

01484/

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

ANÁLISIS ULTRAESTRUCTURAL DE LA
ONTOGENIA DE LA LÍNEA OSCURA
DEL ESMALTE DENTAL EN RATÓN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN ODONTOLOGÍA

Presenta
M.O. Irma Araceli Belío Reyes

DIRECTORES
Dr. José Reyes Gasga
Dr. Luis Felipe Jiménez García

2016

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

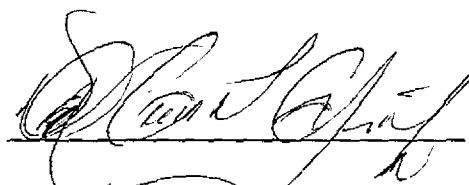
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

ANÁLISIS ULTRAESTRUCTURAL DE LA
ONTOGENIA DE LA LÍNEA OSCURA DEL
ESMALTE DENTAL EN RATÓN

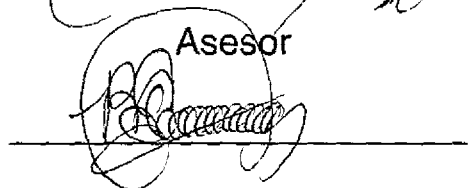
COMITÉ DE TESIS

Dra. Margarita Victoria García Garduño



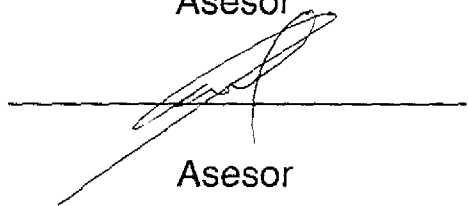
Asesor

Dr. Ramiro García García



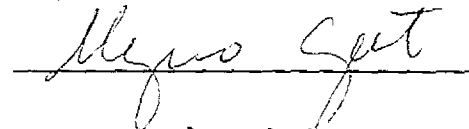
Asesor

Dr. Manuel Saavedra García



Asesor

Dr. Higinio Arzate



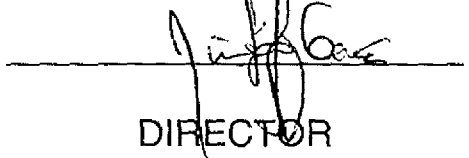
Asesor

Dr. José Reyes Gasga



DIRECTOR

Dr. Luis Felipe Jiménez García



DIRECTOR

Dedico esta Tesis a mis padres.

*Ya que en todo momento he recibido su apoyo incondicional.
Gracias por sus enseñanzas, sus consejos, su paciencia,*

SU AMOR.

*Por apoyarme no solo a mí
sí no también a mis hijos Ari y Edson,
a quienes también agradezco el hecho de comprender
que esas horas que les pertenecían y que
aproveché para superarme, redundará
en beneficio de, nuestra familia
(por la cual doy gracias a Dios)
Y de la sociedad.*

Los amo.

AGRADECIMIENTOS

A las siguientes Instituciones:

Principalmente al Instituto de Física de la UNAM por acogerme como estudiante asociado, a la Facultad de Ciencias y al Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, por abrirme las puertas en sus Laboratorios de Microscopía Electrónica, al Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados en su Laboratorio de Patología Experimental, al Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ) en sus Laboratorios de Microscopía Electrónica de Transmisión y Barrido, por todo el apoyo en la realización de este trabajo.

Dr. José Reyes Gasga a través de estas líneas deseo expresarle mi gratitud por sus sabias enseñanzas, por la guía y apoyo que durante todo este tiempo me ha brindado. Gracias por su apoyo para conseguir recursos económicos y poder presentar los avances del trabajo de investigación en foros internacionales, ya que contribuye a que se dé a conocer lo que usted como pionero, impulsa a sus estudiantes para realizar este tipo de investigación en el país, además agradezco su preocupación porque a través de un par de artículos publicados y otro más que aún está en borrador, esto redunde en mi crecimiento profesional. Por otro lado, su invitación y palabras de apoyo, me animan, se que ya cuento con su generosa guía, para seguir de alguna manera trabajando en el futuro, desarrollando proyectos de vinculación interinstitucional, con la finalidad de formar recursos humanos, siguiendo su ejemplo.

Dr. Luis Felipe Jiménez García, gracias por aceptarme como su alumna a pesar de sus múltiples compromisos, por escuchar mis inquietudes y encausarlas, por su apoyo para hacer posible que este trabajo fuese presentado en la Ciudad de Boston Massachusetts. Espero que en un futuro siga habiendo frutos gracias al apoyo que hoy me brinda, redundando en algún proyecto común.

Quiero agradecer de manera especial al Dr. Lauro Bucio Galindo que me brindó, su tiempo al explicarme varios tópicos a lo largo del trabajo, por su apoyo de manera incondicional para la elaboración e impresión de esta tesis, donando además las imágenes de la estructura de la hidroxiapatita y del fosfato octocálcico. También por alentarme a llevar a cabo un par de proyectos en colaboración, mismos que me permitieron, gracias a su ayuda, presentar resultados en foros internacionales fortaleciendo mi crecimiento en la investigación. Gracias por tu confianza, tu compañía y afecto.

Al Dr. Ramiro García, excelente investigador, agradezco su orientación y comentarios a esta tesis.

Por la ayuda técnica en el Instituto de Física a ese gran equipo del que me honré en pertenecer y con el que me regocijé aprendiendo de sus logros:

Al Físico Roberto Hernández, señor mis respetos pues gracias a su gran don para la enseñanza, por su gran capacidad didáctica, pude resolver muchas de mis dudas, e incluso enfrentarme a otras interrogantes, por auxiliarme durante las sesiones de microscopio, por su colaboración para la presentación de resultados de este trabajo en los Congresos y por su confianza.

Al C. Pedro Mexia, posiblemente no pueda lograr expresar de manera precisa lo agradecida que quedo por sus enseñanzas, por su asesoramiento durante las sesiones de aprendizaje en el microscopio, por su paciencia y por sus consejos, por su colaboración para la presentación de resultados de este trabajo en los Congresos, sin embargo tendría que decirle solo gracias por todo Pedro, ha sido un placer conocerle

Al C. Carlos Flores, gracias por capacitarme, por tu paciencia al mostrarme la manera de preparar desde como lograr las rejillas con hoyos hasta obtener unas buenas muestras inorgánicas, sin olvidar las horas dedicadas a fotografía, por su colaboración para la presentación de resultados de este trabajo en los Congresos, gracias amigo por todo tu apoyo.

Al C. Luis Rendón, por auxiliarme en la parte de microscopía de alta resolución y por sus observaciones.

Al Ing. Samuel Tehuacanero por su enseñanza en el programa para la digitalización de imágenes, la obtención de los patrones de difracción de los cristales en alta resolución, sus comentarios y su entusiasmo en la presentación de resultados de este trabajo.

A la Ing. Cristina Zorrilla por el trabajo realizado en la simulación de imágenes, sus comentarios y su entusiasmo en la presentación de resultados de este trabajo en otros foros.

Por su apoyo en la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología a:

A la Dra. Margarita Victoria García Garduño por las sugerencias hechas a esta tesis, lo cual contribuyó a mejorar el estilo del escrito y por la presentación de uno de los pósters con resultados de este trabajo, en la Isla Margarita Venezuela.

Al Dr. Manuel Saavedra García, porque Manuel tu presencia ha sido decisiva en mi vida, eres el pilar principal, para que yo pudiera llegar gracias a tus enseñanzas, consejos y dirección, a lograr esta meta. Digo pilar porque fue gracias a tus consejos fue como empecé a escalar esta montaña desde la primer especialidad que hice, y peldaño a peldaño fuiste tu, quien me alentaba diciendo Irma hazlo, sigue adelante por tu Universidad y por ti, tu puedes. Hoy te digo infinitas gracias.

Al Dr. Higinio Arzate por orientarme donando una de sus muestras y también por sus comentarios.

A la MC Laura Vargas por su colaboración, amistad y apoyo en el escrito del artículo sobre resultados del trabajo.

Al Lic. Francisco Soto por su disposición y apoyo.

Por su ayuda técnica en la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología a:

Al C. Juan Trejo por su valiosa ayuda haciéndose cargo de una parte de los animales de experimentación.

Al C. Teodomiro Pérez Salazar del Laboratorio de Patología Experimental por la preparación de la muestra donada por el Dr. Higinio Arzate.

Por su ayuda técnica en la Facultad de Ciencias a:

A la MC Ernestina Ubaldo, gracias por apoyarme en los cortes de las muestras, de las que eres tan magnífica ultramicrotomista, fama bien ganada gracias a esos cortes seriados que muy posiblemente no tengan comparación.

Por su ayuda técnica en el Instituto de Fisiología Celular a:

Al C. Jorge Sepúlveda, muchas gracias Jorge por haberme apoyado en los momentos más cruciales, por enseñarme y ayudarme en otras formas de preparación de muestras, además de obtener cortes de reconocimiento de la zona y sus fotografías. Gracias por tu amistad.

Al M.V.Z. Héctor Alfonso Malagón Rivero, por su valiosa ayuda y disposición al darnos animales de laboratorio y hacerse cargo de ellos, con lo que pudimos finalizar los trabajos experimentales.

Por su ayuda técnica en el Instituto de Investigaciones Nucleares a:

A la C. Leticia Carapia y Carlos Angeles, por su asesoramiento en la obtención de los microanálisis y varias imágenes de las muestras.

A mis hijos **Irma Araceli y Edson**, por su ayuda en parte del escrito de esta tesis y la elaboración del modelo propuesto, además de su comprensión y apoyo por mis ausencias al asistir a los Congresos.

A mis padres **Elda Reyes y José Belio Castillo** por el soporte económico para la terminación de la tesis, su apoyo y ayuda moral, sin la cual no hubiera sido posible finalizar esta etapa.

A la Dirección de Intercambio Académico de la UNAM por el apoyo económico para realizar el Doctorado en Ciencias Odontológicas.

ÍNDICE

RESUMEN	I
ABSTRACT	II
INTRODUCCIÓN	3
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	5
HIPÓTESIS Y OBJETIVO	5
JUSTIFICACIÓN	6
1. EL ESMALTE Y LA LINEA OSCURA CENTRAL	8
1.1. Histología del órgano del esmalte	8
Ciclo vital de los ameloblastos	10
1.2. Evolución del material orgánico e inorgánico durante la Amelogénesis	16
Secreción y componentes de la matriz orgánica	17
Mineralización de la matriz orgánica	19
1.3. La estructura de los cristales de esmalte	22
1.4. Nucleación, crecimiento y morfología de los cristales de esmalte	27
1.5. Línea oscura central	34
Hidroxiapatita y el fosfato octocálcico	42
2. MICROSCOPIA	47
2.1. Microscopía óptica	47
2.2. Microscopía de barrido (SEM)	48
2.3. Microscopía electrónica de transmisión (MET)	49
2.4. Microanálisis	53
3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	55
4. RESULTADOS	67
5. DISCUSIÓN	115
6. CONCLUSIONES	124
7. PROPUESTAS A FUTURO	125
8. BIBLIOGRAFÍA	126
9. CURRICULUM VITAE	136
10. ARTÍCULOS ENVIADOS PARA PUBLICACIÓN Y ARTICULOS ACEPTADOS	138

RESUMEN

El esmalte dental es el tejido que está en contacto con los alimentos durante la masticación. Cubre la dentina en la porción coronal, es de origen ectodérmico y es producido por los ameloblastos. La unidad estructural básica del esmalte es el prisma, éste se encuentra formado por cristales de hidroxiapatita (HAP) en un 97%, restos de proteínas (1.5%) y agua (1.5%). En el centro de los cristales de HAP se localiza la llamada línea oscura central (CDL). Recientes estudios suponen que la CDL es el templete a partir del cual se forman los cristales de HAP. Se ha dicho que se trata de un fosfato octocálcico (Miake *et al*, 1993). La CDL se observa desde etapas muy tempranas de la formación de cristales en el esmalte, incluso en la etapa intrauterina, lo que refuerza que su formación ocurre durante el desarrollo del cristal, y no sobre cristales ya formados.

