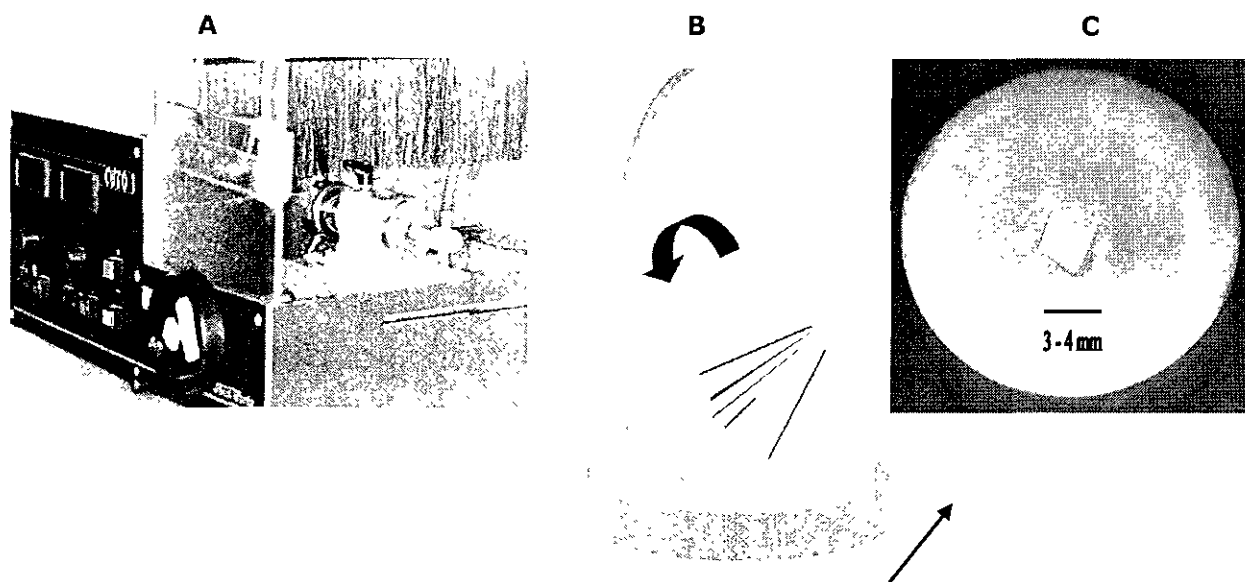


Figura 12: a) Se observa la cortadora con disco de diamante. b) Esquematación de su funcionamiento. c) Muestra ya recortada con la unión amelodentinaria en el centro fijada a un portamuestra.

3. Pulido de la Muestra

El siguiente paso en el procesamiento de las muestras de transmisión fue el desgaste hasta obtener un grosor de 100-120 μ m ya que se contaba con 2.00mm, para esto se monta el espécimen en el centro de un portamuestra fijándolo con una porción mínima de resina termoplástica en una plancha a temperatura de 300° C, esperando a que se derritiera para extenderla en forma uniforme por medio de la punta de un palillo de madera, ya realizado esto se colocó la muestra sin importar la cara que quedara en contacto con la resina y se retiró de la plancha con unas pinzas porta tubo de ensaye colocando en una placa de metal donde se dejó enfriar y de esa manera fijar el espécimen al portamuestra. Se coloca el portamuestra en la pulidora orbital "Buehler", se procedió al pulido de la muestra por medio de lijas de diferentes granos, empezando con las del número 1200 o 1500, se le añadió agua bidestilada hasta obtener un nivel de 5 a 8 mm. ésto con el fin de reducir el calentamiento por fricción al momento del desgaste, así como el de evitar la saturación del grano de la lija con el material desgastado, se dejó cuarenta segundos, posteriormente se apago girando la perilla en forma contraria. Se cambió la lija por una del número 4000 y se dejó pulir por espacio de diez minutos, debiendo quedar a la observación bajo el microscopio sin ralladuras ya que la muestra queda con una apariencia lisa y brillante, de no ser así se deja por espacio de cinco minutos puliendo hasta alcanzar el terminado deseado.

Posteriormente se reemplaza la lija por un paño y líquido para pulir con la finalidad de eliminar por completo asperezas y rayaduras de la superficie y crear lo que se le denomina "terminado a espejo".

Ya realizado esto se procedió a colocar el portamuestra en la plancha térmica dejando fundir la resina, y con unas pinzas finas se retiró la muestra

y se volteó colocando la cara pulida hacia la resina, se retiró el portamuestras y se dejó enfriar en la placa metálica por espacio de cinco minutos, se colocó la lija de 1500 en el círculo de cristal y se acopló el portamuestras para iniciar el desgaste de la cara contraria, este desgaste se revisó cada dos minutos con el fin de evitar que se adelgazara la muestra demasiado y no fuera funcional o llegará a la pérdida total de esta.

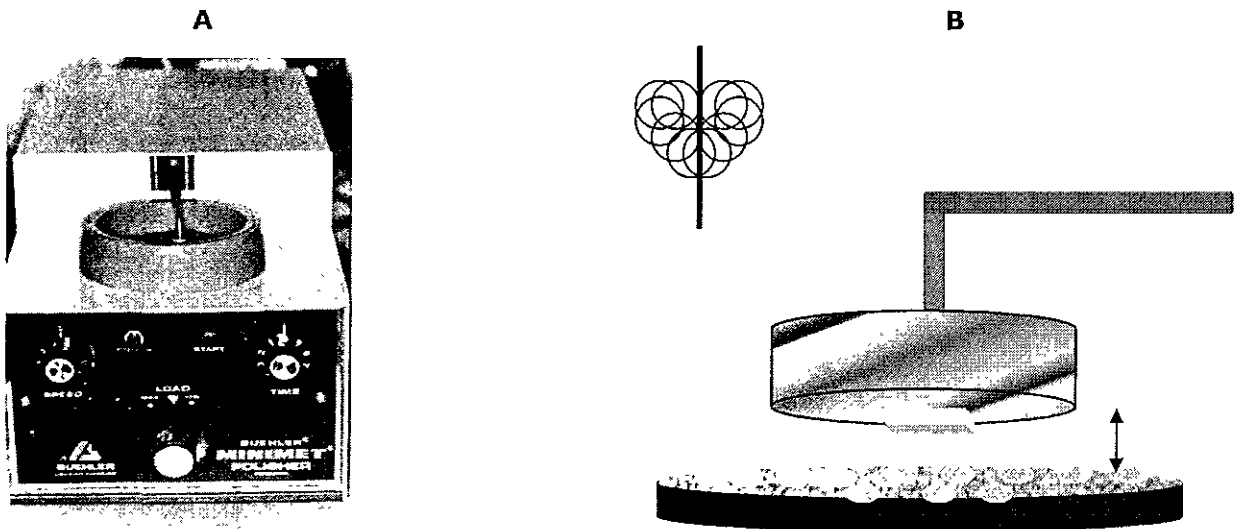


Figura 13: a) Pulidora orbital "Buehler". b) Esquematación del funcionamiento de esta durante el pulido de la muestra.

Se retiró la muestra en cada revisión y se observó al microscopio con la finalidad de medir el espesor, esto se realizó enfocando el portamuestra con el objetivo de 20X y tomando la medida en el tornillo macrométrico, para posteriormente enfocar la muestra en la porción central a la altura de la unión amelodentinaria. La medida exacta del grosor se obtuvo restando la medida de enfoque del portamuestra a la de la muestra, esta medida es en micras y se debe de ir verificando hasta alcanzar un grosor de 100 a 120 μm , se continuó puliendo con la lija de 4000 hasta alcanzar la eliminación de rayaduras y se pulió con el paño y el líquido de pulir obteniendo el

“terminado a espejo”, ya obtenido este se calentó el portamuestras en la plancha térmica para desprender la muestra que se colocó en un portaobjetos de cristal con el fin de limpiarla con sumo cuidado con alcohol isopropílico por medio de dos pinceles finos, con la finalidad de retirar los excedentes de resina de la superficie para que al medirla en el microscopio óptico nos diera el grosor exacto de la muestra, valor que debemos de anotar. Cabe mencionar que fue prudente el tomar fotografías en el microscopio óptico, tanto con luz transmitida como difractada, esto por medio del sistema fotográfico integrado a dicho microscopio.

4. Desgaste de la Muestra

Como punto siguiente en la preparación de muestras de transmisión se colocó una rondana con grosor de 12mm en la plancha térmica y en cuyo centro descansó un portamuestras de acero inoxidable del sistema de preparación de muestras digital (dimpler), el cual posee una forma circular en cuyo centro se depositó una fracción de resina que al derretirse se extendió para colocar la muestra con la mejor cara hacia la resina, centrando la unión amelodentinaria ya que en este sitio se realizó el desgaste, se retiró el portamuestras colocándolo en la placa metálica y se puso una pesa de bronce sobre la muestra que permitió presionarla para que descansara de una manera uniforme en el portamuestras, que ayudó a eliminar el excedente de resina por debajo de la misma, ésta se dejó enfriar para posteriormente retirar la pesa con mucha delicadeza, se llevó el portamuestras al microscopio y se midió la altura de la muestra con resina, para que al restar la medida obtenida de la muestra limpia obtuviéramos el grosor de la resina y de esta manera tener control exacto de la muestra, dentro del procesamiento de las muestras se observó que en promedio se obtuvieron grosores de 10 μ m.

Se procedió a colocar el portamuestras en su base, también de acero inoxidable, con el cual embonaba al introducirse y descansar en una perforación de este fijándolo, se verificó el correcto asentamiento de ambos para evitar movimientos de vaivén al momento de desgastar la muestra.

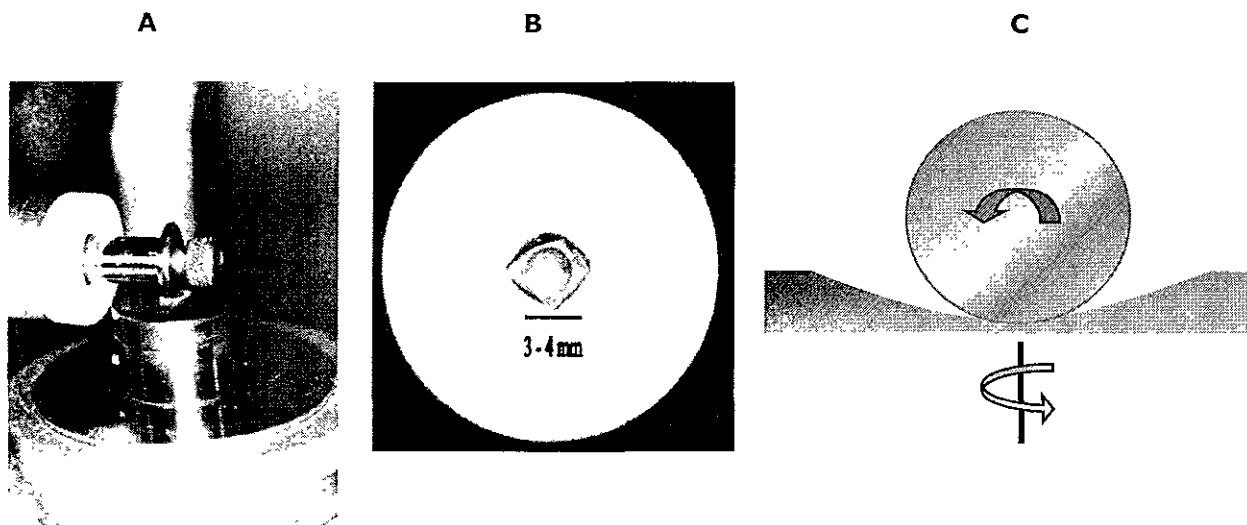


Figura 14: a) Parte activa del dimpler. b) Apreciación del desgaste cóncavo en una muestra. c) Esquema del funcionamiento del aparato.

Se montó el disco de acero inoxidable de menor grosor en el mandril del dimpler, se fijó poder colocar el portamuestras en la base giratoria sin centrarlo, descansando el disco en una zona adyacente a la muestra y encendiendo una lámpara de escritorio dirigiendo el haz hacia la pared, para que con ayuda de una lupa se observara el espacio que se encontraba entre el borde del disco y la superficie del portamuestra. Se encendió el dimpler y dependiendo si estaba pegado o separado el disco, se ajustó la altura de modo que el disco apenas descansó en el portamuestras. Se calibró el dimpler, se centró el portamuestra en la base deteniéndolo con un aro que une a ambos. Se bajó el disco hasta el punto en que este tocó la superficie de la muestra cuya medida que se lee en la pantalla digital del dimpler

debiendo de ser similar a la obtenida por medición en el microscopio óptico, y se continuó con la calibración manual.

Se colocó dos o tres gotas de solución de pasta de diamante con grano de $6\mu\text{m}$ dispersa en dialub, por encima de la muestra. Una vez calibrado el equipo se inició el desgaste con el descenso de un sensor que sostiene toda la porción superior del dimpler, pudiendo verificarse con la disminución de la cifra en la pantalla, además se tuvo que detener el desgaste cada $25\mu\text{m}$ con la finalidad de ir controlando en el microscopio fotónico el desgaste de la muestra, el cual debe de hacer una concavidad homogénea, centrada, circular y con los trazos correspondientes al borde del disco, los cuales no deben de ser muy marcados (más allá de las $10\mu\text{m}$) entre cada revisión la muestra se lavo y limpio con agua bidestilada, pinceles y un paño de algodón. Basándola en el centro de la concavidad. Una vez verificado el buen desgaste de la muestra y anotada su altura se regresó a la base del dimpler esto hasta que la medición bajo el microscopio fue de $18\mu\text{m} \pm 2\mu\text{m}$, ya que al restar el grosor de la resina el espesor de la muestra oscila entre las $8\mu\text{m}$, valor ideal para su procesamiento en el erosionador ionico "ion mill". Se limpiaron las muestras y se cambió el disco de acero inoxidable por el de fieltro, sustituyendo la solución de pasta de diamante por suspensión de pulido a base e silica coloidal "Buehler" y disminuyendo la velocidad de giro tanto de la base como del disco a su mínima posibilidad, dejando pulir por espacio de diez minutos para su retiro y limpieza de la muestra, con el fin de eliminar o por lo menos suavizar las líneas de desgaste del disco de acero, modificando en lo mínimo el espesor.

En este momento se preparó el material para el montaje de la muestra en una rejilla de cobre con perforación central oval, mediante resina epóxica catalizable obtenida con una gota de cada componente (base y catalizador), mezcladas por medio de la punta de un palillo de madera, posteriormente se

colocó la rejilla de cobre en el portaobjetos y se llevó a la platina del estereoscopio "Baush & lomb" enfocándola, con la ayuda de un palillo limpio se sujetó y con otro se tomó una porción de la mezcla que se extendió en una superficie de la rejilla tomándola con las pinzas de punta extrafina de la periferia, volteando la cara con resina hacia abajo y trasladando hacia la muestra para montarla sobre esta, alineando la unión amelodentinaria con el eje mayor de la perforación de la rejilla, esperando hasta que endureciera la resina, fase que tarda 10 minutos aproximadamente, tomando en cuenta la mezcla sobrante como testigo. Consecutivamente se separó la rejilla del portamuestras del dimpler, por medio de calor se derritió la resina termoplástica sin alterar la epóxica dando cabida a retirar la muestra montada y colocarla en un portaobjetos de cristal con la rejilla de cobre tocando el cristal, se eliminó la resina termoplástica con alcohol isopropílico y el uso de los pinceles dejando que se gasificara el sobrante de alcohol.

Ya limpia la muestra se procedió bajo la observación en el estereoscopio a pintar la periferia de esta que estuviera en contacto con la rejilla de cobre con pintura de plata para microscopía electrónica, esta pintura tiene la función de volver a la muestra conductor eléctrico, ya que por su composición es aislante y estar separada de la rejilla por la resina epóxica, no permitiendo el paso de los electrones a través de ella al momento de su observación por técnica de microscopía electrónica de transmisión.

Fue conveniente realizar el montaje, limpieza y pintado de la muestra bajo la observación en el estereoscopio, ya que nos dio un mayor control en el manejo, evitando la fractura de la muestra y reduciendo el riesgo de mancharla con pintura de plata que se debiera quitar con el uso de acetona.

5. Erosión Iónica de la Muestra

Ya pintada la muestra el siguiente paso en el procesamiento fue el adelgazamiento de la muestra por medio del erosionador ionico "ion mill", constituido por cámara de vacío que hace incidir en el centro de la muestra dos haces de electrones generados por dos cañones. Para este proceso es necesario colocar la muestra, la cual ya esta montada en la rejilla de cobre en el portamuestras especial de este aparato, el cual tiene dos platos circulares con la perforación central ideal para prensar a la muestra que se coloca entre estos, y los que a su vez se fijan a los pilares del portamuestras. La fijación de la muestra debe de realizarse con guantes de plástico ya que como el proceso se lleva a cabo en una cámara de vacío, si se contamina con la grasa de las manos tardará más en obtenerse el vacío, retardando el proceso, no siendo necesarios para el manejo del equipo. Ya fijada la muestra se trasladó a la cámara del ion mill que cuenta con una tapa de acero con una ventana de vidrio para la observación de la muestra durante su procesamiento. También tiene una bomba difusora, que da inicio el funcionamiento del equipo, verificando el vacío realizado en la aguja del medidor que se localiza en la parte más superior derecha de la consola la cual debe de indicar como mínimo 20 militorr para poner en funcionamiento la bomba mecánica "B" la que se enfría con el flujo de agua, esta tiene la finalidad de enfriar la bomba difusora evitando su sobrecalentamiento y mal funcionamiento, para la bomba "B" se depositó aproximadamente 300mL de nitrógeno líquido en el "dedo frío" el cual se localiza en la parte central superior del ion mill elevándose como un cilindro de acero inoxidable pulido con una tapa plástica donde se depositó el nitrógeno tapándolo y esperando que la bomba "B" empezara a realizar un mayor vacío que se registró en el medidor del lado izquierdo hasta alcanzar la aguja 10^{-6} torr. Este proceso requiere de un tiempo variado, dependiendo del grado de impurezas que se localice tanto en la muestra como en el portamuestras oscilando de los

sesenta a los ciento cincuenta minutos. Ya alcanzado el vacío es conveniente bajar la muestra a la cámara donde se encuentran los cañones, para esto se presionó el interruptor "air lock", bajando y colocándose en su sitio, se presionó el interruptor de rotación del espécimen con lo que la muestra comienza a girar de manera lenta para que los haces de electrones desgasten en una forma uniforme, se abrió la llave del tanque de argón y consecutivamente la de paso para permitir el acceso de este a la cámara de vacío regulando el paso por medio de dos válvulas, cada una de ellas con dos reguladores, uno de entrada y otro de salida, las cuales se dirigen a cada uno de los cañones, su función es el permitir crear plasma que forma y traslada el haz de electrones para el desgaste de la muestra con esto va a caer el vacío pero se debe regular de manera que se mantenga estable en 10^{-4} Torr. para de esta forma tener control del desgaste.

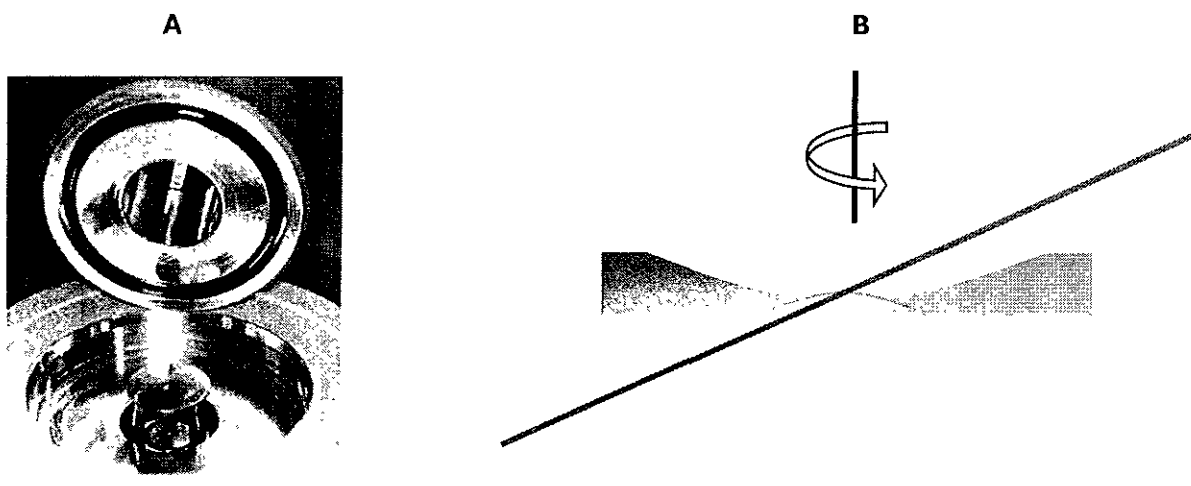


Figura 15: a) se observa la porción del portamuestras y la tapa de la cámara de vacío del ion mill. b) Esquema de la interacción del haz de electrones con la muestra para su erosión central hasta obtener el grosor de 0.5 a 1.0 μm .

Se estableció el tiempo que se pensó hubiera erosionado la muestra, por lo general se determinaron cuatro horas y se presionó el botón rectangular bajo la perilla rotulado como *"star - stop"* dando de esta manera inicio al desgaste el cual se cercioraba mediante la visualización de los haz de electrones incidiendo el centro de la muestra de color morado - violeta, de no ser así se debía de permitir el paso de un poco más de argón a la cámara sin que se perdiera el vacío.

Fue importante aquí el regular tanto el paso de argón, el voltaje, que no sobrepasara los 6KV y el miliamperaje, el cual no debió subir más allá de los 3.5 mA. Se observó que el desgaste realizado en las muestras de unión amelodentinaria por erosión iónica fue de $0.83\mu\text{m}$ por hora, por lo que como ya se conocía el grosor central de la muestra se dejaba desgastar hasta estar cerca de su perforación, donde se revisaba cada hora para cerciorarse de esta y no permitir que el mismo desgaste iónico friccionara los bordes y se perdieran las porciones más delgadas, recordando que para la observación de microscopía electrónica de transmisión es necesario un grosor menor a $1\mu\text{m}$, la revisión se realizaba mediante el cese de rotación de la muestra, el paro del haz con la presión del botón *"star - stop"* y su elevación para que con el estereoscopio se revisara sin sacar la muestra del vacío, o retirando el portamuestras mediante la presión del botón denominado *"vent"* que se encuentra junto a la ventana y retirando la tapa, desenroscando el portamuestras y observándolo bajo el microscopio fotónico; esto se realizó con guantes para evitar que al regreso de la muestra se perdiera tiempo realizando el vacío por la gasificación de las grasas y aceites, para volver a erosionar se colocaba el portamuestras y se tapaba, presionando el botón *"vac"*. El proceso llevó varios días cuyo promedio fue de cuatro y después de cada ciclo de desgaste diario fue necesario el apagado del equipo, el cual se realizó primero apagando la rotación de la muestra, el interruptor de alto voltaje y el de la bomba "B", además del cierre de las llaves del tanque de

argón, dejando enfriar la bomba "A" por espacio de 60 a 90 minutos. Ya lograda la perforación en el centro de la muestra que nos permitiera la observación por MET se desmontó la muestra del portamuestras del ion mill retirando la muestra con las pinzas finas, para posteriormente devolver el portamuestras a su lugar.

6. Recubrimiento de carbón

Se colocó la muestra sobre papel filtro. El siguiente paso fue el sombreado con carbón para lo que se depositó la muestra en la base de la cámara de vacío con filamentos de carbón ("sputter" evaporadora de carbón) colocando en su sitio el cilindro de acrílico transparente y por encima de este la tapa circular con dos terminales eléctricas, en las que se colocó previamente uno o dos filamentos de hilo impregnados con carbón fijándolo en un extremo para tensarlo y fijarlo en el otro, se verificó que estuviera la válvula de acceso del aire cerrada y la perilla de voltaje en cero, iniciando primero con el arranque de la bomba mecánica de vacío, el cual se verifica en el medidor frontal debiendo oscilar entre los 50 militorr lo cual va a llevar un promedio de noventa minutos para lograrse y para después de ello girar la perilla de voltaje hasta la graduación treinta, dejando pasar la corriente por el filamento desprendiendo el carbón que se evapora y cae sobre la muestra, esta capa de carbón creó una delgada película que hace conductora a la muestra para que permita el paso de electrones durante la observación en el MET, se saca la muestra, para lo cual se requiere de apagar la bomba de vacío e introducir aire a la cámara de vacío de manera delicada (ya que si se deja entrar el aire de forma brusca puede llegar a moverse la muestra causando fracturas), la muestra se sombreó por ambos lados.

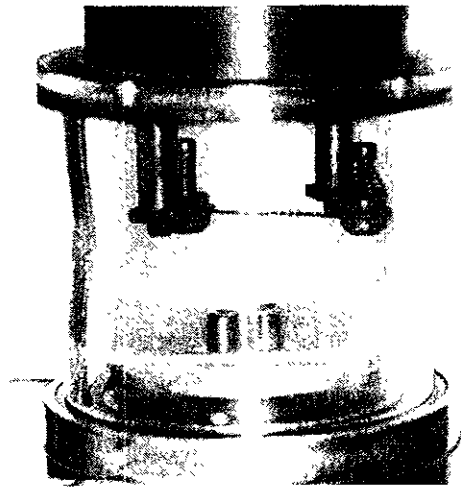


Figura 16: Cámara de vacío del "sputter" donde se colocan las muestras para evaporar y depositarles carbón en toda la superficie.

Este fue el último paso para el procesamiento de una muestra para observación por MET, cabe mencionar que el proceso tardo por cada muestra aproximadamente de dos a tres semanas, el corte, pulido, desgaste mecánico y montado de la muestra y en los sucesivos la erosión iónica. También se debe de considerar el tiempo de muestras que en cualquier paso fracasaron, ya sea en la mayoría de los casos por fracturas o algunas otras por pérdidas de las mismas, perforaciones realizadas por desgastes excesivos y alteraciones en el material por un desgaste iónico exagerado, debido al amplio grosor.

7. Observación al MET

A partir de este momento la muestra puede colocarse en el portamuestras del microscopio y observarse, si por el grueso de los bordes no es posible su estudio se puede retornar al proceso en el ion mill y desgastar por espacio de una o dos horas, adelgazando los borde y sombreando posteriormente al espécimen para su correcta observación.

La observación en el microscopio electrónico analítico de transmisión JEOL 100 CX se basó en normas y reglas regidas en el manual de dicho microscopio, realizado por el laboratorio de Microscopía II del Departamento de Materia Condensada del IFUNAM junto con la empresa Jeol, fabricante del aparato (Reyes, 1995).

8. Revelado de Negativos y Preparación de Hojas de Contacto.

El revelado de los negativos de MET se realizó en el cuarto oscuro del mismo laboratorio de microscopía electrónica, empleando luz de seguridad se desmontaron las películas del chasis de los microscopios y se colocaron en un rack porta películas el cual se sumergió en revelador 2 minutos, se pasó a enjuagar en un recipiente bajo el chorro del agua durante 5 minutos para pasar al contenedor del fijador durante 7 minutos y regresar a un segundo enjuague para terminar el proceso con la inmersión en foto-flu durante 2 minutos y meterlos en el horno de secado a base de aire por 30 minutos, sacándolos y guardando cada negativo dentro de una bolsa de plástico para su conservación; Se estudiaron los negativos para la elección de segmentos o la totalidad de estos que se amplificaron en papel fotográfico multigrado marca Ilford.

B. PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA MEB.

En cuanto a la elaboración de muestras de barrido ya se fijaron los parámetros para el corte del espécimen; después de obtener el corte deseado para la observación se debe de secar la muestra, ya que se utilizó agua como lubricante en la recortadora, se coloca en el fondo de un vaso de precipitados de 20mL y se vaciaron 5mL de ácido fosfórico al 20% por medio de una pipeta de cristal dejándolo actuar por espacio de 60 segundos, al término de este lapso se colocó bajo el chorro de agua por espacio de 10

minutos. Debiendo poner una malla de bronce en la boca del vaso para evitar que se saliera la muestra. Ya realizada la desmineralización de la superficie de la muestra se seca ésta con un trapo de algodón y se coloca sobre un portaobjetos para observarla en el microscopio fotónico y constatar la revelación de los componentes estructurales.