El objetivo de este estudio fue determinar la ontogenia de la CDL, analizar la nucleación de los cristales y su análisis químico. Para ello, se trabajó en cristales de esmalte de incisivos inferiores de feto de ratón de 19 días y en cristales de esmalte de ratón adulto.

Las técnicas utilizadas para ello fueron: microscopía óptica, microscopía electrónica de barrido, microscopía electrónica de transmisión, microscopía electrónica de alta resolución; análisis químico por espectroscopia de dispersión de energía, así como procesamiento y simulación de imágenes.

Se localizó la CDL en los cristales de esmalte dental de ratón adulto, y en los cristales de esmalte de incisivos mandibulares en el estadio secretorio de fetos de ratón de 19 días, poco antes de su nacimiento. Los valores encontrados de la relación calcio fósforo en los puntos donde se obtuvieron los espectros en los cristales adultos fueron desde 0.68 a 1.77. La simulación de imágenes no apoyó un crecimiento epitaxial entre la hidroxiapatita y el fosfato octocálcico, tal y como se observa la CDL en los resultados experimentales, sino que se presenta un corrimiento de 2.3 Å entre los planos de ambos lados de la línea. A partir de este trabajo de tesis se sugiere que la nucleación de los nanocristales de HAP se da usando las agujas o listones de material orgánico como templete, y la CDL quede como una reminiscencia del sitio de nucleación de los cristales.

Palabras clave: Amelogenesis línea oscura central, Microscopía electrónica de transmisión, EDS análisis de rayos X, simulación y procesamiento de imágenes.

ABSTRACT

Dental enamel is the tissue that is in contact with foods during the chewing. It covers the dentin at the crown portion; its origin is ectoderm and is produced by the ameloblasts. The basic structural enamel unit is the prism, which is formed by hydroxyapatite (HAP) crystals (97%), protein reminiscences (1.5%) and water (1.5%). In the HAP crystal centres, the so-called central dark line (CDL) is located. Recent work suggests that this CDL is the shrine in which the HAP crystals become to grow. It is said that it deals with an octacalcium phosphate (Miake *et al*, 1993). From the very early stages of crystal maturation, the CDL is possible to be observed, including the intrauterine stage, which reinforces the fact that the CDL formation occurs during the crystal formation and no over the previously formed crystals.

The aims of the present work were the determination of the CDL ontogeny, the crystal nucleation, and its chemical analysis. To carry out that, mandible incisive enamel crystals from 19th day mouse foetus, and enamel crystals from adult mouse, were used for the experimental work. The experimental techniques applied in the study were: conventional optical microscopy, scanning electron microscopy, transmission electron microscopy, high resolution electron microscopy; chemical analysis by energy X-ray dispersive spectroscopy (EDS), image simulation and image data processing.

The CDL was located in the dental enamel crystals from adult mouse as well as in the mandible incisive enamel crystals from 19th day mouse foetus, close to its birth. The calcium phosphate ratio values from adult mouse crystals at the points where the EDS spectra were taken were found to be from 0.68 to 1.77. The image simulation indicated any epitaxial growth of crystals can be produced between the hydroxyapatite crystals and the octacalcium phosphate; such as it has been observed in the experimental CDL images. In fact, it showed a displacement about 2.3 Å between planes at the opposite sides of the central dark line. From the results of this work it is suggested that the HAP nanocrystals nucleation is given by using the organic needles or ribbons as shrine, being the CDL the reminiscence of the organic material.

Key words: Amelogenesis crystal dark line (CDL), Transmission electron microscopy, EDS X-ray analysis, image simulation and image data processing.

INTRODUCCION

El esmalte dental es de origen ectodérmico y cubre a la dentina a manera de casquete en su porción coronaria. Es el tejido más duro del organismo. Está constituido por millones de prismas altamente mineralizados que corren desde la unión amelodentinaria hasta la superficie libre del esmalte dental. Es un tejido único embriológicamente formado a partir del órgano del esmalte que a su vez se origina de una proliferación localizada del epitelio bucal. Su matriz orgánica es de naturaleza proteica con agregado de polisacáridos (Zeichner et al., 1995). Sus cristales son de mayor tamaño que los de otros tejidos mineralizados y se hallan densamente empaquetados.

Las células sintetizadoras de este material son los ameloblastos que producen diversas proteínas, entre las que se encuentran en mayor cantidad las amelogeninas, enamelinas y enzimas proteolíticas (Ten Cate, 1986). Estas células secretoras desaparecen después de completar la formación del esmalte, lo cual implica que no hay crecimiento ni nueva aposición del esmalte después de la erupción. El esmalte maduro no contiene células ni prolongaciones celulares y por ello es un tejido acelular, avascular y sin inervación. Frente a una noxa, reacciona con pérdida de substancia siendo incapaz de repararse, no se reconstruye, aunque puede haber remineralización.

Como último producto de la secreción ameloblástica, una película primaria tapiza los dientes para protegerlos, desapareciendo al hacer contacto oclusal, pero suele persistir al nivel cervical (Gómez de Ferraris, 1999), cubriéndose el esmalte posteriormente con una película secundaria, o adquirida, de tipo exógeno de origen salival. Por fuera de esta película se forma la placa dental a expensas de los gérmenes habituales de la cavidad bucal.

El esmalte por la superficie interna se relaciona con la dentina por medio de la unión amelodentinaria y está constituido por hidroxiapatita (fosfatos de calcio) $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ El espesor máximo del esmalte dental es de aproximadamente 2 a 2.5 mm en las cúspides de molares, premolares y canino

superior, que son las zonas de grandes impactos masticatorios. En general, el espesor decrece desde el borde incisal o cuspídeo hasta la región cervical; no es constante sino que varía hasta en un mismo diente. Está constituido por prismas, éstos por cristales y estos últimos por átomos de Ca, O, P, H, que siguen un ordenamiento periódico. Los cristales tienen dimensiones nanométricas y pueden ser afectados, por ejemplo, si se llevan a cabo sustituciones iónicas, o deficiencias en los mismos, ocasionando defectos que modifiquen o alteren las propiedades del material, así como su estabilidad química (Le Geros, 1991).

Al parecer, uno de los defectos intrínsecos que se presenta en los cristales del esmalte es la llamada línea oscura central (CDL) cuyo espesor aproximado es de 1.5 nanómetros (Reyes-Gasga, 1995). La línea oscura es muy sensible al daño electrónico, posee iones hidroxilos y rápidamente puede desaparecer al interaccionar con el haz electrónico durante su observación con el microscopio electrónico. Se cree que está formada por algún fosfato, que se presume sea el octocalcico (OCP), el cual ha sido propuesto como precursor de la hidroxiapatita (Brown, 1962). Probablemente la presencia de esta línea sea necesaria para que este tejido presente las propiedades que de él se conocen (Brés et al, 1986).

Aunque varios estudios se han realizado con el objetivo de conocer la estructura, el origen y el papel que juega la línea oscura en la estructura y funcionamiento del esmalte, aún no ha sido posible esclarecer estos puntos. Ahora se sabe que la zona que ocupa la línea oscura es susceptible de disolución mayor que el resto del material que conforma los cristales del esmalte (Simmelink y Abrigo, 1989). Se ha comentado que esta puede ser un material cuya estructura es necesaria para la nucleación y crecimiento de los granos del esmalte dentro de una matriz orgánica (Miake et al., 1995), pero hasta ahora no son más que conjeturas.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La observación de material orgánico por MET no es fácil de realizar si tomamos en cuenta que al interaccionar el haz electrónico con éste produce su destrucción, principalmente por su poca o nula conductividad eléctrica. Además, el análisis de la línea oscura en los cristales del esmalte es un tema difícil por presentarse como un objeto de fase: su contraste tiene una fuerte dependencia con el enfocamiento de la imagen.

Aún con los avances en el conocimiento sobre la estructura de los prismas del esmalte, todavía hay incógnitas. De ahí la necesidad de analizar la distribución del material, tanto orgánico como inorgánico, del esmalte dental para saber más sobre sus propiedades.

En el presente estudio, buscando en el origen del esmalte la presencia de esta Línea Oscura, se pretende estudiar la nucleación y crecimiento de los cristales del esmalte dental, modelar su estructura y caracterizar la morfología de los cristales de esmalte dentro de la matriz orgánica, además de analizar su composición química. Para esto se llegó experimentalmente a la conclusión de utilizar fetos de ratón de 19 días de gestación de la cepa Balb c.

OBJETIVO.

1. - OBJETIVO GENERAL.

Análisis de la ontogenia de la Línea Oscura del esmalte de ratón, para estudiar la nucleación y crecimiento del esmalte.

2. - OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

2. 1. - Determinación de la evolución de la microestructura del esmalte dental de ratón en estado embrionario y en ratón adulto.
2. 2. - Determinación de la presencia de la CDL en ambos casos.

2. 3. - La correlación de la ontogenia de la CDL en la formación de los cristales de esmalte en ratones, con el posible origen de la misma en humanos.

HIPÓTESIS.

1 - HIPÓTESIS DE TRABAJO.

La aparición de CDL no es debida al proceso de maduración del cristal de esmalte si no que es producida por una célula viva.

2 - HIPÓTESIS NULA.

No hay precursor de la CDL, sólo se trata de una fase en la maduración del cristal.

3 - HIPÓTESIS ALTERNA.

La CDL es una consecuencia de la unión entre el material orgánico e inorgánico y es de tal importancia que permite una adhesión entre ellos de forma sencilla.

JUSTIFICACIÓN

Dentro del contexto nacional, uno de los problemas que afecta hasta en un 90% a la población mexicana es "la caries", siendo esto un motivo para buscar el mejoramiento de la salud bucal o nuevas medidas para su prevención. El entendimiento completo de las estructuras relacionadas con la formación y maduración del esmalte, sitio por el que comienza el proceso de desmineralización (caries), ayuda ofreciendo alguna solución al problema de la caries. Por otro lado, el conocimiento de su relación estructural, provee bases racionales para el entendimiento de fenómenos fisiológicos importantes, como:

- 1) El mecanismo para la prevención de la caries dental al ingerir agua fluorada;
- 2) La variabilidad inusual en la estequiometría de los precipitados apatíticos;
- 3) La causa de las morfologías de los cristalitos apatíticos biológicos como listones o láminas;

- 4) Un posible mecanismo para la incorporación de impurezas y defectos en el esmalte dental;
- 5) Un mecanismo de crecimiento de apatitas biológicas y
- 6) La variación dental por invasión de la caries.

Para ello deben llevarse a cabo estudios con cálculos comparativos de los modelos, con los cristales obtenidos experimentalmente, en embriones de ratón donde las capas de hidroxapatita comprendidas tengan el espesor de solo un número reducido de celdas unitarias y modelos específicos de los cristales deducidos por microscopía electrónica, análisis químicos y sus consideraciones con modelos simulados. Para ello tenemos que estudiar y analizar en detalle la ontogenia, estructura, composición etc. de los tejidos que forman el diente, aunque se han estudiado desde varios puntos de vista, aún hay muchas interrogantes.

La presencia de la línea oscura en los cristales de esmalte ha dado lugar a varias hipótesis sobre su estructura y su función en el esmalte dental, incluso se ha comentado, sobre la posibilidad de que el inicio de la caries se lleve a cabo en la CDL. Estudios sobre la acción de ácidos como el fosfórico sobre el esmalte (Hernández, 1994) han demostrado que esta línea representa el lugar donde la disolución del esmalte comienza.

Por lo tanto, es importante dilucidar el papel que juega la línea oscura en la estructura y funcionamiento del esmalte dental. Para ello es necesario que se tengan las bases biológicas bien claras de lo que sucede desde el inicio de la formación de los tejidos del diente, su estructura en estado normal, tanto en sus arreglos atómicos como su distribución en las diferentes partes que lo forman.

Esta clase de estudios podría aclararnos, entre otras cosas, las propiedades del material y tal vez, a la larga, lograr el método de preparación y su incorporación al tejido, creando un biomaterial restaurativo o hasta regenerativo. Además, cualquier investigación que nos permita acrecentar la información sobre la estructura del esmalte dental humano será siempre justificable.

1. EL ESMALTE Y LA LÍNEA OSCURA CENTRAL.

Si se quiere conocer el origen y el papel que juega la línea oscura central en la estructura de los cristales del esmalte, es indispensable estudiar éste, en el mismo momento en que se origina. En esta sección se describirá la histología del esmalte, poniendo mayor énfasis en los momentos o estadios ontogenéticos en los que puede darse el origen de esta línea. Así mismo se describirá brevemente la estructura del esmalte y del material inorgánico mayoritario que lo conforma: la hidroxiapatita. También se presentan las características principales de la línea oscura que hasta el momento se han reportado.

1.1. HISTOLOGÍA DEL ORGANISMO DEL ESMALTE.

Los primeros signos del desarrollo ontogenético dental son la condensación focal de las células migratorias de la cresta neural, inmediatamente por debajo del epitelio oral del futuro puente alveolar (Lumsden, 1988). El ectomesénquima oral interactúa con la cubierta del epitelio, induciendo las células basales cuboidales del estrato germinativo para que se multipliquen e invadan el mesénquima. Las uniones estrechas especializadas o barras terminales ligan a las células de esa capa oponente en láminas. Una membrana basal distinta se mantiene entre las dos capas. El epitelio y el mesénquima adyacente a la membrana basal organiza y sufre un proceso sincrónico de diferenciación celular, principalmente en los estadios de yema, capucha y campana de la odontogénesis.

En el estadio temprano de capucha segmentos del epitelio del órgano del esmalte en la cara cóncava y convexa están arrugados, en el epitelio del esmalte interno y externo respectivamente. El área que tendrá la matriz del esmalte está ya definida (futuros ameloblastos) en forma de envoltura agrietada entre el epitelio del esmalte interno y el mesénquima adyacente (futuros odontoblastos). La dentina y el esmalte se forman en esta interfase. Durante el proceso de formación, las células del epitelio interno del esmalte sufren una serie de diferenciaciones progresivas. Cambios en la morfología celular están

asociados con actividades funcionales alteradas (Pindborg and Weinmann, 1959). El continuo desarrollo comprende la diferenciación de las células del epitelio interno del esmalte en ameloblastos, pre-secretorios, secretorios, transicionales y la fase de maduración de los ameloblastos. Los pre-secretorios son cuboidales, se diferencian en células columnares de ~60 μm en altura y 2 a 3 μm de ancho (Reith 1961; 1970). Los núcleos y mitocondrias polarizan a la terminación proximal de la célula. Células adyacentes están conectadas en su terminación proximal y distal por barras terminales. Bajo esta estructura especializada de adhesión celular, el extremo distal de un ameloblasto tiene forma de cono que es angulado de un eje largo de la célula y es llamado el proceso de Tomes. Los cristales apatíticos del esmalte son nucleados en el estadio secretorio y crecen rápidamente hacia la región externa del esmalte en dirección paralela al eje longitudinal del cristal.

Una vez que los cristales de HAP del esmalte alcanzan su total extensión (todavía teniendo un espesor de solamente unos pocos nanómetros) los ameloblastos se acortan a 35 micras de altura y algunas mitocondrias se mueven distalmente hacia el núcleo. Estos ameloblastos transicionales reorganizan activamente su estructura intracelular. Su citoplasma contiene numerosas vacuolas autofágicas encerrando remanentes de mitocondrias y retículo endoplásmico rugoso (Reith, 1970). Simultáneamente, células del estrato intermedio reorganizan y pierden su identidad como una capa distinta. En la fase de maduración, los ameloblastos alternan entre terminaciones con morfología lisa y rugosa (Josephsen y Fejerskov, 1977) y eventualmente disminuyen en tamaño las células cuboidales del epitelio reducido del esmalte.

Las terminaciones rugosas de los ameloblastos tienen membranas especializadas conocidas como bordes estriados asociadas con mitocondrias e involucradas en endocitosis (Sasaki, 1984). Debido a que estas células reabsorben proteínas y agua de la matriz del esmalte mientras que la suplen con iones de calcio y fosfato, han sido descritas como células transportadoras (Reith, 1961). Las terminaciones rugosas de los ameloblastos están conectadas hacia el esmalte. Así los espacios intercelulares están abiertos hacia la capa papilar, mientras que las terminaciones lisas de los ameloblastos

están conectadas proximalmente con el espacio intercelular abierto a la capa de esmalte (Josephsen and Fejerskov, 1977).

Una característica de las células epiteliales reducidas, es una actividad de modulación de una superficie ondulada invaginada apical, resultando en un patrón alternativo de ameloblastos ondulados y terminaciones lisas de los ameloblastos. Las modulaciones ocurren en olas viajando de regiones menos maduras a más maduras. Su significación es desconocida. Se especula que están relacionados con alteraciones en la permeabilidad de la membrana y el transporte de calcio. Las terminaciones onduladas de los ameloblastos contienen muchos lisosomas, indicando considerable actividad endocitótica, proteínas de calcio y membranas asociadas a calcio ATPasas, mientras que las terminaciones lisas no presentan estas características. Una explicación para la modulación es que es necesario neutralizar el bajo PH asociado con el crecimiento de los cristales del esmalte. Los mecanismos que controlan los cambios en los ameloblastos son desconocidos.

Ciclo vital de los Ameloblastos.

El ameloblasto, estructural y ultraestructuralmente, constituye la unidad funcional del esmalte, ya que es la única célula responsable de la secreción de éste. Los ameloblastos atraviesan una serie sucesiva de etapas, desde ser indiferenciadas, diferenciarse, madurar, hasta desaparecer por completo. Las etapas o períodos que constituyen el ciclo vital del ameloblasto son las siguientes: 1) Morfogenética (pre-ameloblastos); 2) Diferenciación u organización (ameloblasto joven); 3) De Secreción o formativa (ameloblasto activo, secretor o maduro); 4) Maduración; 5) Protección; y 6) Desmolítica (Gómez de Ferraris, 1999).

En la etapa **morfogenética**, las células del epitelio interno del órgano del esmalte interactúan con las células ectomesenquimáticas de la papila determinando la forma de la unión amelodentinaria y de la corona. Se forman los pre-ameloblastos, fuente constante de provisión de ameloblastos. Los pre-ameloblastos son células inmaduras epiteliales cilíndricas y bajas, localizadas

en el asa cervical del epitelio interno del esmalte. Durante el proceso de diferenciación los pre-ameloblastos tienen actividad mitótica, su núcleo es alargado y central. El aparato de Golgi (adyacente al estrato intermedio) y el retículo endoplásmico rugoso están desarrollados insuficientemente, y las mitocondrias se localizan por toda la célula. Presenta numerosas prolongaciones citoplasmáticas que se extienden distalmente. Se inicia la expresión y la secreción de tuftelina, de sialofosfoproteína dentinaria y de ATPasa dependiente de calcio.

La etapa de **diferenciación** u organización coincide con el período de campana. Las células del epitelio interno del esmalte siguen expresando niveles bajos de receptores y se lleva a cabo la diferenciación de los odontoblastos. Los ameloblastos cambian de aspecto: las células se alargan, cambian de polaridad, los organelos y el núcleo se dirigen hacia el sitio basal (estrato intermedio), el retículo endoplásmico rugoso (RER) está algo desarrollado, y hay numerosos microfilamentos y microtúbulos. Los ameloblastos están alineados estrechamente uno respecto de otro, presentan uniones más apicales de tipo puntual (tipo macular), y permeables al paso de algunas sustancias hacia los espacios intercelulares y uniones más basales que rodean a toda la célula (variedad zonular).

Su nutrición no procede de la papila dentaria si no de los capilares del saco dentario, que rodean al órgano del esmalte y que penetran con el epitelio externo por invaginación hacia el estrato intermedio. Los cambios de polaridad se relacionan con la reprogramación de los mecanismos celulares que controlan el tráfico vesicular.

En el estadio **secretorio** los ameloblastos son células epiteliales cilíndricas altas 60 μ m en extremo con el citoplasma polarizado. Estos ameloblastos secretores son células diferenciadas muy especializadas, que ya han perdido la capacidad de dividirse por mitosis. Sufren cambios en el citoplasma, el núcleo es grande con cromatina laxa y un nucléolo evidente (el núcleo se encuentra en el polo basal). Hay abundantes mitocondrias cerca del núcleo, el aparato de Golgi está constituido por varios dictiosomas y el RER está distribuido por toda la célula.

Los elementos que constituyen el citoesqueleto se distribuyen a lo largo de la célula, siendo su integridad necesaria para la diferenciación total y la secreción de los ameloblastos. En el citoplasma se han descrito vesículas denominadas cuerpos ameloblásticos, o cuerpos adamantinos, que son formaciones de tipo granular, consideradas como precursores intracelulares de la matriz orgánica del esmalte, pero no se conoce con exactitud su contenido. Se originan en el aparato de Golgi y se localizan cerca de él. Podrían contener sales minerales cálcicas en forma soluble. Migran hacia el polo apical de la célula donde son liberadas contra la dentina. Se dice que la secreción de las proteínas del esmalte y la aparición de los cristales inorgánicos dentro de ellas, es casi simultánea.

Los cristales de esmalte y dentina se interdigitan, formando una capa amorfa de esmalte, los ameloblastos se alejan de la dentina y cada uno desarrolla una proyección cónica llamada proceso de Tomes, que es la estructura responsable de la formación de los prismas y la disposición de los cristales dentro del mismo. El proceso de Tomes presenta dos áreas distintas de secreción: el polo secretor con invaginaciones, que es el responsable de formar la cabeza de los prismas (que se dispone perpendicularmente a la superficie del polo secretor), y el polo secretor de superficie lisa, que es el responsable de la formación de la base del prisma. Se desconoce si existen mecanismos selectivos de polaridad en la elaboración, tránsito y secreción en el ameloblasto.