Se colocó la muestra en un vaso de precipitado no importando el tamaño de éste, al cual se le incorporó acetona cubriendo la muestra y elevando el nivel 2cm. más. Se llevó el vaso de precipitado hasta el vibrador ultrasónico depositándolo sobre un aro de hule (no sobre la tina de acero inoxidable ya que por la vibración se puede llegar a fracturar el cristal). En este equipo se tienen varios aros de hule de diferentes tamaños y una cantidad de agua de aproximadamente 2 litros, la cual conduce la vibración hacia el cristal y la acetona, se deja funcionar por espacio de 15 minutos, transcurridos este tiempo se retira el vaso de precipitados y se toma la muestra con unas pinzas para depositarla en una caja de Petri pequeña y limpia previamente, donde se deja evaporar la acetona excedente. Este proceso tuvo la finalidad de retirar partículas de impurezas de la superficie, así como restos del material desmineralizado de la propia muestra, por lo que el manejo de ésta, a partir de este momento debe de realizarse con precaución evitando su contaminación.

El montaje de estas muestras para su observación por medio de MEB es a través de un cilindro de cobre (más usual) usado como apoyo y fijación para su incorporación a la cámara de vacío del microscopio electrónico de barrido, y se realiza limpiando perfectamente el cilindro con acetona y un trapo de algodón, se deja secar y se le deposita en una de las bases una porción de pintura de plata para microscopía electrónica de la que se usó para pintar la unión de la muestra y rejilla. Se tomó la muestra de barrido con las pinzas y se colocó con la superficie que se deseó observar dirigida hacia arriba,

deteniéndola por un minuto en lo que la pintura de plata seca para transportar la muestra a la sombreadora de vapor "sputter" y realizar el proceso de sombreado que ya se detalló, con la variante de que solo se evaporó carbón por un lado, se verificó el sombreado uniforme y se limpió el equipo. La muestra en este momento ya estuvo lista para su observación por MEB debiendo al igual que las muestras para MET ser guardadas en un recipiente cerrado para evitar su contaminación.

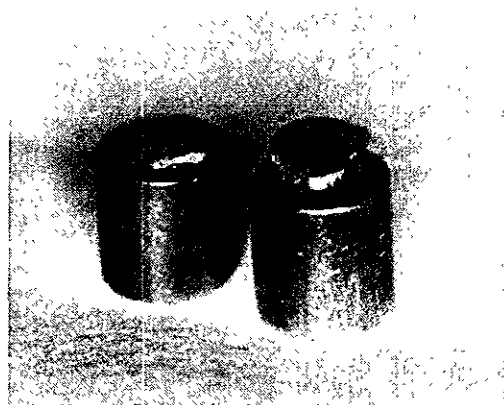


Figura 17: El montaje de muestras para MEB se realiza con cilindros de cobre, unidos mediante pintura de plata y recubiertos con una fina capa de carbón que se constata por el cambio de color en la base.

1. Observación al MEB.

La observación por MEB se llevó a cabo con el microscopio JEOL 5200 con resolución de 100 angstroms, el cual esta a cargo de la Maestra en Física Jacquelin Cañetas.

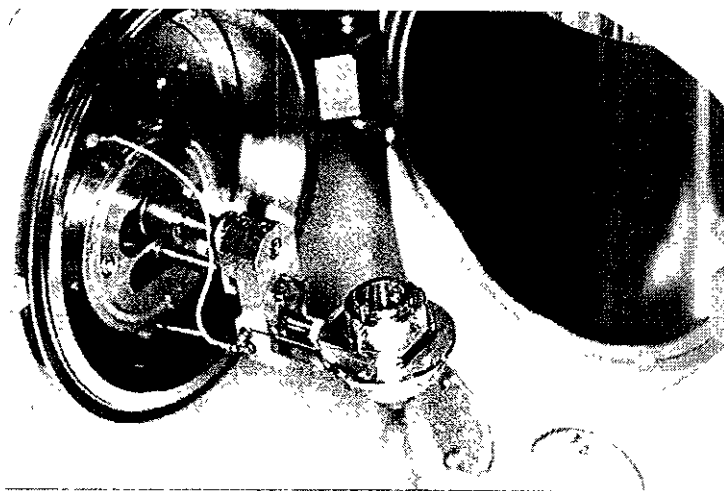


Figura 18: Base del MEB donde se fija el portamuestras de cobre para la observación.

La muestra se deposita en el portamuestras del microscopio de barrido, para introducirla en la cámara de vacío y obtener el vacío adecuado, se incrementa el voltaje y se comienza a observar la imagen de la superficie a la menor ampliación (35x). Este microscopio cuenta con dos pantallas fluorescentes, en las cuales, en una de ellas se puede observar la muestra a menor ampliación, la cual es posible mover por medio de aditamentos; en la otra pantalla, se observa una mayor ampliación bien definida y contrastada. Las ampliaciones predeterminadas que podemos observar son 35, 50, 200, 350, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 3500, 5000, 7500, 10000, 12000, 15000, 20000, 30000, 35000 y 50000 x.

Las observaciones deseadas se guardan en la memoria del microscopio para posteriormente si interesan tomarlas en película fílmica (negativos) los cuales se revelaron.

2. Revelado de Negativos de MEB

Los negativos se revelaron en el cuarto oscuro del Laboratorio de Microscopía mediante un rack porta películas que se sumergió en revelador por 2.45 minutos, se colocó bajo el chorro de agua por 5 minutos para pasarlo a fijador por un lapso de 8 minutos volviendo a enjuagarse por 5 minutos y pasar a foto-flu durante 1 minuto, introduciéndolos a un horno de secado por medio de aire por un lapso de 30 minutos para guardarse dentro de bolsas de plástico evitando se contaminen y dañen. El revelado de este tipo de películas debe de realizarse en una oscuridad total, ya que no toleran ni un mínimo de luz de cualquier tipo incluyendo la de seguridad, de otro modo los negativos presentarán un velo de color gris en toda su superficie depreciando la calidad de la fotografía.

Además de esta facilidad el microscopio nos da una impresión en papel térmico de buena calidad que nos ayuda en elección de material para su impresión en papel fotográfico, cabe mencionar que al momento de la observación en MEB se esta atacando la muestra con electrones, por lo que su estructura puede ser modificada en observaciones subsecuentes.

C. PREPARACIÓN DE HOJAS DE CONTACTO Y FOTOGRAFÍAS.

Posteriormente se analizaron tanto los negativos de MET y de MEB para obtener resultados de los objetivos preestablecidos y se ampliaron e imprimieron en papel fotográfico brillante las secciones de negativo que se eligieron en el cuarto oscuro, para esto se debe de trabajar solo con luz de

seguridad, montando el negativo en el porta película de la ampliadora de lentes condensadoras que se sujeta y se proyecta la imagen para dar el tamaño deseado y enfocar el grano de la película evitando la mala calidad de impresión. Se apagó la ampliadora y se sacó el papel fotográfico de su estuche, colocándolo sobre la tabla de trabajo, se selecciono un filtro por utilizarse papel multigrado y se le dio el tiempo de exposición que se obtuvo previamente por medio de una tira de exposiciones seriadas a diferentes lapsos de tiempo.

Se tomó el papel y se sumergió en revelador fotográfico especial durante dos minutos sacándolo por medio de unas pinzas para fotografía para sumergirlo en detenedor por 30 segundos, retirándolo con otras pinzas y pasándolo al fijador por espacio de 90 segundos, al termino se prendió la luz para observar la calidad de la fotografía y pasarla al deposito del agua por 5 minutos para secarla en los rodillos y dejarla frente a un ventilador para el secado total de la fotografía, en caso de no tener el resultado deseado, debe repetirse el proceso.

D. MATERIALES

1. Equipo.

Dentro de los laboratorios de Microscopía Electrónica del IFUNAM se cuenta con el siguiente equipo:

- Microscopio electrónico de alta resolución JEOL 4000 EX el cual tiene resolución punto a punto de 1.7 angstroms.
- Microscopio electrónico analítico JEOL 100 CX equipado con un sistema microanalizador de rayos X EDS-KEVEX.
- Microscopio electrónico de barrido JEOL 5200 con resolución de 100 angstroms.
- Difractómetro de rayos X SIEMENS D500.
- Pulidora orbital "Buehler" modelo Minimer con porta muestras de acero inoxidable y bases de cristal y plásticas de 6mm de grosor.
- Recortadora "Jean Wirtz" modelo Cuto 1 con disco de diamante, sistema de lubricación y enfriamiento.
- Planchas térmicas "Thermolyne" tipo 1900, con temperatura hasta de 300°C.
- Sistema de preparación de muestras digital dimpler "Fischione" modelo 2000, el cual cuenta con porta muestras de acero inoxidable y microscopio fotónico integrado.
- Calibrador para grosor de muestras en dimpler "Fischione" modelo 660.
- Microscopio fotónico "Zeiss" modelo Axiotech, de luz transmitida y difractada con objetivos de 5, 10, 20, 100X y sistema fotográfico integrado.
- Microscopio invertido "Zeiss" modelo Axiovert 25 con luz polarizada y objetivos de 10, 20, 50 y 100X, así como sistema fotográfico y de vídeo integrados.

- Estereoscopio "Baush & Lomb".
- Erosionador iónico Ion milling "Gatán" modelo 600, de doble cañón con sistema de enfriamiento de nitrógeno líquido.
- Cámara de vacío con filamentos de carbón para el sombreado de este. ("sputter" evaporadora de carbón) marca "Fullam".
- Cámara de vacío con blancos de oro, plata, platino, titanio, paladium "sputter" marca "fullam", el cual requiere de argón para su funcionamiento.
- Ampliadora fotográfica de lentes condensadoras.
- Ampliadora fotográfica de lentes dispersoras.
- Rejillas de cobre para microscopía electrónica.
- Vibrador ultrasónico marca "Brason" modelo B52H.
- Pinzas de punta extrafina para microscopía electrónica.
- Pinzas para tubo de ensaye.
- Herramienta: Juego de llaves españolas, desarmadores, llaves allen, pinzas.

2. Soluciones y Reactivos:

- Agua destilada.
- Dialub (lubricante).
- Pasta con partículas de diamante de 6 μ m (abrasivo).
- Suspensión de pulido a base de sílica coloidal marca "Bueheler"
- Alúmina (abrillantador).
- Pintura de plata para microscopía electrónica.
- Resina epóxica catalizable.
- Resina termoplástica
- Alcohol isopropílico.
- Etanol.
- Acetona.
- Argón.
- Nitrógeno líquido.
- Revelador para negativos.
- Fijador para negativos.
- Fotoflu para negativos.
- Revelador fotográfico para impresión en papel con técnica blanco y negro.
- Retenedor fotográfico para impresión en papel con técnica blanco y negro.
- Fijador fotográfico para impresión en papel con técnica blanco y negro.

3. Varios:

- Pinceles finos y medianos.
- Lijas de grano grueso (320 - 1000), y de grano fino (2000 - 4000).
- Película fotográfica.
- Papel fotográfico multigrado.
- Filtros para ampliadoras fotográficas.
- Pinzas para fotografía.
- Racks porta películas.
- Bandejas porta líquidos.
- Negatoscopio.
- Cronómetro.
- Paños.
- Franela.
- Porta objetos de cristal.
- Lupas.
- Lámparas de restirador.
- Placas de metal.
- Palillos de madera.
- Cajas de petri.
- Viales.
- Toallas de papel.
- Tijeras.
- Guillotina.

IV. RESULTADOS.

Los hallazgos encontrados en las muestras de unión amelodentinaria con las diferentes técnicas de microscopía son los siguientes:

A. MICROSCOPIA FOTÓNICA.

Una vez obtenidas las muestras para su estudio y análisis fue necesaria su revisión bajo el microscopio fotónico, esto nos permitió establecer que la unión amelodentinaria se encontrara bien centrada (fig 19.a). Una vez pasadas las muestras por espacio de 18 horas al ion mill (desgaste iónico), se perdió parte del material inorgánico, permitiendo con ello la permanencia y observación de material proteico. Se encontró que en la unión amelodentinaria existe una zona de transición muy fina entre la dentina y el esmalte con un grosor de 3 a 4 μm (fig 19.b). Con diversas técnicas de campo claro se observó la trayectoria heterogénea de la unión, así como la dirección de los túbulos dentinarios. La técnica con luz polarizada permitió observar que las prolongaciones de los odontoblastos atraviesan la unión amelodentinaria internándose en el esmalte dental con longitudes que van de 20 a 60 μm (fig 19.c). También se observó la presencia de agrupaciones fibrilares denominados "*penachos*" (por su organización; figs. 19.b y 19.c) compuestos de material proteico, los cuales fueron revelados solo después del desgaste selectivo hacia los prismas del esmalte por el ion mill. Estos penachos parten de la unión amelodentinaria y siguen la disposición de los prismas adentrándose con longitudes que van de 50 a 60 μm aproximadamente (fig. 19.b y 19.c). Estos penachos fueron localizados a distancias variables entre cada uno de ellos que van de 84 a 120 μm entre éstos. Éstas estructuras permiten mantener una íntima relación entre el esmalte y la dentina, en su parte basal se unen a la dentina por complejos de unión parecidos a los hemidesmosomas que emergen de ésta y se

proyectan al esmalte, al igual que se pueden observar uniones parecidas a las zónulas ocludens, que se presentan en los tejidos epiteliales [Junqueira y Carneiro, 1983 (figs 19.b y 19.c)]. La observación a bajos aumentos permite que se vea el trayecto de dicha unión, el cual es tortuoso y al mismo tiempo se diferencian el esmalte dental y la dentina por sus características microscópicas. Pero, no es posible caracterizar ni delimitar adecuadamente la unión amelodentinaria ni los penachos (fig. 19.d) con ésta técnica.