Los ameloblastos están unidos por desmosomas a las células del estrato intermedio y al parecer cada una de estas células está relacionada con seis ameloblastos, a los que coordina en los desplazamientos que éstos efectúan en el proceso de formación de los prismas del esmalte. Los desplazamientos para formar los prismas pueden ser verticales hacia atrás, laterales o en torsión (Gómez de Ferraris, 1999).

En el estadio secretorio tardío, las células reducen su peso y el proceso de Tomes empieza a acortarse hasta que desaparece. Las proteinasas del esmalte son de alto peso molecular (60-70 KDa). En este estadio esas proteinasas degradan a la amelogenina de manera menos eficiente que aquella

que está presente en el estadio de maduración (Smith et al 1989 a, b). En la fase de transición entre la etapa secretora y la de maduración se ha demostrado que muere el 25% de la población ameloblástica.

La etapa de **maduración** se produce después de haberse formado la mayor parte del espesor de la matriz del esmalte en el área oclusal o incisal, continuando la formación de la matriz en la parte cervical de la corona. Las amelogeninas son removidas de la matriz mineralizante. Las células ameloblásticas cambian de morfología y función, de secretorias a resorción y células transportadoras.

De este estadio primero se creía que era consecuencia de actividad de resorción de los ameloblastos presumiblemente vía endocitosis y la transferencia de las proteínas de la matriz a los lisosomas, ya que se localizaron antígenos de amelogeninas dentro de los lisosomas ameloblásticos. Ahora se piensa que este proceso es iniciado por proteasas específicas del esmalte, la pérdida de las proteínas de la matriz orgánica del esmalte es por una degradación progresiva de las amelogeninas secretadas por proteinasas a través de mecanismos altamente controlados.

Las proteinasas del esmalte son principalmente atribuidas a la clase de las proteinasas serinas. Los ameloblastos reducen ligeramente su tamaño, aumentan su diámetro transversal, el aparato de Golgi y su RER disminuyen de volumen, las mitocondrias se van hacia apical y el número de lisosomas y autofagosomas, con un contenido semejante al de la matriz orgánica del esmalte, aumentan considerablemente.

El proceso de Tomes desaparece y en el polo apical aparecen microvellosidades e invaginaciones tubulares, así las células tienen capacidad absorptiva para eliminar agua y matriz orgánica del esmalte. Así se facilita el espacio para que se incremente el material inorgánico y se vaya configurando el esmalte maduro. Disminuye considerablemente la producción de las proteínas del esmalte.

El ameloblasto sintetiza entonces abundante ATPasa dependiente de calcio, numerosas enzimas lisosómicas y progresivamente fosfatasa alcalina. El pH en la matriz cerca de las microvellosidades es ácido. Cuando la acidez

alcanza un determinado límite, la pared del polo apical se torna lisa y pueden desmineralizarse los cristales de esmalte (con altas concentraciones de Flúor podría acidificar más este microambiente). Durante esta etapa muere otro 25% de la población ameloblástica. El resto de las células (50%) debe ocupar el espacio previo existente y de ahí el carácter más aplanado de los ameloblastos.

En la etapa de **Protección** el ameloblasto entra en estado de regresión. Los ameloblastos dejan de estar organizados en una capa definida, ya no pueden distinguirse de las células del estrato intermedio y, en consecuencia, se fusionan con el resto de las capas del órgano del esmalte. Los organelos disminuyen de volumen y el complejo de Golgi vuelve a su posición inicial en el polo basal, junto a las células del estrato intermedio. Estos estratos celulares no distinguibles constituirán, finalmente, una capa estratificada denominada **epitelio reducido del esmalte** o epitelio dentario reducido, que protege al esmalte maduro, separándolo del tejido conectivo hasta la erupción del elemento dentario. El último producto de secreción de los ameloblastos es la llamada cutícula primaria o **membrana de Nasmyth**.

En la etapa **Desmólfica** el epitelio reducido del esmalte, o epitelio dentario reducido, prolifera e induce la atrofia del tejido conectivo que lo separa del epitelio bucal, de este modo pueden fusionarse ambos epitelios. Las células del epitelio dentario elaboran enzimas que destruyen el tejido conectivo por desmólisis.

En la figura 1.1 se resumen los cambios citológicos que se efectúan en el ameloblasto (según Ten Cate en 1986).

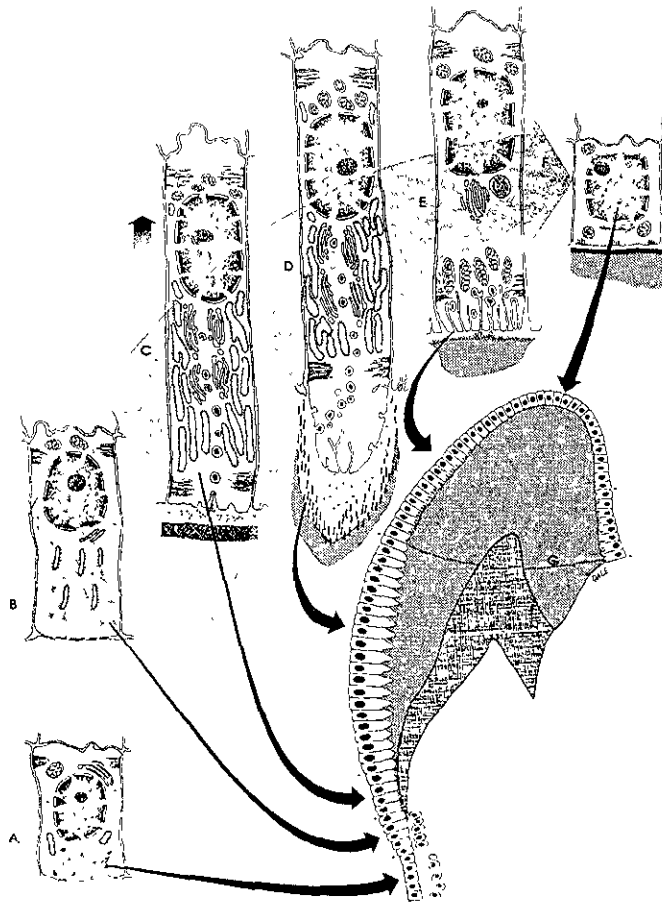


Figura 1.1: Amelogenesis (Ten Cate, 1989)

a) Célula indiferenciada en el estadio morfogénético (preameloblasto); b) La célula se alarga diferenciándose; c) Comienza la secreción. d) aparece la formación de la prolongación de Tomes; e) Estadio de maduración. f) Estadio de protección (Brookes S. J., 1995).

1.2- Evolución del material orgánico e inorgánico durante la Amelogénesis.

Generalidades.

La amelogénesis es el proceso de formación del esmalte. La biología de la amelogénesis está muy lejos de ser comprendida aún al nivel estructural (Reith , 1967). Los ameloblastos secretores contribuyen en la maduración del esmalte removiendo la matriz orgánica y agua, incrementándose el material inorgánico. Poseen abundantes ribosomas libres en las células hijas, cisternas endoplásmicas granulares y acumulación de mitocondrias que disminuyen cuando los ameloblastos se convierten de secretores a los ameloblastos de absorción (Moe, 1971).

En el esmalte la matriz orgánica se comporta de manera distinta con un patrón diferente de mineralización y su formación comprende tres estadios (Zeichner-David, 1995):

El primer estadio es formativo, implica la formación de una matriz orgánica, misma que se forma con una velocidad de 23 μm por día. Esta matriz se mineraliza casi instantáneamente; así el esmalte recién formado consta de alrededor de 65% de agua, 20% de material orgánico (proteínas) y 15% de material inorgánico (apatita). La secreción continúa hasta que se forma casi todo el espesor del esmalte y hay algunas modificaciones de la matriz. La matriz se mineraliza en un 30% y posee consistencia blanda.

El segundo estadio es el de maduración, proceso que comprende el crecimiento de cristales de mineral la pérdida de agua y proteínas. Comienza en el momento en que se ha alcanzado su total grosor, a nivel del extremo cuspídeo, siguiendo el mismo patrón de la secreción de la matriz, comenzando en el límite amelodentinario, radiándose hacia la superficie externa en un arco cervical a una velocidad de 40 a 50 μm diarios.

El tercer estadio corresponde a la formación del esmalte, y resulta en el agregado de más mineral y reducción de la porosidad (Zeichner-David, 1995).

Secreción de la matriz orgánica.

En la etapa de campana avanzada, el primer depósito de predentina induce a la diferenciación de los ameloblastos secretores y, en consecuencia, a la secreción del componente orgánico del esmalte (Gómez de Ferraris, 1999).

Los procesos de síntesis y secreción de la matriz se esquematizan de la siguiente manera.

- a) Síntesis de sustancias de bajo peso molecular en el RER.
- b) Concentración de esas sustancias en el complejo de Golgi.
- c) Formación de los gránulos secretorios o cuerpos adamantinos.
- d) Fusión de los cuerpos adamantinos y formación de vesículas apicales.
- e) Secreción por exocitosis de los cuerpos adamantinos o ameloblásticos.

La secreción de la matriz es de $4\mu\text{m}$ diariamente. Mientras segrega, el ameloblasto se desplaza hacia la periferia. Los primeros componentes de la matriz orgánica se depositan en los espacios ubicados entre los ameloblastos y la predentina, como islotes y después como una capa continua y delgada de esmalte a lo largo de la dentina, a la que se denomina membrana amelodentaria (de hasta $2\mu\text{m}$). En esta franja no es posible identificar prismas ni sus vainas, como tampoco se puede diferenciar más tarde si los cristales pertenecen al esmalte o a la dentina. La secreción ameloblástica no es continua sino rítmica lo que determina la formación de estrías. Cuando los ameloblastos terminan de producir la cantidad adecuada de esmalte, elaboran una delicada membrana orgánica llamada cutícula primaria.

Componentes de la matriz orgánica.

Las proteínas de la matriz del esmalte son polipéptidos, (glucosaminoglicanos, proteoglicanos y diversas clases de lípidos) glucosilados sintetizados y secretados por los ameloblastos (Davis, 1990). La matriz orgánica se configura con diferentes componentes a lo largo del proceso de diferenciación, la mayoría son vertidos en la etapa de ameloblasto secretor.

La primera en depositarse es la tuftelina (proteína aniónica del esmalte reportada su expresión inicial por Zeichner-David et al 1995), o proteína de los flecos, y la sialofosfoproteína dentinaria (DSP), en la unión amelodentinaria.

En segundo lugar se segregan amelogeninas que representan el 90%, el remanente 10% incluye una proteína rica en prolina no-amelogenina, proteínas serum y al menos una proteína salivaria.

La proteína no-amelogenina contiene enzimas como evidencia de la presencia de la regulación espacial y temporal de la actividad de las proteasas y fosfatasas en el desarrollo de la matriz (Brookes SJ, 1995). Una amelogenina hidrofóbica, rica en prolina en un 25-30%, es una proteína de 25 000 daltons con altos niveles de histidina, glutamina y leucina (Eastoe 1994). Numerosas especies moleculares con estas características en el desarrollo del esmalte, indican que la amelogenina es degradada extracelularmente, presumiblemente de manera enzimática, produciendo un rango pequeño de proteínas y péptidos, después de la secreción y continúa disminuyendo conforme el esmalte va madurando.