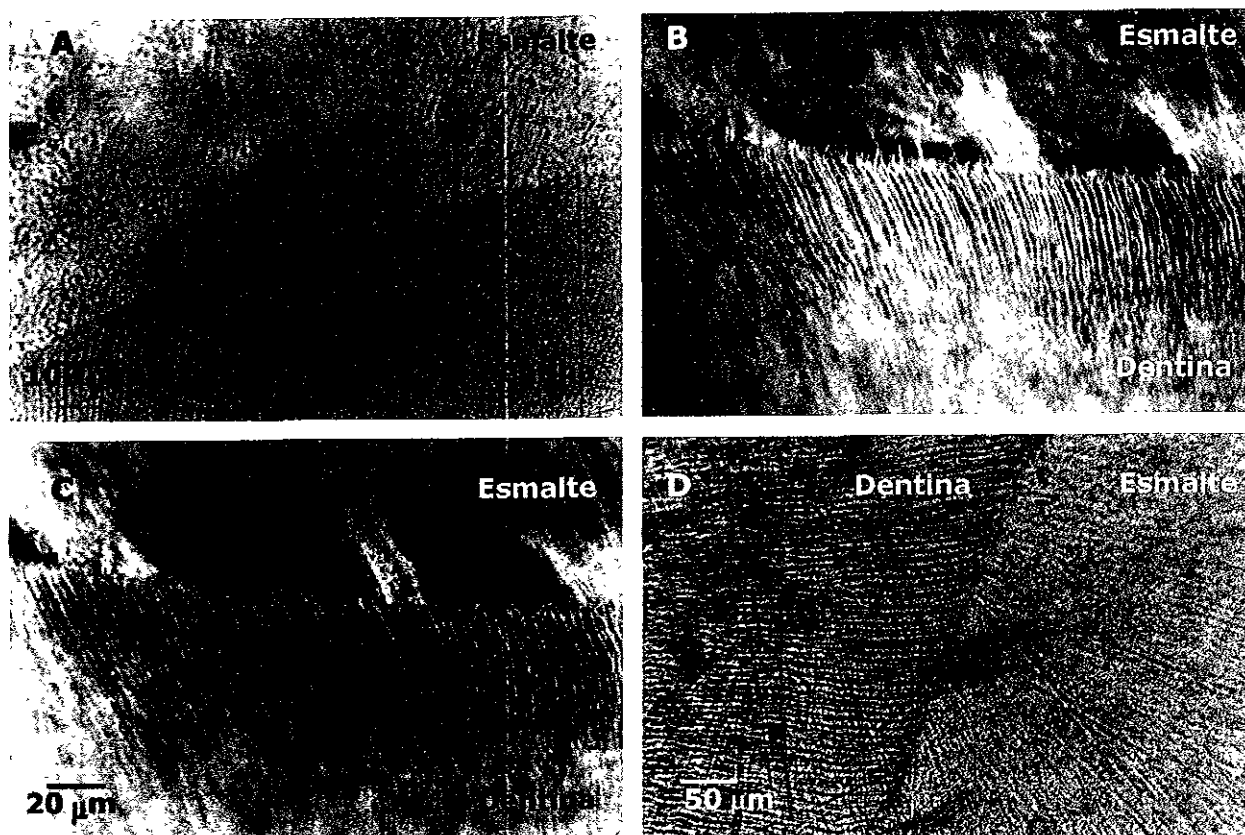


Fig 19: a) Se observa la unión amelodentinaria centrada. b) Fotomicrografía con luz difractada con técnica de campo oscuro en la que se observan los penachos y las proyecciones de los odontoblastos que se insertan en el esmalte. c) Con técnica de luz polarizada se puede observar la parte basal de los penachos que semeja un hemidesmosoma. d) Fotomicrografía con técnica de campo claro con luz transmitida, en la que se ve la presencia de los penachos y el trayecto sinuoso de la unión amelodentinaria.

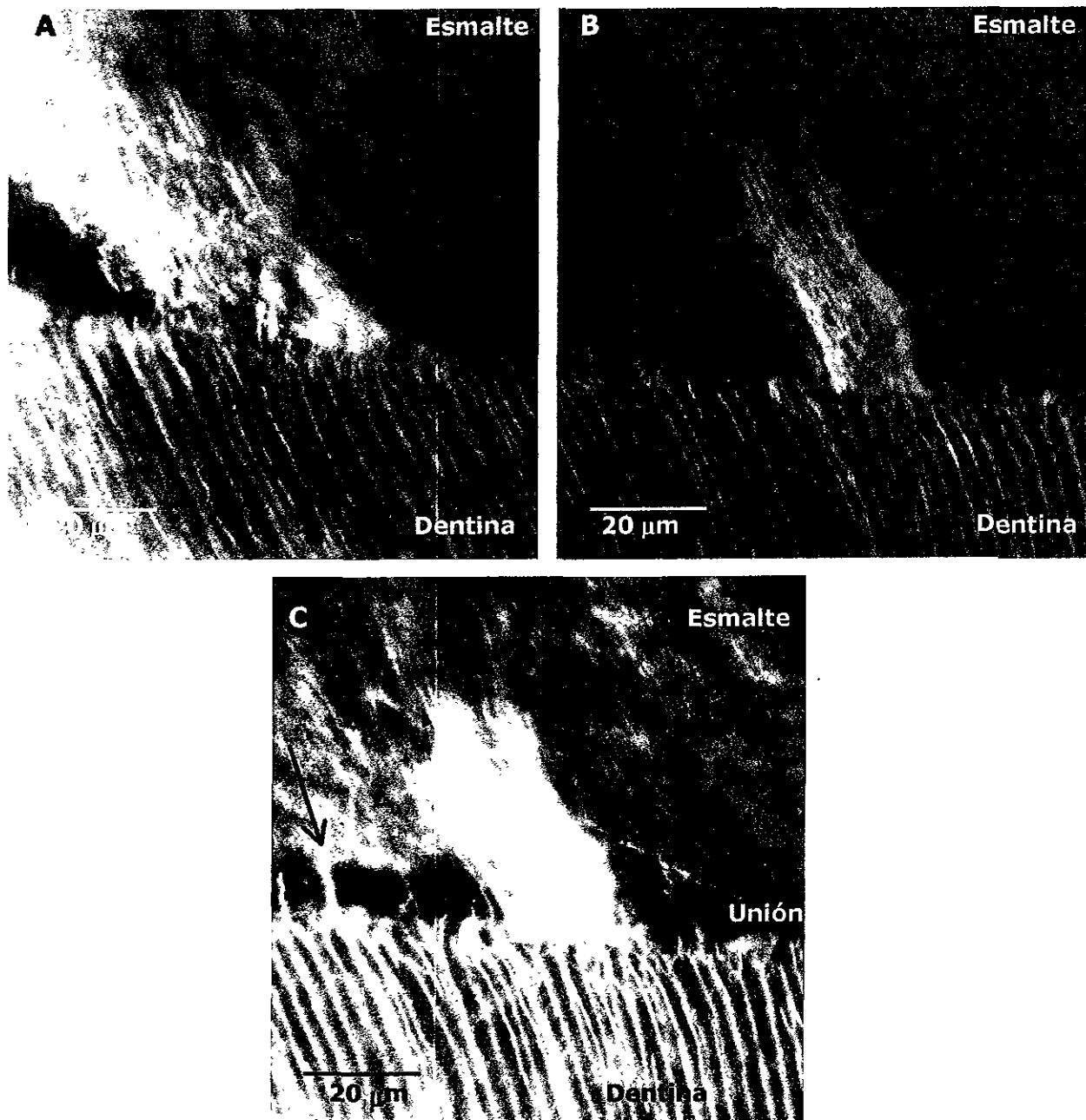


Figura 20. a y b) Amplificación de la zona de penachos de la figura anterior, con técnica de luz polarizada donde se observa con mayor detalle la estrecha relación de la base del penacho con la unión amelodentinaria, c) Amplificación de la fotomicrografía con técnica de campo oscuro donde se observa el penacho y se puede ver que su parte basal está en íntima relación con la dentina al igual que con las prolongaciones odontoblásticas; también se observa que las prolongaciones de los odontoblastos no quedan confinados en la dentina sino que se proyectan hacia el interior del esmalte (flecha), así como también se aprecia la unión amelodentinaria que semeja un espacio virtual.

B. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB).

La observación con MEB mostró aspectos superficiales de ambos tejidos, así como de la unión amelodentinaria. Con ésta técnica a un aumento de 35x, la unión amelodentinaria presenta una separación de ambos tejidos, también se pueden observar las estrías de Retzius (fig. 21.a), con aumento de 500x, la unión presentó un trayecto sinuoso, la parte del esmalte mostró la disposición de los prismas del esmalte la forma poliédrica de su base, así como el alargamiento en forma de pirámide con organización diversa ya que en el mismo corte se ven patrones transversales con disposición arbitraria de los prismas y patrones longitudinales (fig 21.b) que permiten observar la forma cilíndrica de los prismas y el acomodo paralelo de los mismos (fig. 21.c.). En tanto que en la dentina el corte mostró la presencia de una estructura muy homogénea. A ampliificaciones de 3500x la unión amelodentinaria presenta estructuras fibrilares, entrecruzadas que rodean a los prismas del esmalte adyacentes a la unión en tanto que la dentina tiene un arreglo en forma de copos de algodón (fig. 21.d).

El esmalte presentó a 350x patrones transversales y longitudinales que dan el aspecto de huellas (fig. 22.a y 22.c), a mayor aumento (3,500x) se observó que los prismas del esmalte se encuentran constituidos por múltiples cristalitos de forma poliédrica, el diámetro promedio de los prismas es de 4 a 5 μm , estos grupos de prismas se encuentran separados por espacios que posiblemente son rodeados por material proteico, el cual fue eliminado por la aplicación de ácido ortofosfórico (fig. 22.b). La misma disposición de los prismas del esmalte en la base son divergentes y hacia su alargamiento mostraron una convergencia que remata en estructuras semejantes a una "roseta" A la inspección de la unión se observó esta estructura a la que se le llamo "roseta" la cual se encontró inmediata a la unión amelodentinaria formada con prismas que convergen a un tronco

común, este tipo de estructura en el esmalte no ha sido reportada en la literatura por lo que se presume que es un punto focal de formación (fig. 22.d). Otro hallazgo importante fue lo que se observó en la separación de los tejidos, permitiendo ver la porción del esmalte con una vista axial a los prismas con lo que se denotó la disposición equiaxial de los prismas en esta perspectiva y el paralelismo de los tubulos dentinarios (fig 25.a y 25.b)

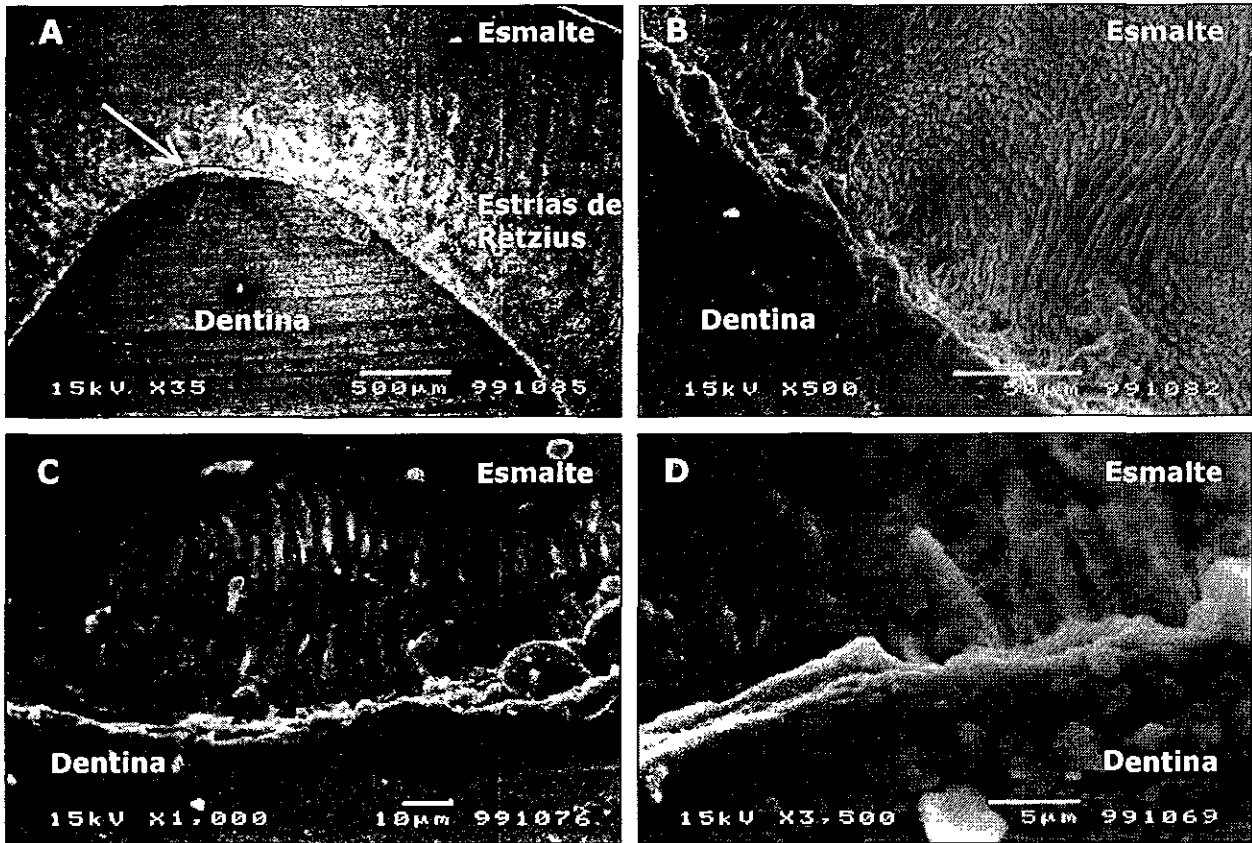


Figura 21. a) La fotografía muestra el trayecto de la unión amelodentinaria y la zona de separación de ambos tejidos (flecha), así como las estrías de Retzius. b) con un aumento de 500x se ve el acomodo de los prismas del esmalte en forma transversal y longitudinal. c) en ésta última los prismas corren en forma paralela entre sí y perpendicularmente a la unión amelodentinaria. d) con aumento de 3,500x es posible notar que los prismas están rodeados por fibras muy finas que semejan tejido blando.