Luego se deposita la enamulina, una fosfoproteína ácida glucosilada, compuesta por glicina, ácido aspártico, serina y ácido glutámico, con un peso molecular de alrededor de 55 000 daltons, que posiblemente participen en el proceso de mineralización (Ten Cate AR, 1986; Catalanos JA, 1993).

Por último se origina la ameloblastina; ésta se relaciona con la nucleación del esmalte. A estos compuestos hay que añadir, en la matriz del esmalte, enzimas proteolíticas muy significativas: las metaloproteasas, presentes en la etapa de secreción de los ameloblastos, y las proteasas de serina, presentes y activas en la etapa de maduración en la que se asocian a la superficie de los cristales. También están presentes otras enzimas como la fosfatasa alcalina, la ATPasa dependiente de calcio y la anhidrasa carbónica. También pueden encontrarse en la matriz orgánica del esmalte otras proteínas de procedencia sérica como las globulinas y la albúmina (conocido inhibidor de la hidroxiapatita y del crecimiento del cristal, Gómez de Ferraris, 1999).

La consistencia del esmalte recién formado es blanda, su contenido proteico alcanza el 20%, mientras que en el esmalte maduro es de 0.36% y tiene la dureza de la apatita. La clave de su maduración es la pérdida de agua y contenido orgánico.

Durante la maduración el material proteico es removido selectivamente, se extraen todas las amelogeninas y quedan las enamelinas que se unen a las

superficie de los cristales, mientras que por último las ameloblastinas se unen a las enamelinas.

Mineralización de la matriz orgánica.

El depósito inicial de minerales se lleva a cabo en la unión amelodentinaria (UAD), creciendo más tarde los cristales con la adición de iones en su extremo terminal. La tuftelina y la sialofosfoproteína dentinaria DSP se unen al componente mineral para iniciar el proceso de mineralización (la tuftelina se asocia con la hipermineralización en la UAD). Antes de la formación del esmalte se expresa la ameloblastina.

Se ha podido demostrar que utilizando amelogenina recombinante (Fincham, 1994), se localizan formaciones esféricas o nanoesferas de 20nm alrededor y entre los cristales iniciales de 1 a 3nm de espesor (**figura 1.2**). Cada nanoesfera está integrada por 100 monómeros de amelogeninas, constituyendo hileras en forma de rosario, dejando libre la superficie de los cristales próxima a los ameloblastos que le siguen aportando Ca^{2+} y PO_4^{3-} para su crecimiento. Las esferas son electrolúcidas al ser observadas al MET, **figura 1.3** (Zeichner-David, 1995; Fincham et al, 1995). Estas estructuras previenen el crecimiento lateral y la fusión o fractura de estos cristales iniciales. La enamulina puede participar en esta malla reticular de materia orgánica que de forma progresiva va configurando el soporte del cristal.

La disposición descrita de estas proteínas permite regular la morfología y el tamaño del cristal, o el contacto de su superficie con otras sustancias, como la albúmina (inhibidor del crecimiento de los cristales) también presente en la matriz. Las metaloproteasas y las proteasas serina con su actividad enzimática remodelan la matriz, degradando y eliminando el componente orgánico.

Este crecimiento controlado de los cristales hace posible que se establezcan puentes o bandas entre los mismos, para más tarde (por coalescencia) configurar los cristales definitivos.

El proceso de mineralización avanza con la sustitución progresiva de agua y material orgánico, apareciendo en su última fase la ameloblastina segregada por las vertientes lisas de los ameloblastos, contribuyendo fundamentalmente en la

configuración de los límites de los prismas y en la constitución de la vaina del prisma.

El último aporte de sales minerales proviene de los capilares del saco invaginado en el órgano del esmalte (Gómez de Ferrari, 1999). El esmalte adulto ya erupcionado continúa incorporando iones en su superficie; o sea que puede haber remineralización en relación directa con el grado de permeabilidad del esmalte.

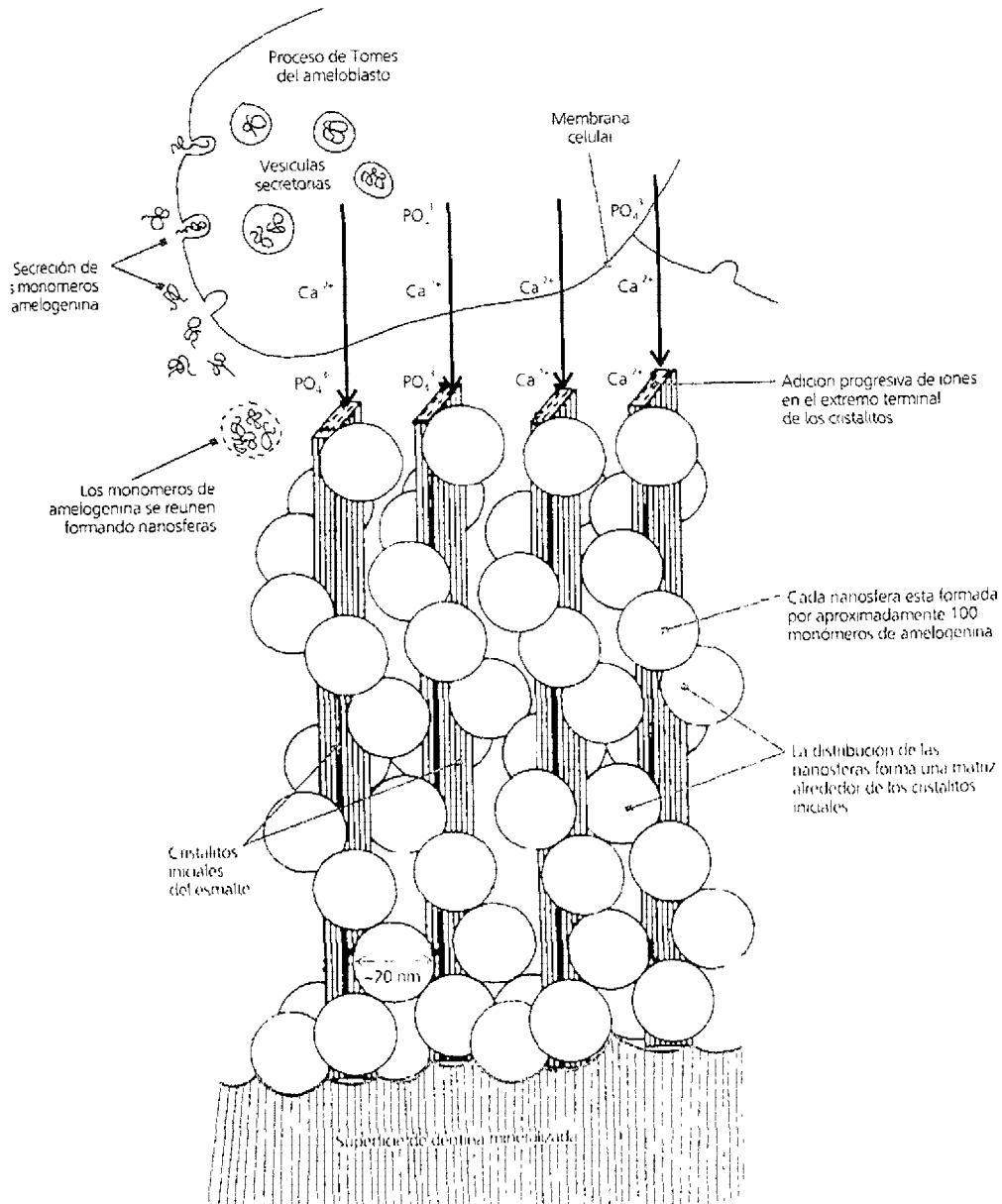


Figura 1.2. Matriz orgánica y cristales iniciales del esmalte. Cada nanoesfera de amelogenina contiene unos 100 monómeros (Modificada de Fincham). Nótese la sugerencia de la existencia de la línea oscura a partir de este proceso.

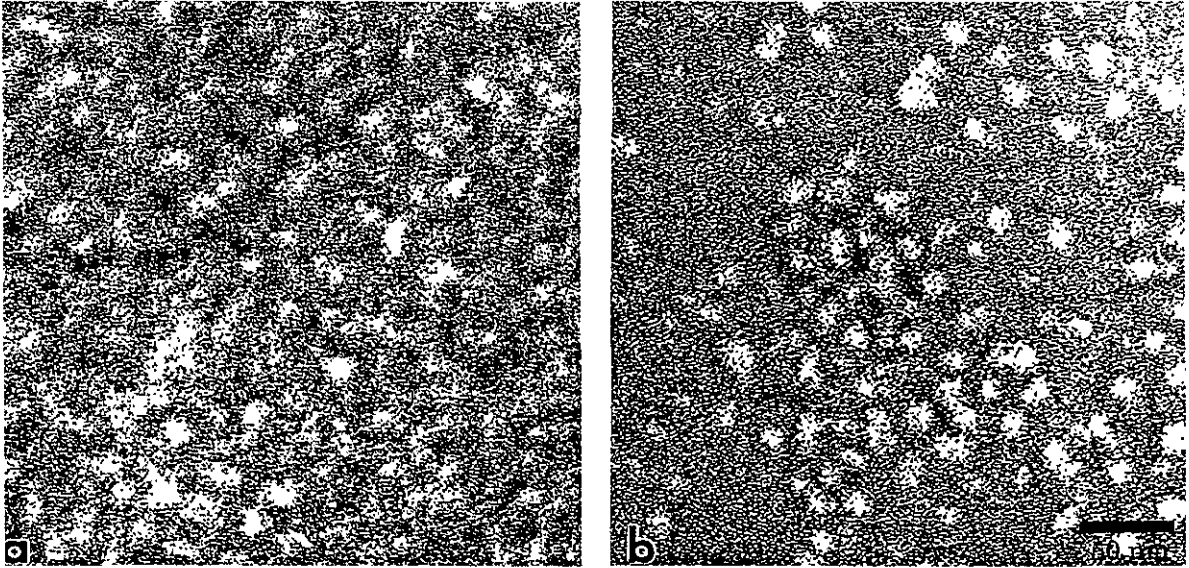


Figura 1.3 Micrografía de MET de las nanoesferas. A) Mostradas in vivo y b) mostradas in vitro en molares de ratón. Las nanoesferas fueron contrastadas con acetato de uranilo. Barra 50 nm (Zeichner-David, 1995).

1.3. LA ESTRUCTURA DE LOS CRISTALES DE ESMALTE.

En sentido estrictamente biológico, el esmalte del diente ya erupcionado es un tejido inorgánico. El contenido por peso en esmalte maduro está en el rango de 97% mineral hidroxiapatita, 1.5% matriz orgánica y 1.5% agua (Lefevre and Manly, 1932; Deakins and Volker, 1941; Le Geroz, 1991). Este tejido es permeable: existe intercambio iónico entre el esmalte y el medio bucal, en particular la saliva.

Su alto contenido inorgánico lo hace especialmente vulnerable a la desmineralización; es un biomaterial formado principalmente por hidroxiapatita, compuesta por millones de granos cristalinos nanométricos. Esta hidroxiapatita es impura ya que acepta fácilmente átomos en su celda unitaria. El esmalte es un tejido que soporta fuerzas similares a las que soporta el acero liviano, pero muy sensible al ataque de ácidos orgánicos.

En la nucleación de los cristales, la coordinación, posición, la estructura del cristal, su forma y orientación están bajo control genético. El control sobre la mineralización del esmalte durante su formación es posible gracias a un compartimento aislado dentro del órgano del diente. Este espacio extracelular se encuentra protegido de influencias externas por dos capas de células que bloquean la filtración aún de pequeños iones en la cámara. Su composición está determinada enteramente por actividad secretoria y reabsorvedora de las células que las cubren.

El esmalte dental ya mineralizado tiene forma de ojo de cerradura, visto por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), en sección transversal y alargada en sección longitudinal (**figura 1.4**). Al microscopio de transmisión (**figura 1.5**), el prisma está formado por cristales nanométricos. En el prisma se distinguen dos regiones: la cabeza, o cuerpo, y la cola. La cabeza corresponde a la región más ancha y se halla limitada por superficies cóncavas; el diámetro de la misma es de 5 μm . La región de la cola es la más delgada. La distancia existente entre la parte media del borde convexo de la cabeza hasta la cola es de 9 μm de longitud.

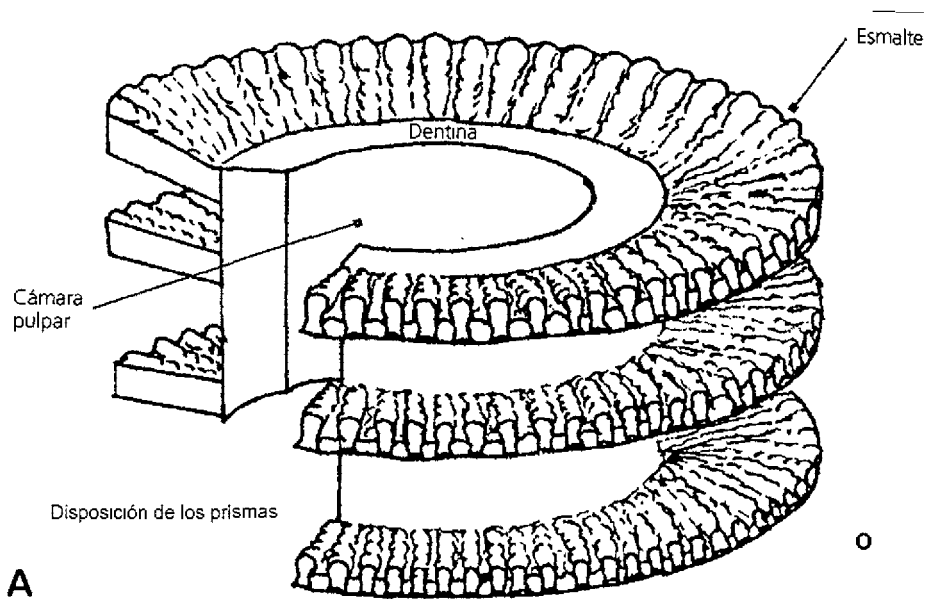


Figura 1.4. Forma y disposición de los prismas del esmalte dental ya mineralizados. En sección transversal los prismas presentan forma de cerradura, y se observan alargados en sección longitudinal, tal como se muestra en A. En B se muestra una imagen de esmalte tomada por MEB. En C se muestra una ampliación del recuadro mostrado en B.

Los cristales de la cabeza son paralelos a su eje longitudinal, mientras que los cristales de la cola son perpendiculares (**figura 1.5**). El sistema de engranaje entre los prismas confiere mayor resistencia al esmalte, pues la cabeza soporta los choques de las fuerzas masticatorias y las colas las distribuyen y las disipan (Cev et al, 1980).

El material orgánico es muy escaso y se distribuye básicamente en la periferia de los prismas rodeándolos; es muy insoluble y corresponde a la denominada vaina de los prismas (zonas de menor grado de mineralización, por su mayor contenido de proteínas haciendo una interfase), es una zona muy delgada (de 50 a 100 nm de espesor y carece de cristales).

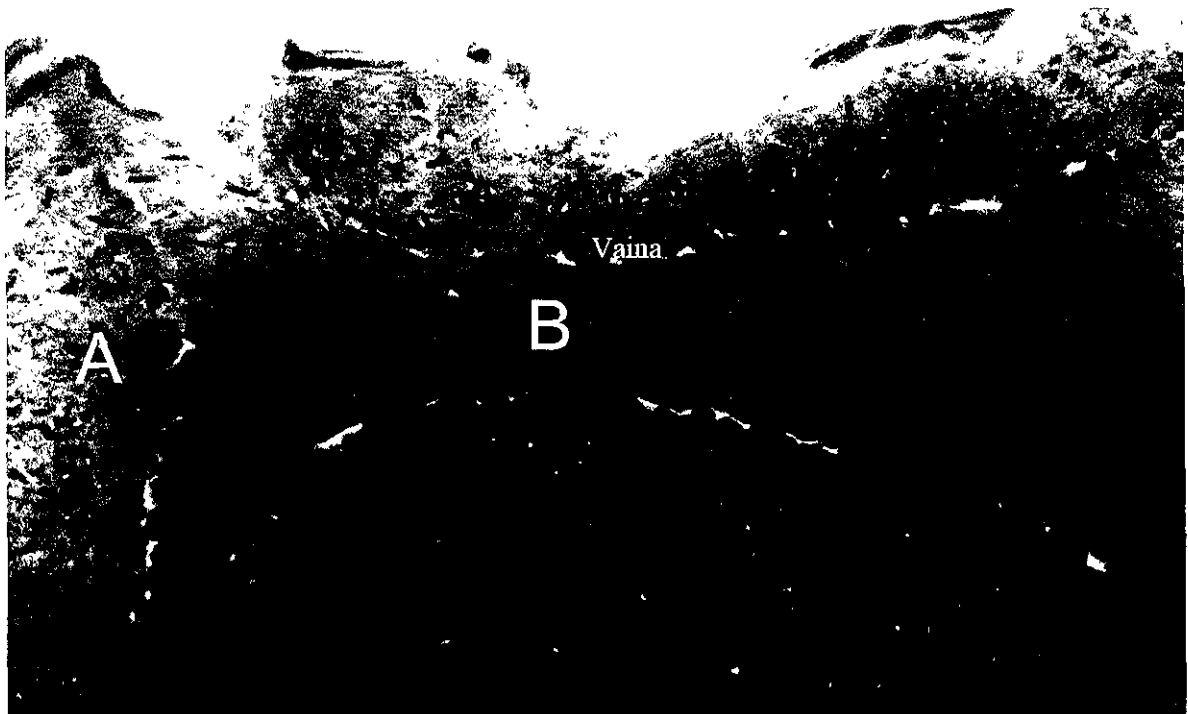


Figura 1.5. Micrografía por MET del esmalte. A), cabeza del prisma. B) cola del prisma y la Vaina o Región interprismática (Reyes-Gasga, 1995).

El espacio entre los cristales también está lleno de material orgánico. Otras de las estructuras que se pueden observar fácilmente por microscopía son, penachos¹ y los husos adamantinos² (**figura 1.6 y 1.7**), las líneas de (crecimiento) Retzius³ (**figura 1.8**), las periquimatías⁴ y estructuras que son variaciones en la orientación de los prismas llamados Bandas de Hunter Schreger⁵ y el esmalte nodoso⁶ (**figura 1.7 y 1.9**).

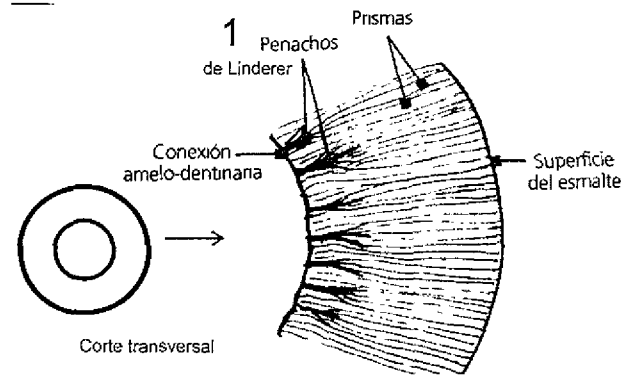


Figura 1.6. En el corte transversal se destaca la forma de los penachos de Linder¹.

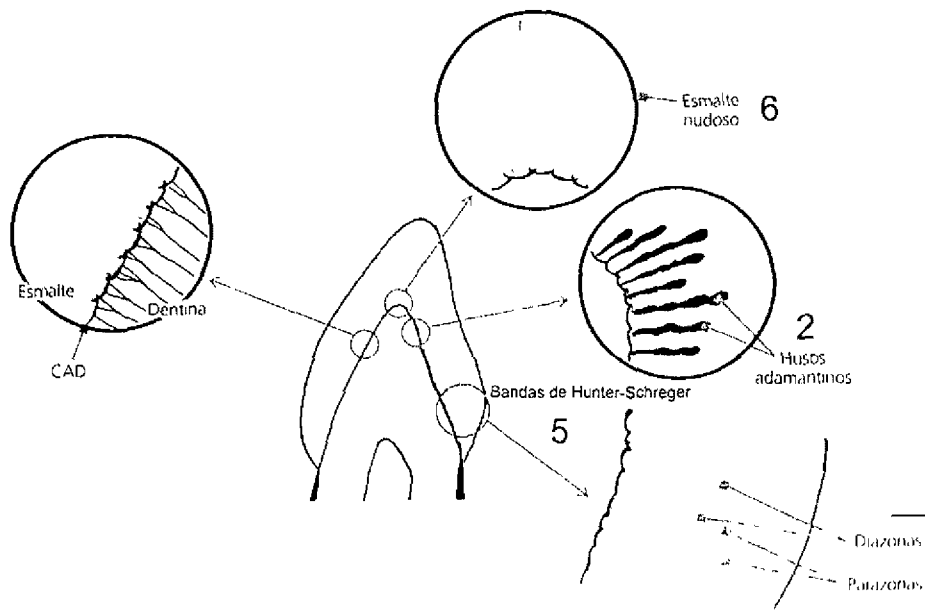


Figura 1.7. Diagrama que representa estructuras determinadas por variaciones en la dirección de los prismas (bandas de Hunter-Schreger⁵ y esmalte nodoso⁶); estructuras sin esmalte (husos adamantinos²) y el aspecto de la unión amelodentinaria.

1.4. NUCLEACIÓN, CRECIMIENTO y MORFOLOGÍA DE LOS CRISTALES DEL ESMALTE.

Simmer en 1995, menciona que el contenido mineral del esmalte debe ser considerado una hidroxiapatita de calcio carbonatada no estequiométrica, y que su posible **crecimiento** ocurra en tres estadios.