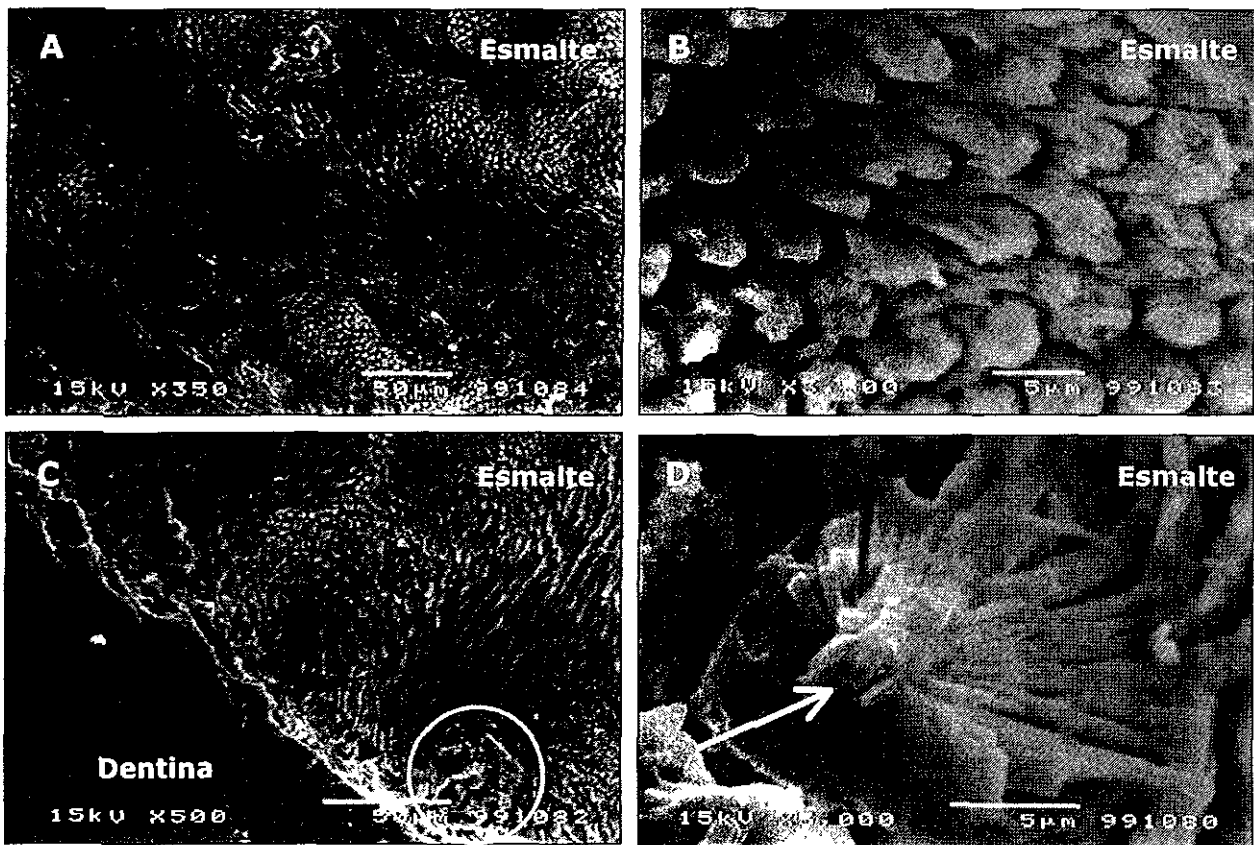


Figura 22. a y c) La superficie del esmalte da el aspecto de huellas digitales por la disposición de los prismas, los cuales en un solo corte se presentan ordenados tanto en secciones transversales como longitudinales (350x y 500x respectivamente). b) A 3,500x se puede ver con mayor detalle la forma irregular de los prismas del esmalte, así como el espacio interprismático por la pérdida de material proteíco por la acción del ácido. c) La unión amelodentinaria presenta un trayecto sinuoso, en la parte del esmalte se observa dentro del círculo una "roseta". d) La roseta presenta un punto donde convergen los prismas, los cuales se van abriendo en forma de abanico hacia la superficie del esmalte (flecha).

Al separarse el esmalte y la dentina en la unión amelodentinaria y observarse la cara interna de ambos tejidos, se encontró que el esmalte tiene una superficie rugosa, con anfractuosidades y pequeñas perforaciones de que van de 3 a 6 μm de diámetro que corresponden al espacio que albergaba a las prolongaciones odontoblásticas (figs 23.a y b). Con esta

observación se corrobora que la disposición de los prismas del esmalte es arbitraria sin seguir un patrón definido (fig. 23.c).

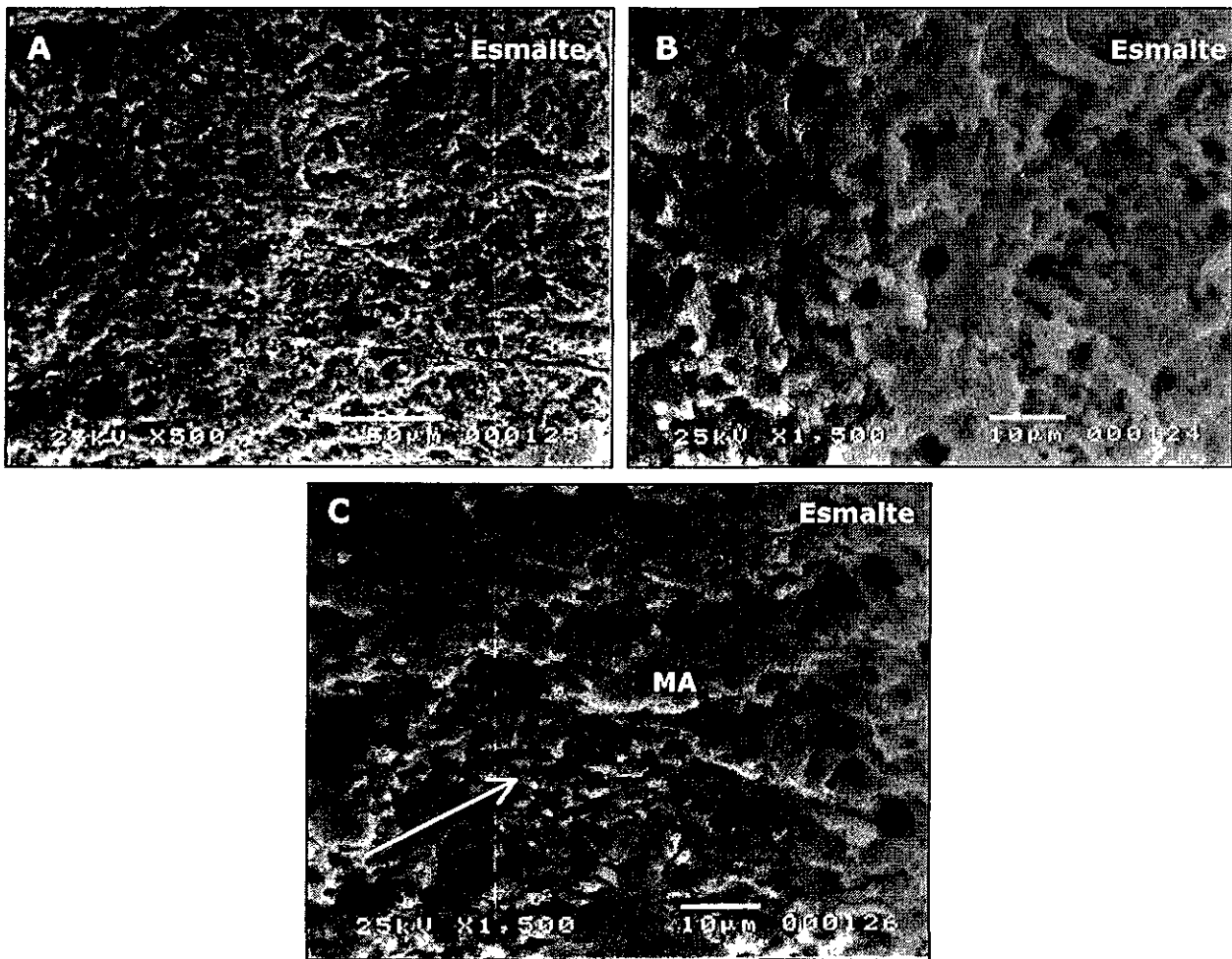


Figura 23: a) Fotomicrografía de la cara interna del esmalte que está en contacto con la dentina y que constituye la unión amelodentinaria. Se aprecia una superficie rugosa que semeja un follaje con perforaciones (aspecto no característico del esmalte dental humano). b) Detalle de las perforaciones que dejan las prolongaciones odontoblasticas dentro del esmalte, sus diámetros oscilan de 4 a 7 μ m. c) Material amorfo (MA), semejante a un cemento que permite la íntima unión de los dos tejidos entre sí; en el ángulo inferior izquierdo se aprecian las cabezas de los prismas (flecha).

En tanto que la dentina por su cara interna a la unión amelodentinaria mostró un aspecto de copos de algodón semejando un **follaje** (fig 24.a). Entre esta se observaron perforaciones de diámetros variables que van de 2 a 5 μm (fig. 24.b). A un aumento de 5000 las perforaciones son cóncavas, y sus paredes no son lisas, formadas en capas concéntricas con presencia de calcosferitas adheridas a ellas (fig. 24.c). También se encontraron que las capas de material que conforman la dentina son translúcidas denotando la presencia de fibras, que posiblemente sean colágena tipo I. El arreglo de las estructuras encontradas dan una imagen trabecular (fig. 24.d).

Es necesario mencionar que entre el esmalte y la dentina se detectó la presencia del material amorfo, no reportado en la literatura, parecido a un cemento; esto se establece, debido a que en la figura 23.c se aprecia en la profundidad la organización de los prismas del esmalte y hacia la superficie dicho material, no definido ni caracterizado por métodos específicos y que será de gran valor en otros estudios el estudiar dicho material. Esta imagen es muy parecida al momento de separar una incrustación de la cavidad, quedando el cemento adherido a ambas superficies.

Los tubulos dentinarios son ovales y presentan diferentes diámetros, esto es debido posiblemente a los desniveles que presenta la dentina de esta cara.

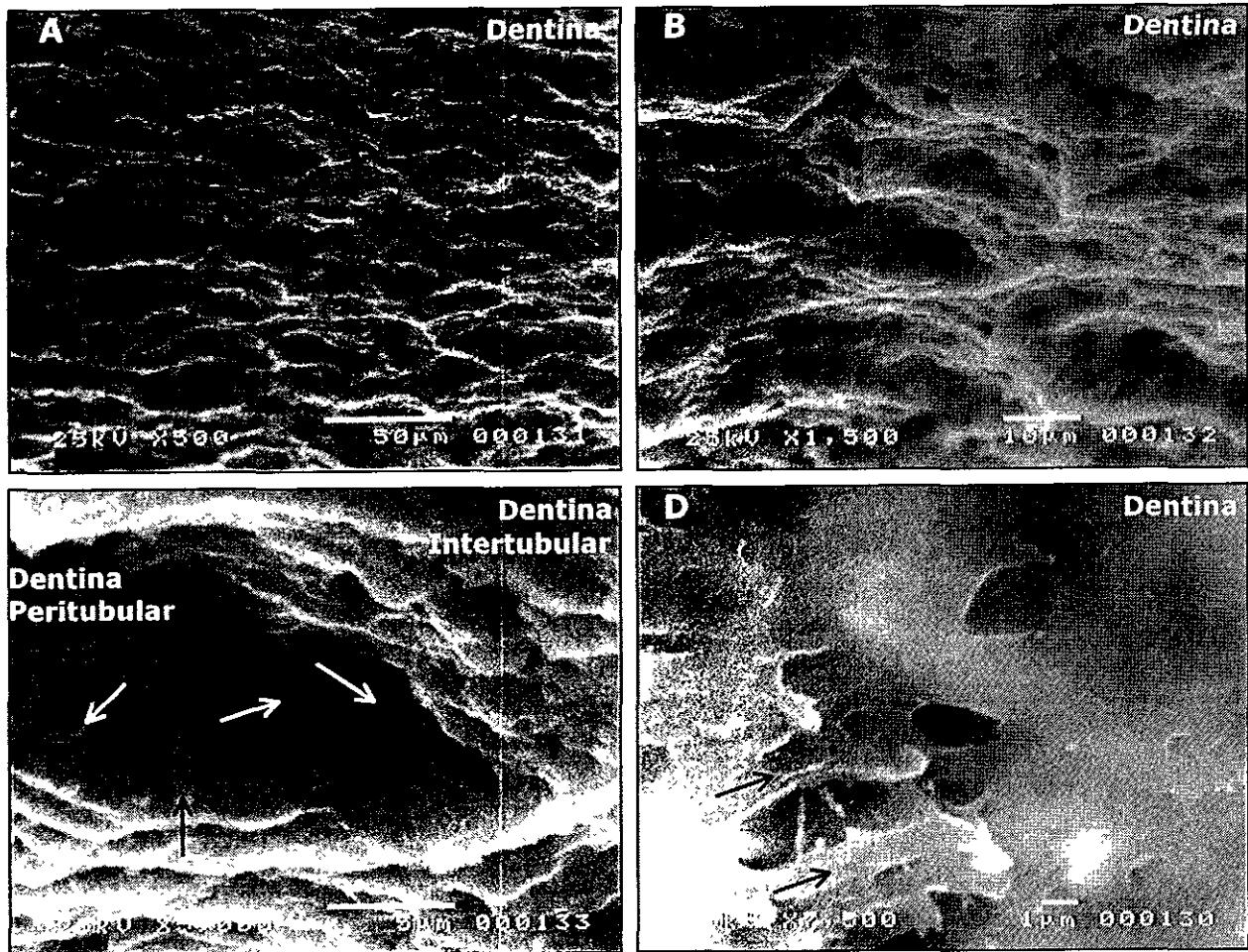


Figura 24: a) En esta figura se observa la sinuosidad de la superficie interna de la dentina, la cuál constituye la unión amelodentinaria (500X). b) Mayor detalle de los túbulos dentinarios que albergan las prolongaciones de los odontoblastos. c) Estos túbulos dentinarios presentan una entrada cóncava correspondiente a la dentina peritubular. Adheridas a la superficie del túbulo se encuentran las calcosferitas (flechas). d) Material de aspecto fibrilar (flechas), que semeja un trabeculado.

La unión amelodentinaria mostró zonas de transición heterogénea, observadas en diferentes niveles. Por medio del MEB se encontraron prolongaciones odontoblasticas que se introducen al esmalte, mostrando a término de ellos un terminado en punta (1,500x; fig. 26.a). También se observó la *disposición perpendicular de los prismas de esmalte con la unión*, sin que esto represente un paralelismo de ellos entre sí. Los resultados de estas muestras fueron obtenidos sin desmineralizar las mismas y correspondieron a las mismas observadas con MET (Fig 26 b). Debido a que algunas muestras no fueron grabadas, no se presentan estructuras en la superficie.

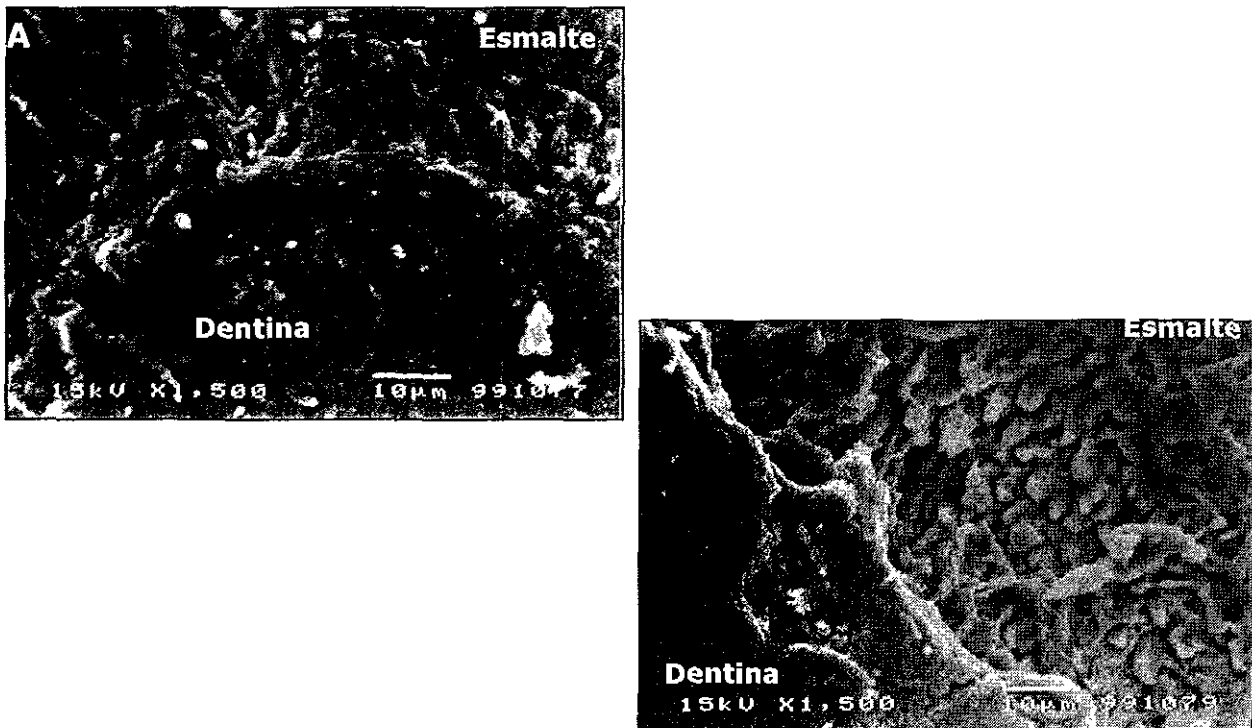


Figura 25. a) A 1,500x se observa la disposición de los prismas del esmalte que corren perpendiculares a la unión amelodentinaria, en tanto que la dentina presenta un arreglo homogéneo, en la figura b) se ve el borde sinuoso de la unión amelodentinaria que corre entre los dos tejidos que la constituyen.

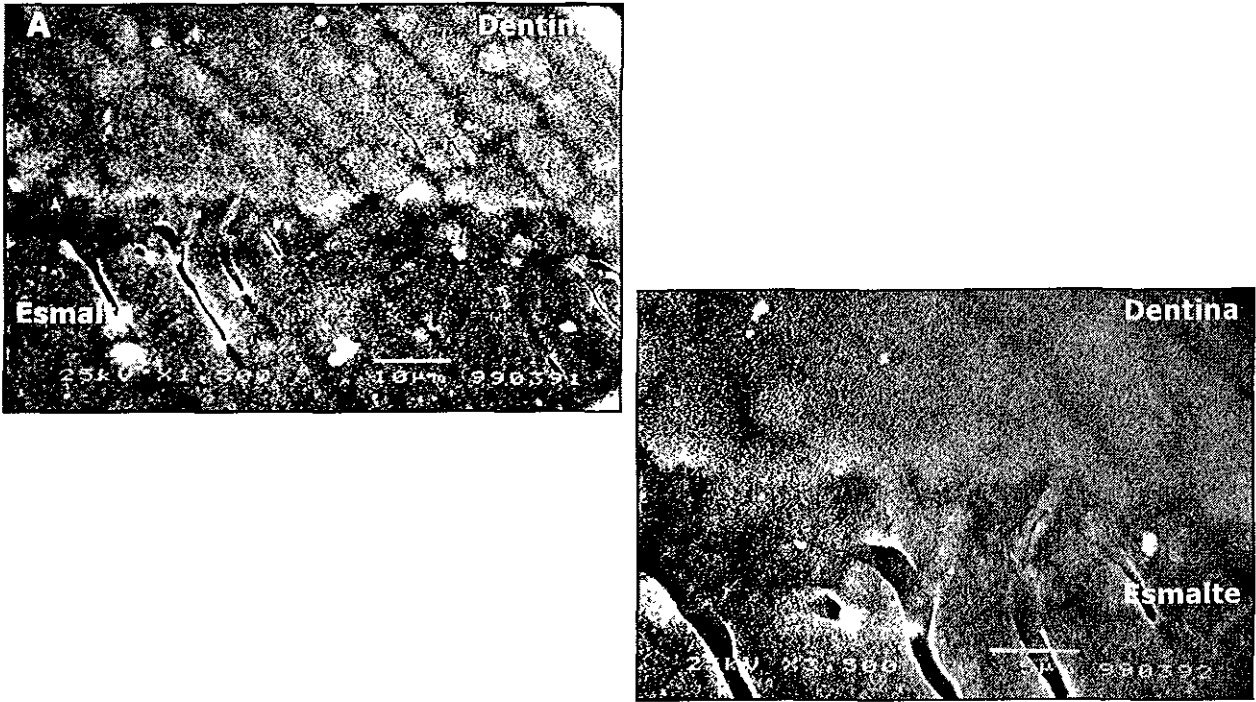


Figura 26. a) Muestra de la unión amelodentinaria sin desmineralizar, la cual previamente fue observada por MET, en esta figura se ve el espesor de la unión de 3 a 4 μm , b) en la que se observa la trayectoria de la prolongación odontoblastica, así como su cruce a través de la unión amelodentinaria.

C. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (MET).

Para poder realizar la observación de la unión amelodentinaria por medio del MET fue necesario preparar la muestra con una perforación en el centro de la misma, al realizarse el desgaste iónico, en los bordes de la muestra se formó un área semejante a una playa, que permitió el estudio ultraestructural de los tejidos debido a que se da un adelgazamiento de estos y por ende, el paso de los electrones. Al realizarse la observación en un corte transversal a los prismas del esmalte, se encontró que la disposición de los prismas presentaron formas irregulares (fig. 27.a), con disposición al azar (figs 27.b y 27.c), mientras en sentido longitudinal se presentan como estructuras alargadas divergentes desde la unión amelodentinaria (fig. 27.d).

El estudio de la muestra en lo que corresponde a la dentina en un corte transversal mostró en toda su playa la disposición de los túbulos dentinarios (fig. 28.a), en un patrón trabecular que los separa y define, presentando diámetros diversos de los túbulos (fig. 28.b). Así como un tipo de entretejido cuando esta posee una mayor densidad (fig. 28.c).

Hasta el momento se han descrito las características que dan origen a la estructura en estudio que es la unión amelodentinaria. Por su complejidad es difícil de establecer por medio de MET sus cualidades, esto se debe básicamente a que en el momento de preparar las muestras, el proceso de desgaste separa ambos tejidos. Pero un buen manejo de éstas nos permitió alcanzar el objetivo planteado. Con aumento de 50,000x se observó que su trayecto es sinuoso como se describió con el microscopio fotónico (fig. 29.a), los dos tejidos que la componen presentan patrones de acoplamiento entre sí, a un aumento de 13,000x no se observa una diferencia estructural importante entre ambos tejidos (fig. 29.b). Mientras que a 50,000x pueden

apreciarse las diferencias estructurales de cada uno de los tejidos que componen esta estructura tan compleja (fig. 29.c)

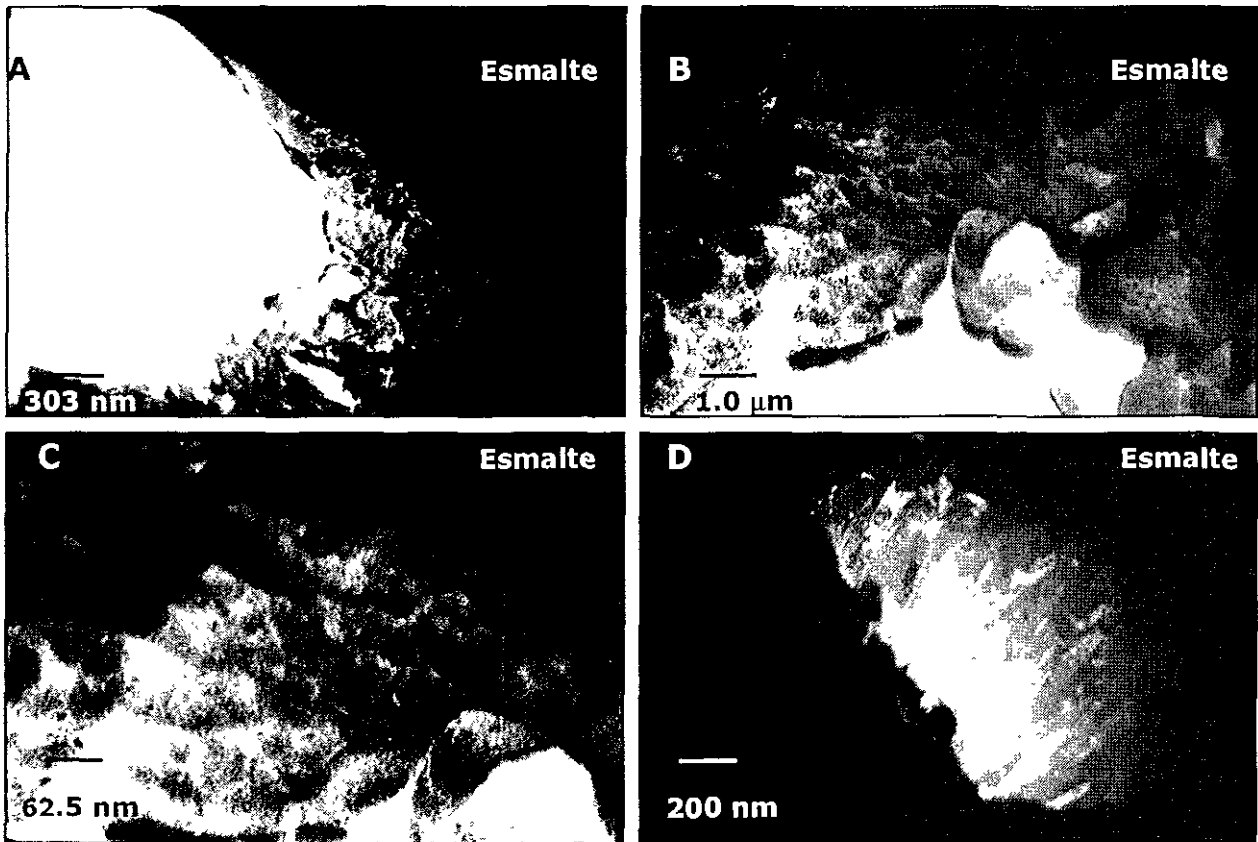


Figura 27. a) Los cristales del esmalte presentan una disposición radial (33,000x), b) La base del cristal tiene forma poliédrica, con mayor densidad (100,000x). c) A mayor aumento (160,000x) se observa la definición de las cabezas de los prismas del esmalte; d) conforme se alarga el cristal se agudiza adquiriendo una forma cónica, esto le permite adquirir un patrón convergente en su base y a la vez divergente en su trayectoria (campo oscuro), esta imagen nos permite valorar la estructura cristalina propia del esmalte (50,000x).

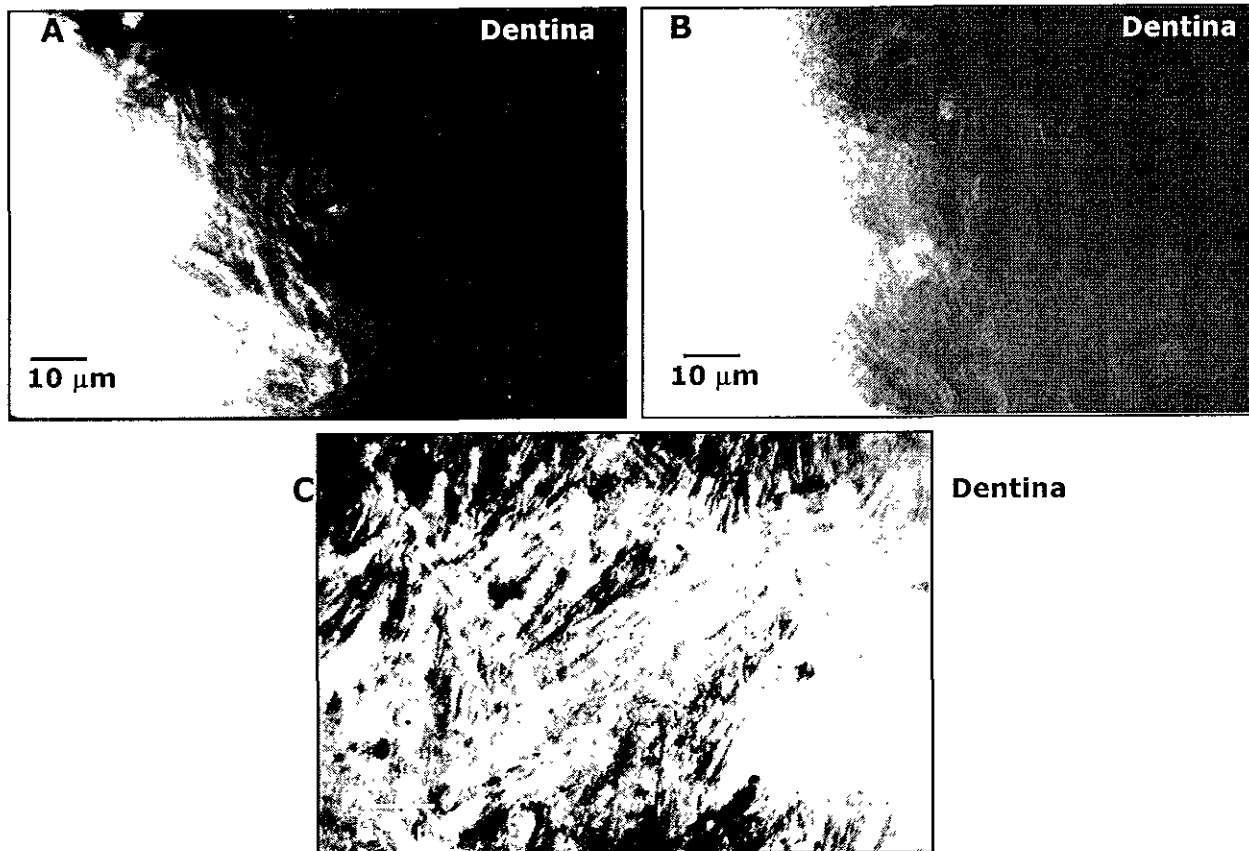


Figura 28. a) A un aumento de 1,000x y con técnica de campo claro se observa la distribución de los túbulos dentinarios adyacentes a la unión amelodentinaria debido a su menor porcentaje de material inorgánico. b) En un corte transversal se ven los diferentes diámetros de las luces de los túbulos dentinarios que se encuentran localizados en la unión. c) En tanto en esta figura a 10,000x se ve la disposición del entretejido que tiene la dentina en la parte más interna de ella y alejada de la unión amelodentinaria, no así en el esmalte el cual no pudo ser observado en esta muestra debido a su excesivo grosor.