- 1) Formación de la semilla incipiente. Un grupo mínimo de iones capaces de sobrevivir y su subsecuente crecimiento en un cristal.
- 2) Crecimiento bidimensional de la semilla. La semilla crece en longitud y anchura, pero no en espesor. Que probablemente sea un cristal de fosfato octocalcico con un espesor de una sola celda unitaria.
- 3) Crecimiento tridimensional, proponiendo que envuelve dos pasos.
 - Precipitación: Con el posible espesor de una celda unitaria de fosfato octocalcico (OCP), precipitado en la cara (100) del cristal.
 - Hidrólisis: El espesor de una celda de OCP hidroliza en el espesor de dos celdas unitarias de hidroxiapatita (HAp).

Se postula que las amelogeninas tendrían interiores hidrofóbicos y superficies aniónicas, los cuales pudieran interactuar en vivo con el crecimiento de cristales (Simmer, 1995).

Los métodos utilizados para obtener micrografías del proceso de crecimiento, la morfología de los cristales y sus mediciones en anchura, espesor y longitud han mejorado gracias al desarrollo de la microscopía. Así por ejemplo al querer obtener mediciones de los cristales Jensen y Möler emplearon primero técnicas de rayos X en 1948. Con la aparición de la microscopía electrónica de transmisión se fue depurando esta técnica de medición desde 1955-1959 con Little, Frank et al en 1960, Röhhnolm en 1962, Nylén en 1964-1965, Frazier en 1968, Jongebloed et al 1975, Kerebel y Daculsi en 1976, etc. Hasta ir logrando resultados más confiables y aplicando técnicas matemáticas adicionales.

Veamos entonces a grandes rasgos como fue este avance. Una vez desarrollada la microscopía electrónica Nylén et al, en 1963, empezaron a hacer observaciones, a través de ésta y rayos X, del tamaño y forma de los cristales de

esmalte de roedores durante su desarrollo y mineralización, describiendo su morfología como láminas delgadas (**figura 1.10**), y con patrones de difracción de área selecta confirmaban que se trata de hidroxiapatita. El avance de la mineralización aumentaba en espesor y anchura desarrollándose de manera hexagonal, midiendo los cristales maduros 50 a 60 nm de ancho y 25 a 30 nm de espesor.

Utilizando por primera vez Microscopía Electrónica de Alta Resolución (HREM) para medir los cristales de esmalte humano en gérmenes de incisivos fetales y dientes erupcionados temporales, Daculsi y Kerebel (1978) comentan que durante las primeras etapas del proceso bajo la influencia de los ameloblastos, los cristales crecen rápidamente en anchura y lentamente en espesor. Al final de esta etapa alcanzan su promedio final de crecimiento en anchura. El crecimiento en espesor es un proceso lento y se alcanza hasta que maduran. Conforme crecen los cristales, pasan de forma rectangular a prismas hexagonales planos. Los valores promedio fueron 26.3 nm en espesor y 68.3 nm en anchura. La existencia de una vaina orgánica cercana a los cristales no está confirmada.

Kerebel, en 1979, estudia la curva de crecimiento de los cristales de esmalte, dibujando el aumento en el número de planos de red durante el transcurso del desarrollo del esmalte. El y sus colaboradores visualizaron fusiones y dislocaciones relacionadas con el proceso de maduración. La matriz orgánica de los cristales permanecía sin resolverse.

Weiss et al, en 1981, siguen el crecimiento de los cristales a través de determinaciones de espesores y anchura en esmalte dental de gatos recién nacidos y de fetos humanos (de 5 meses). Sus valores de espesor fueron de un mínimo de 2 nm en ambas clases de muestras, con un máximo de 3.7 nm. Comentan que los resultados obtenidos en los valores de los picos son compatibles con la presencia de capas mezcladas de OCP y HAP. Además plantean diversas propuestas sobre las diferentes posibilidades de combinaciones entre las capas de OCP Y HA.

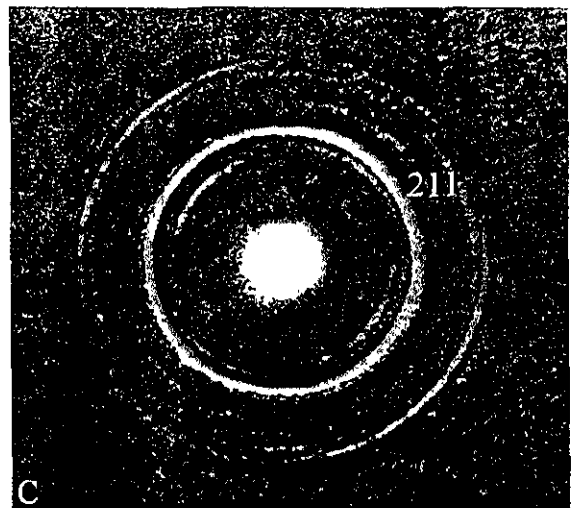
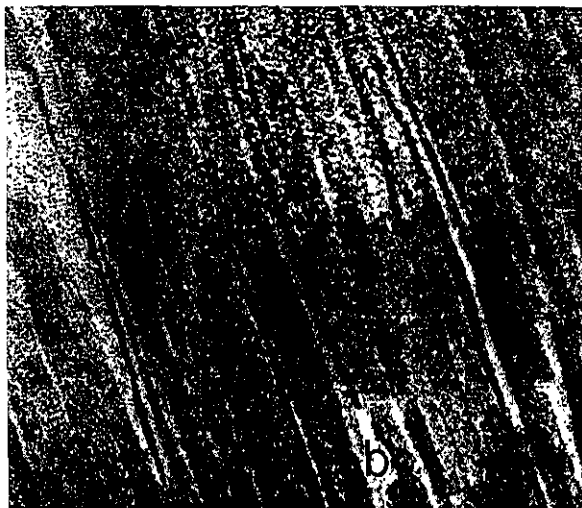


Figura 1.10. a) Morfología de los cristales de esmalte de roedor con diferentes anchuras; b) Cristales de esmalte en forma de listón y c). Patrón de difracción del esmalte que se indexa completamente utilizando los parámetros de HAP (Nylen et al, 1963)

Weiss coincide en cada caso consistentemente con lo dicho por Brown y sus colaboradores (1962), que fueron los primeros en proponer estructuras de intercapas de OCP – HA y notar su similitud entre capas llenas con fosfatos y grupos de agua, diciendo que las capas de HA existen en pares y que tal vez indiquen que el OCP juega un importante papel en los estadios tempranos del crecimiento de los cristales de esmalte.

Al analizar la forma de los cristales de HA de esmalte de rata, Warshawsky y sus colaboradores, en 1982 y 1987 observaron que los cristales mostraban hexágonos en secciones cruzadas al ser examinadas con MET. Usando el goniómetro del MET, se tomaron micrografías electrónicas de estereo-pares (**figura 1.11-A**) y réplicas de fracturas congeladas, además se propusieron dos modelos para explicar el perfil hexagonal de los cristales.

El modelo del **listón hexagonal** propone que los perfiles hexagonales en la cima pueden mostrar lados iguales o no iguales pues son secciones cruzadas verdaderas pero no perfectas, de listones alargados hexagonales y pueden mostrar un sobrelapamiento. El modelo de listones rectangulares propone que los perfiles de los cristales son segmentos rectangulares tridimensionales (paralelepípedos), que están contenidos en las secciones de epon y proyectados como hexágonos opacos en las micrografías de transmisión.

Observaciones morfológicas junto con predicciones de modelos indican que los cristales de esmalte de incisivos de ratón son listones planos con perfiles rectangulares en sección cruzada. Las imágenes hexagonales vistas en micrografías electrónicas en secciones delgadas de esmalte mostraron variaciones en su densidad y en el tamaño de los cristales (**figura 1.11-B y 1.11-C**) y resultan de la vista en segmentos con forma de paralelepípedo de estos cristales como sombras bidimensionales (Warshawsky, 1987).

En una de las investigaciones hechas por Simmelink et al, compararon la morfología y los patrones de disolución en un examen ultraestructural en cristales de esmalte de rata y humanos así como en cristales de hidroxiapatita sintéticos.

Se aislaron cristales de esmalte de rata en desarrollo y maduros, cristales de esmalte maduro humano y apatita sintética, seccionadas finamente, examinadas

con MET sin descalcificar y las que se expusieron a ácido. Los resultados mostraron que las secciones cruzadas de todos los cristales tuvieron una

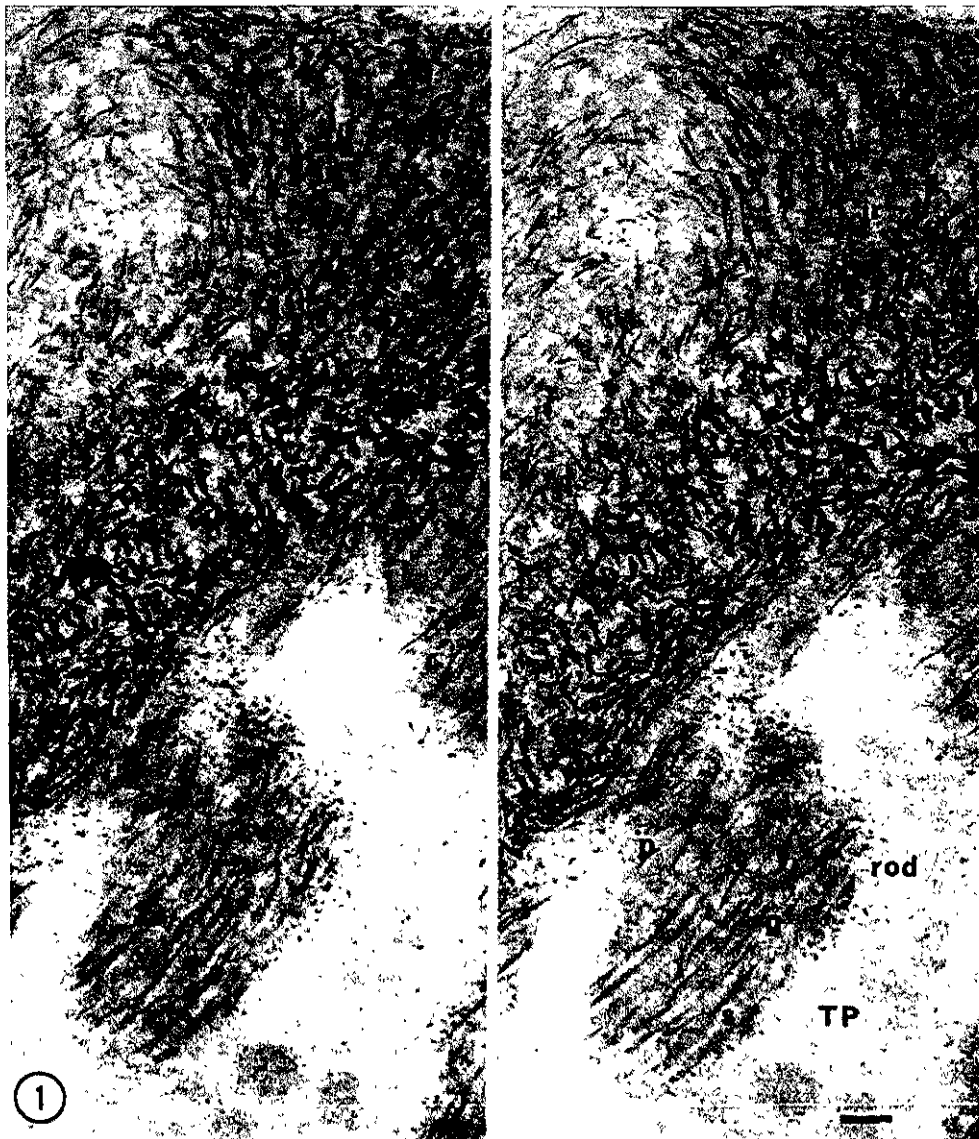


Figura 1.11-A. Micrografías estereo de los nuevos cristalitas formados del esmalte interno en el estado de secreción, cerca del proceso de Tomes (TP), en incisivos de rata; perfiles grises (g); líneas pálidas (p); líneas filosas oscuras (s); cristales orientados longitudinalmente se ven en el camino (rod) del esmalte depositado adyacente al proceso de Tomes (Warshawsky y Nanci, 1982).