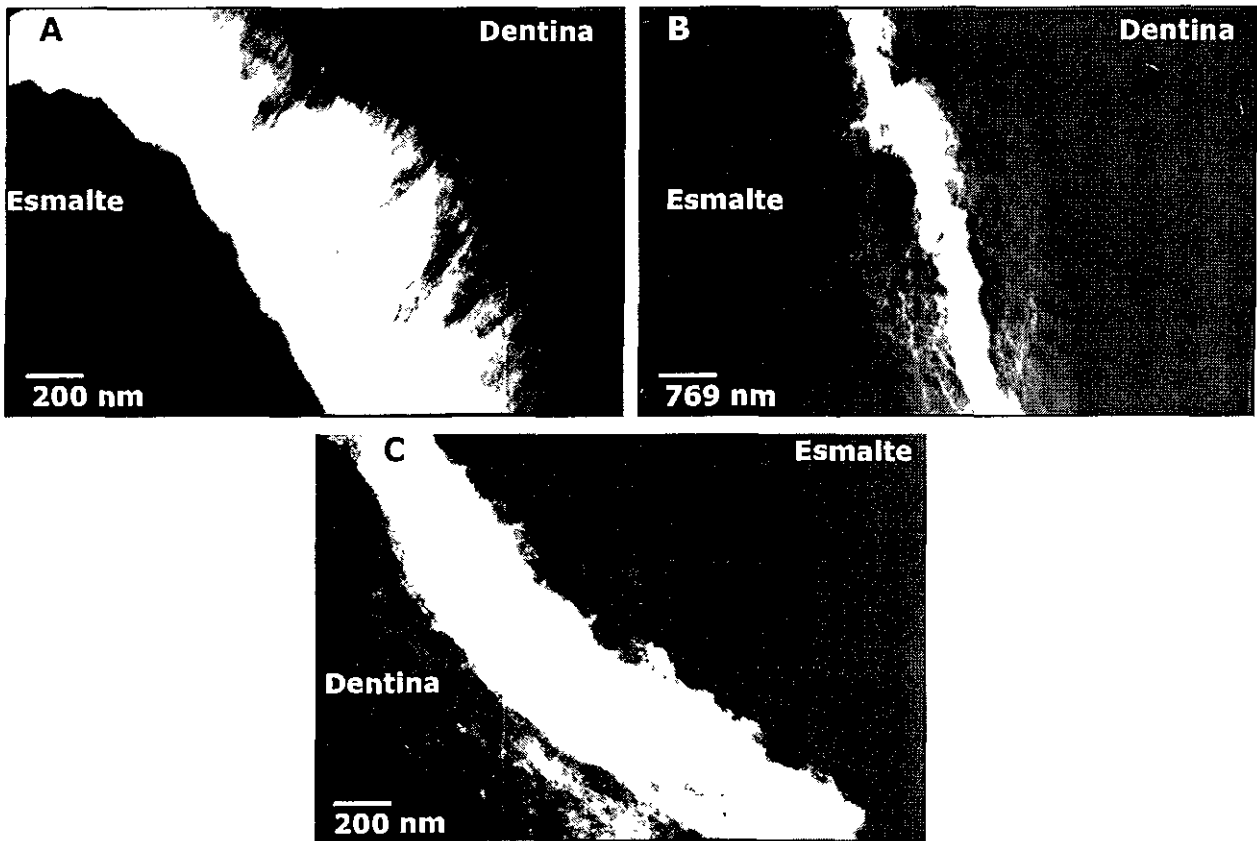


Figura 29. a) La fotografía revela que la trayectoria de la unión amelodentinaria es heterogénea (50,000x); b) y cuyos bordes de ambos tejidos a 13,000x son similares y a esta amplificación por medio del MET no fue posible la diferenciación de ellos; c) en tanto, que a 50,000x podemos distinguir las cabezas de los cristales y la disposición de los túbulos dentinarios.

Patrón de difracción

Para tener un estudio completo con MET es necesario realizar el análisis químico de la unión amelodentinaria y de esta forma obtener un mayor número de resultados. Por medio del MET se pueden realizar patrones de difracción, esta técnica es empleada en materiales cristalinos, y dada la composición de los tejidos dentarios se pudo aplicar.

Control. Se apreciaron más de trece haces difractados, los cuales representan los principales planos de su estructura atómica; con la medición de estos "aros" y su empleo en la fórmula $d_1 = \lambda L/R_1$ se obtuvieron las distancias interplanares (tabla 1; fig. 30.a).

Muestras en estudio. El patrón de difracción del esmalte de las muestras presentó haces difractados con una menor intensidad y en menor número (11 haces difractados), pero con distancias interplanares similares a los del control (tabla. 1; fig. 30.b). El patrón de difracción que se obtuvo en la dentina presentó 8 círculos de difracción bien definidos, debido a la menor cantidad de cristales de hidroxiapatita (tabla 1; fig. 30.c). Las distancias interplanares de estas fueron similares a las del esmalte, variando con las de la unión. En la unión amelodentinaria el patrón de difracción presentó más de siete aros de difracción con un haz central amplio debido al espacio existente en esa zona (tabla 1; fig 30.d), las mediciones del patrón revelaron una discrepancia en relación a las distancias interplanares tanto de la dentina, como del esmalte siendo tomadas las tres de la misma muestra.

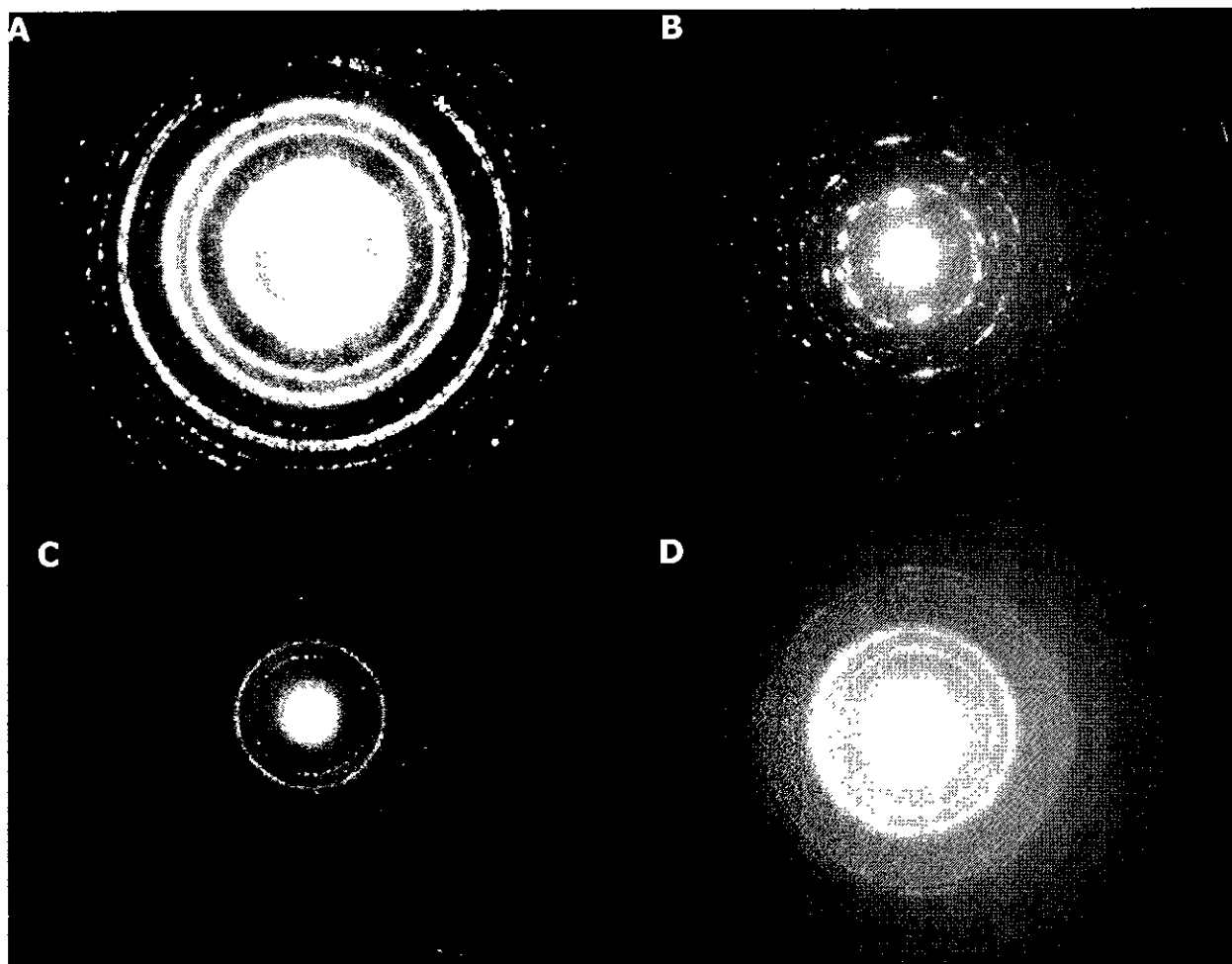


Figura 30. a) Patrón de difracción del grupo control en la que se observan más de 13 anillos de difracción. b) En la muestra en estudio, el esmalte presentó 11 anillos. c) La dentina solo 8 anillos y d) la unión amelodentinaria 7 anillos de difracción. Todos con las constantes de: $V=100$ Kv, $\lambda=0.037$ Å, y $L=76$ cm.

Por medio de la comparación de las distancias interplanares con los de las tablas preestablecidas se obtienen los índices de Miller, los cuales nos proporcionan la ubicación de los planos atómicos en el espacio, esto nos permite establecer el grado de densidad atómica en los cristales de los tejidos en estudio, por lo que los resultados demuestran que el esmalte está

más cristalizado y que la unión amelodentinaria es muy pobre en cristales dada la conjunción de los dos tejidos.

Tabla 1. Distancias interplanares (D) de las muestras y el grupo control , así como los correspondientes índices de miller (I) obtenidos de tablas de cristalografía.

Plano	Control		Esmalte		Dentina		Unión	
	D	I	D	I	D	I	D	I
R_1	2.205Å	3 1 1	3.123Å	3 4 0	3.123Å	3 4 0	2.045Å	1 6 0
R_2	1.906Å	3 4 1	2.556Å	3 6 1	2.960Å	3 0 0 2 4 4	1.814Å	
R_3	1.339Å		2.122Å	2 2 2	2.556Å	3 6 1	1.406Å	
R_4	1.147Å	4 4 2	1.678Å		1.973Å	1 4 2 4 0 1	1.236Å	
R_5	1.094Å		1.606Å		1.678Å			
R_6	0.865Å		1.442Å					
R_7	0.839Å		1. 236Å					
R_8	0.770Å		1.147Å	4 4 2				

35-180

$Ca_{10}(PO_4)_6CO_3$	d Å	Int	hkl	d Å	Int	hkl
Calcium Phosphate Carbonate	8.2433	14	120	2.2924	19	480,380
	6.8471	1	001	2.2652	13	013
	2.2727	5	121			
	4.7709	1	220,140			
	4.5841	10	111			
	4.1276	2	240			
	3.9186	7	221,241			
	3.8054	40	211			
	3.5417	3	241			
	3.4306	35	002			
	3.3207	<1	[151]			
	3.1281	17	340,240			
	3.0097	20	132			
	2.9817	20	051			
	2.9299	10	032			
	2.8375	100	341,261			
	2.7787	70	222,142			
	2.7470	50	360			
	2.7276	2	351			
	2.6429	19	242			
	2.5625	4	361			
	2.5280	1	132			
	2.4302	10	171			
	2.3701	<1	[371,311]			
	2.3159	2	342,262			

Figura 31. Tabla de rayos X usada para la indexación de valores preestablecidos de la hidroxiapatita, donde se obtienen los índices de Miller.

D. ANÁLISIS QUÍMICO

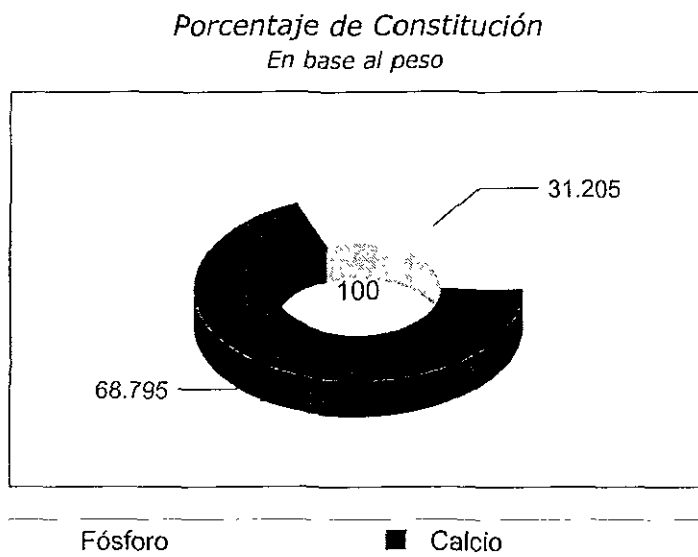
El análisis químico se realizó por dispersión de energía de los rayos X característicos, se llevo a cabo con un haz de electrones cuya aceleración fue de 100Kv, con una ventana de recepción de 20.0 μm . mostrando al fósforo y al calcio como los principales componentes en la unión amelodentinaria. Estos componentes mayoritarios comprenden por separado en promedio, el 31.025% del peso de fósforo y el 68.775% de calcio, siendo diferente el porcentaje en cuanto a número de átomos, el cual resultó en 36.98% de fósforo y en 63.02% de calcio, estos con un rango de error de +/- 0.5% (tabla 2; gráfica 1).

El detector de rayos X con el que se realizó el estudio solo puede detectar elementos con número atómico mayor al 9 correspondiente al flúor, por lo que no es posible dar los porcentajes de composición del carbono y del oxígeno. Las repeticiones promedio que se realizaron para la obtención de estos resultados fueron de 10.5 veces por muestra.

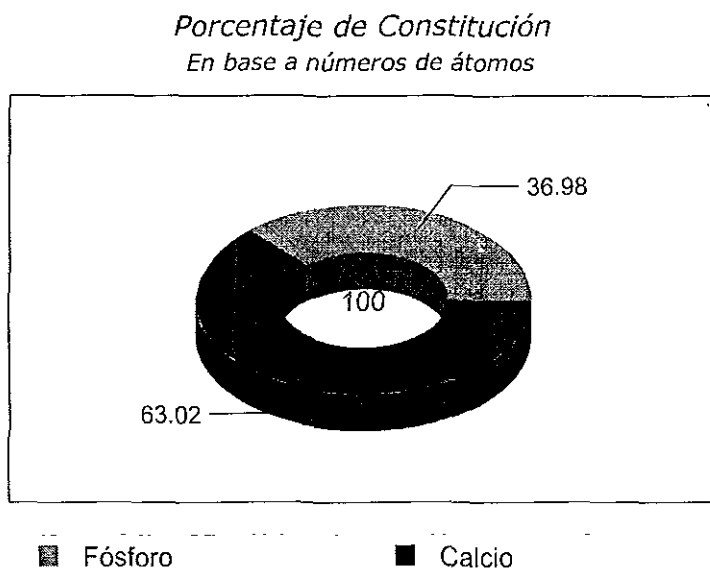
Tabla 2. Valores obtenidos por medio de la técnica de análisis químico (EDS) de la unión amelodentinaria en las cuales se obtiene el porcentaje en peso y número de átomos. Así como la razón Ca/P.

PORCENTAJE	ELEMENTO		RAZÓN
	FÓSFORO	CALCIO	Ca / P
EN PESO	31.025%	68.7754%	2.21 / 1.0
ATÓMICO	36.98%	63.02%	1.70 / 1.0
VARIACIÓN	+/- 0.2366%	+/- 0.7634%	

Gráfica 1: En esta gráfica se establece el porcentaje de la composición química de la unión amelodentinaria en base al peso molecular de los elementos.



Gráfica 2. Porcentaje en número de átomos de los elementos que componen la unión amelodentinaria.



V. DISCUSIÓN.

El presente estudio de la unión amelodentinaria reveló aspectos importantes en cuanto a su composición estructural, debido a que los trabajos realizados de esta estructura fueron por medio de MEB (Ten Cate, 1989, Zamora, 1999) y microradiografías (Herr et al, 1986). En esta investigación se empleo tanto la MF, MEB y la MET con sus diferentes técnicas. Esto ha confirmado lo que otros autores reportan, que los túbulos dentinarios están presentes en todo el grosor de la unión amelodentinaria (Ham, 1975, Ten Cate, 1989), pero no es que las prolongaciones de los odontoblastos tengan la capacidad de atravesar dicha unión, sino que en el momento de la amelogénesis, éstas prolongaciones quedan atrapadas en la matriz de esmalte, ocupando los espacios interprismáticos, en algunos sitios se observaron estructuras muy bien definidas que mostraron agrupaciones de fibrillas denominadas penachos, es muy probable que estas prolongaciones correspondan a un tipo de colágena que se forma durante la odontogénesis, esto se piensa debido a que la dentina tiene un alto contenido de materia orgánica y de colágena tipo I principalmente y tipo V, varios proteoglucanos, glucoproteínas y glucosaminoglucanos que son secretados durante el desarrollo dental por los odontoblastos (Slavkin, 1991). Así como también, durante la amelogénesis, los ameloblastos secretan dos tipos de proteínas que son las enamelinas y las amelogeninas, esto es de gran importancia debido a que las amelogeninas representan el 90% de las proteínas totales del esmalte. Los polipéptidos neutros tienen la función de regular el tamaño y porcentaje del calcio del esmalte en el crecimiento de los cristales de hidroxiapatita (Ten Cate, 1989; Slavkin, 1991; Amizuka et al, 1992; Robinson et al, 1995). Estas estructuras han creado grandes controversias ya que Palamara et al, establecen que los husos del esmalte dental humano se continúan con los túbulos dentinarios a lo largo de la unión, siendo translucidos en esta zona, situación que en este estudio no se puede

aseverar, debido a que por medio del MEB y profundizando a través de la separación de los dos tejidos como se observa en las figuras 21c y 21d no existe tal continuidad, lo que se encontró fue un entretejido de material de aspecto fibrilar que enlaza a los prismas del esmalte con los túbulos dentinarios.

Con respecto a la materia orgánica que compone a la unión, las estructuras más importantes y sobresalientes de la misma fueron los "penachos", éstos se presentan con longitudes variables penetrando al esmalte aproximadamente 65 μm . en forma de abanico, al igual que las distancias entre ellos van de 84 a 120 μm , éstas estructuras se encuentran en lo que corresponden al borde oclusal. Es importante hacer notar que su parte basal se encuentra íntimamente adherido a la dentina, lo que semeja un hemidesmosoma, así como en el trayecto de la unión amelodentinaria se observa un sistema de unión parecido a las zonulas ocludens del tejido epitelial, esto podría corresponder a uno de estos sistemas, lo cual no se ha reportado y pese a ello todas estas estructuras no la hacen resistente ya que es sumamente frágil como se observó a menor amplificación con MEB a 35x (fig. 21a), donde se hizo notoria la separación de los tejidos, por lo que se establece que esta estructura no es estable físicamente ante fuerzas, ya que el grosor de la muestra es de 4 mm. y fue obtenida mediante un solo corte. Esta separación se presento en el 80% del total de las muestras, de ahí que es importante tomar muy en cuenta el principio de que nunca debe haber pared de esmalte sin dentina y que durante la preparación de las muestras con la fricción del fresado estamos debilitando a la corona del diente, y prueba de ello son las múltiples fracturas que podemos ver en un diente restaurado. Utilizando la separación de los dos tejidos, que permitió obtener la profundidad tridimensional de los prismas del esmalte reveló un acercamiento íntimo de los tejidos entre sí pero con la separación de estos, también se vio el patrón de los prismas en todo su espesor, el cual presenta

forma una curva característica obtenida solo por MEB, en la cual la dentina presenta una mayor altura.

La amplificación de la unión amelodentinaria a 3500x muestra claramente la disposición transversal de los prismas del esmalte con la unión, así como una zona amorfa de transición entre los tejidos la cual no se parece a ninguno de los tejidos que originan a esta. También se aprecia en corte transversal de la cabeza de los mismos, los cuales por acción del ataque ácido se desmineralizan dejando superficies burdas de estos.

Por lo que ya ha demostrado este estudio, la unión amelodentinaria es una estructura compleja, compuesta por materia inorgánica y orgánica, así como agua; los principales elementos minerales que constituyen a la unión son el fósforo con un porcentaje en peso (% Wt) de 31.025 y porcentaje en número de átomos (% nA) de 36.98; y el calcio con 68.795% Wt y 63.02% nA; mientras que en estudios previos del esmalte este presentó los valores de 34.71% Wt y 40.76% nA de fósforo; 65.28% y 59.236% nA de calcio (Zamora, 1999). Invariablemente de que los resultados entre tejido y tejido dependiendo de las características del diente como el grado de mineralización en base a la edad del sujeto, se observó que el porcentaje del calcio duplicaba al del fósforo. Estos resultados demuestran que la unión amelodentinaria contiene bajos porcentajes de materia inorgánica con respecto al esmalte (Zamora, 1999).

Al separar los tejidos por la unión amelodentinaria y estudiar la cara interna de ambos, se encontró una sustancia amorfa no reportada ni caracterizada como *materia orgánica o inorgánica*. Este material parece cemento y al desprenderse el esmalte y la dentina, quedo adherido a ambos una película que cubrió los cristales del esmalte (fig. 23.c). Éste efecto es igual al de

desprender una incrustación cementada de la cavidad, quedando la película en ambas superficies.

Es importante recordar que, embriológicamente hablando, de los tejidos que constituyen a la unión amelodentinaria se derivan de dos capas germinativas diferentes: el esmalte del ectodermo y la dentina del mesodermo. Pero hay que aunarle a estos dos tejidos que los odontoblastos juegan un papel importante en el desarrollo del diente y estos son derivados de la cresta neural, por lo que son células altamente especializadas. Esto sumado a las diferencias bioquímicas de ambos tejidos conforman una estructura enigmática y de gran complejidad por su origen, composición química tanto orgánica como inorgánica. En base a las pruebas de análisis químico por dispersión de energía de rayos X característicos permite establecer que su composición es en alto porcentaje calcio y fósforo en una relación de 2.21 / 1.0 (tabla 2).

Esto abre puertas para seguir estudiando la unión amelodentinaria y tratar de dilucidar su verdadera composición.

VI. CONCLUSIONES.

- La unión amelodentinaria es una estructura frágil, ya que es de fácil separación.

- Los prismas de esmalte adyacentes a la unión amelodentinaria se encuentran *predispuestos en una posición arbitraria.*

- En la superficie de contacto de la unión amelodentinaria correspondiente al esmalte se *localizan perforaciones que se adentran al espacio interprismático.*

- En ambas superficies de contacto que conforman la unión amelodentinaria se encuentra una capa de materia amorfa de diferente *composición química tanto a la dentina como al esmalte.*

- Se encuentran prolongaciones de odontoblastos proyectándose hasta la zona interprismática en el esmalte.

VII. BIBLIOGRAFÍA.

Microsoft. (1998). Encarta Enciclopedia 99. Disco Compacto. USA.

Zamora Montes de oca, C E. (1998). Análisis de la composición y estructura del esmalte y la unión amelodentinaria en dientes humanos. Tesis de Maestría en Odontología. Facultad de odontología. UNAM.

Reyes Gasga, J; Alcántara Rodríguez, CM; González Trejo, AM and Madrigal Colin, A. (1997). Child, adult and aged human tooth enamel characterized by electron microscopy. Acta Microscopica Vol. 6 No. 1 p.p. 24 – 38.

Colin, R. (1995). Dental enamel: Formation to Destrucción Ed. CRC Press., USA. p.p. 57 – 84.

Reyes Gasga, J; Gloria, MJ; González, AM and Madrigal, A. (1995). La microscopía electrónica y el esmalte dental humano. Ciencia y Desarrollo. Vol. 125 p.p. 30 – 43.

Simmer, JP and Snead, ML. (1995). Molecular biology of the amelogenin gene. CRC Pres Inc. Dental Enamel. Formation to Destruction, Chapter 3, p.p. 59 – 84.

Yacaman, M y Reyes, J. (1995). Microscopía Electrónica. México. Ed. Fondo de Cultura Económica.

Catalano-Sherman, C; Laskov, R; Palmon, A; David, S and Deutsch, D. (1994). Production of a monoclonal antibody against human amelogenin. Calcif Tissue Int. 54. p.p. 76 – 80.

Nanci, A; Kawaguchi, H and Kogaya, Y. (1994). Ultrastructural studies and immunolocalization of enamel protein in rodent secretory stage ameloblasts processed by various cryofixation methods. *The Anatomical Record* 238 p.p. 425 – 36.

Yamakoshi, Y; Tanabe, T; Fukae, M and Shimizu, M. (1994). Porcine Amelogenins. *Calcif Tissue Int.* Vol. 54 p.p. 69 – 75.

Casasco, A; Calligaro, A and Casasco, M. (1992). Proliferative and functional stages of rat ameloblast differentiation as revealed by combined immunocytochemistry against enamel matrix protein and bromodeoxyuridine. *Cell Tissue Research* 270 p.p. 415 – 423.

Kukita, A; Harada, H; Kukita, T; Inai, T; Matsushashi, S and Kurisu, K. (1992). Primary and secondary of rat ameloblasts in serum- free medium. *Calcif Tissue Int.* 51. p.p. 393 – 98.

Watson, JM; Spencer, JA; Marshall, GJ; Snead, ML and Lau, EC. (1992). Autosomal localization of the amelogenin gene in monotremes and marsupials: implications for mammalian sex chromosome evolution. *Genomics* 14. p.p.785 – 89.

Slavkin, HC. (1991). Molecular determinants during dental morphogenesis and cytodifferentiation: A review. *Munksgaard*.p.p. 338 – 349.

Le Geros, RZ. (1990). Chemical and crystallographic enents in the caries process. *J. Des. Res.* 69 (Spec. Iss). p.p. 557 – 74.

Renugopalakrishnan, V; Prabhakaran, M; Huang, G; Balasubramaniam, A; Strawich, E and Glimcher, MJ. (1989). Secondary structure and limited

three-dimensional structure of bovine amelogenin. *Connective Tissue Research*. Vol. 22 p.p. 131 – 138.

Smith, CE and Nanci, A. (1989). Secretory activity as function of the development and maturation of ameloblast. *Connective Tissue Research*. Vol. 22 p.p. 147 - 156.

Ten Cate, AR. (1989). *Oral Histology development, structure and function*. Toronto. Ed. Mosby. Third edition.

Robinson, C; Kirkham, J and Hallsworth, as. (1988). Volume distribution and concentration of protein, mineral and water in developing bovine enamel. *Archs Oral Biol*. Vol. 33 No. 3 p.p. 159 – 162.

Slavkin, HC; Bessem, C; Bringas, P; Zeichner, M; Nanci, A and Snead, ML. (1988). Sequential expression and differential function of multiple enamel protein during fetal, neonatal, and early postnatal stages of mouse molar organogenesis. *Differentiation* Vol. 37. p.p. 26 – 29.

Grolier international. (1988). *Diccionario Enciclopédico Quillet*. Ed. Cumbre. 13ª edición. México.

Limerback, H. (1987). Enamel protein and collagen production by cells subcultured from porcine tooth bud explants. *Biochem. Cell Biol*. Vol. 65. p.p. 698 – 709.

Yeh, JH; Takagi, T and Sasaki, S. (1987). Isolation of two bovine amelogenin peptides and their amino acid sequences. *Adv. Dent. Res*. Vol. 1 No. 2 p.p. 276 – 81.

Junqueira, LC. Carneiro, J. (1981). Histología Básica. Ed. Salvat. 2ª. edición
Barcelona.

Ham, AW. (1975). Tratado de histología. Ed. Interamericana. 7ª edición.
México.

Mjör, IA and Pindborg, JJ. (1974). Hystology of the Human Tooth. Ed.
Munksgaard. Copenhagen.