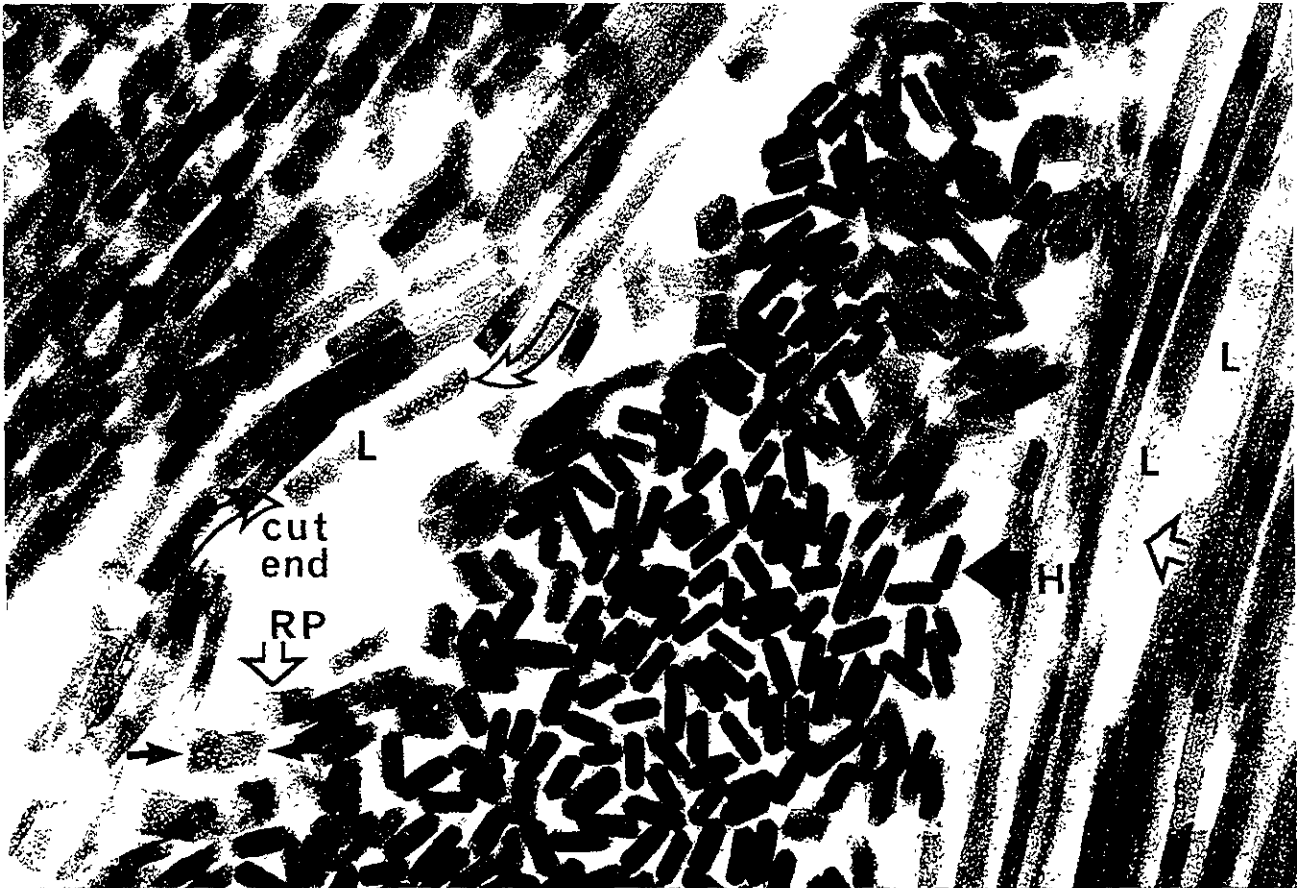


Figura 1.11-B. Micrografía electrónica de cristallitos, tanto en sección transversal como longitudinal, de esmalte externos en la zona de maduración. L, cristales situados longitudinalmente. En el eje longitudinal los cristales son mayores. Flechas curvadas, terminaciones de los cristales cortados. La flecha sólida muestra el espesor del cristal al ser inclinados. Flecha abierta RP, señala perfiles rectangulares y hexagonales (Warshawsky et al, 1987).



Figura 1.11-C Amplificación de la figura 1.11 Los cristales se pueden ver hexagonales (HP) o rectangulares (RP). Se notan las variaciones en la intensidad y el tamaño de los cristales. Imágenes opacas (O), así como translúcidas. Las imágenes hexagonales muestran picos que tienen lados iguales (e) o diferentes (un). El sobreapilamiento de los cristales se indica con los asteriscos, indicando que si las imágenes fueran perfectas secciones cruzadas tal sobreapilamiento sería imposible. 50 000 X (Warshawsky et al., 1987).

distorsión en la línea externa de los hexágonos planos en regiones donde el crecimiento de uno de los cristales afectaba a otro. La disolución de los cristales ocurrió preferencialmente a lo largo del eje c produciendo un defecto central o un hoyo en los cristales de aproximadamente 10 nm de espesor. Estudios preliminares con un ácido débil en cristales de esmalte humano maduro indicaban que la relativa solubilidad del centro del cristal es rápidamente disuelta en la totalidad de su espesor mientras que la parte externa permanece intacta por un período más largo de tiempo como se muestra en la figura 1.12.

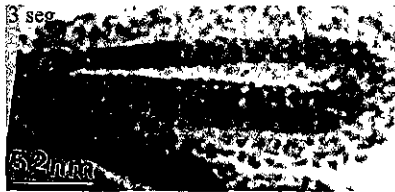


Figura 1.12. Disolución de un cristal de esmalte dental humano sometido a ataque ácido durante 3 segundos. Nótese que esta disolución disuelve primeramente el centro del cristal (Reyes-Gasga, 1995).

1.5. LINEA OBSCURA CENTRAL

La línea oscura central se observó gracias a la microscopía electrónica. Ya desde 1963 fue localizada por Nylen, mencionando la presencia de una línea densa que se observaba en el centro de los cristales, aunque no en todos ellos. Frazier en 1968 estudió cristales de esmalte dental humano y al observar los hexágonos aplanados reporta la existencia de algunas irregularidades en sus superficies. Establece que solo el 20% de los cristales que estudia presentan esa línea opaca en su eje longitudinal.

En 1979 Kerebel B., Daculsi y Kerebel L.M., estudiando con TEM el diámetro, anchura y espesor de los cristales de esmalte en los primeros estadios hasta su maduración, comentan que gracias a la microscopía electrónica de alta resolución se pudo visualizar y localizar las dislocaciones de borde en las apatitas biológicas; en el centro de los cristales de esmalte fetal humano, lo que correspondería a la CDL. Marshall y Lawless en 1981 muestran, en imágenes de

red y microdifracción, la CDL comentando que ésta representa un defecto planar que incluye un solo plano (100) de la estructura de hidroxiapatita. Comentan por primera vez que la imagen de dicha línea depende de las condiciones específicas de difracción.

Nelson et al en 1986 trabajaron en el sobrecrecimiento del fosfato octocalcico y la apatita (**figura 1.13**). Los sobrecrecimientos fueron preparados usando un método de composición con cualquier semilla la de OCP o HAP de esmalte dental. La interfase OCP-HA se observó usando alta resolución. El análisis químico mostró que el OCP podía crecer en semillas de apatita bajo condiciones de composición constante. Pero el crecimiento de la apatita en OCP sin embargo, no guardaba una composición constante, indicando el crecimiento de una fase más pH básica que el OCP con una razón molar Ca/P de 1.50 ± 0.04 . Con microscopía de alta resolución confirmaron que esta fase es similar a la apatita. Los datos mostraron que es posible crecer apatita en OCP y viceversa cerca de un pH fisiológico.

Los crecimientos de HA y OCP son de interés biológico ya que ambas fases parecen precipitar durante la mineralización del tejido duro. Se ha afirmado, apoyándose en microscopía de alta resolución, que la Línea Obscura (CDL) consiste en una expansión mayor de la red de aprox. 20% en el centro del cristal y que corresponde a la celda unitaria del fosfato octocalcico, a través del plano (300) y (600), con espacios interplanares de 0.27nm y 0.31 nm respectivamente.

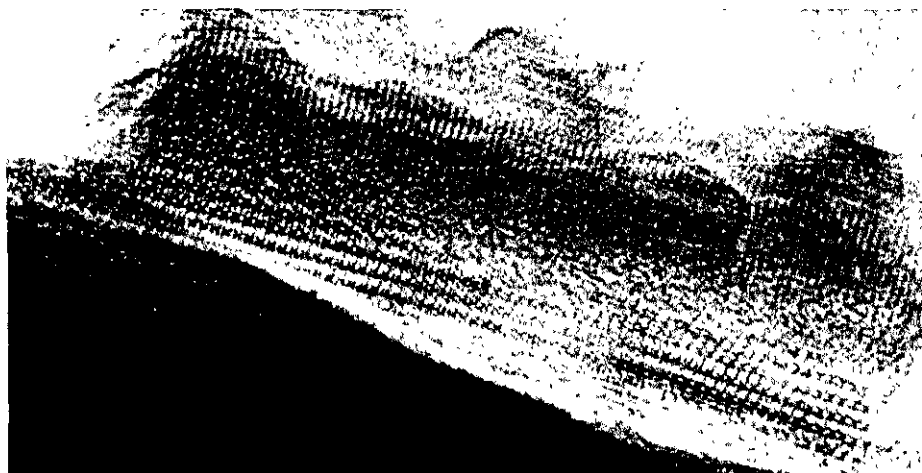


Figura 1.13. Observación por MET de alta resolución del sobrecrecimiento del fosfato octocalcico en una semilla de hidroxiapatita (Nelson et al., 1986).

Examinando cuidadosamente imágenes de microscopía electrónica de alta resolución y comparándolas con imágenes simuladas por computación, así como con el uso de técnicas de difracción de electrones junto con consideraciones de datos químicos, Nelson et al, determinaron con razonable certeza los detalles estructurales del cristal con la estructura común de un defecto encontrado en cristales de apatita biológicos en el centro de los cristales de apatita sintética carbonatada. En cristales de apatita de esmalte dental, dentina y hueso se han observado intercrecimientos similares 0.8-1.5 nm en anchura.

Tratando de explicar en que consistía la línea oscura central, consideran que pudiera ser un remanente de matriz orgánica calcificada, o una dislocación de tornillo, maclas o una frontera de grano, o bien que se trata de un defecto planar localizado de iones de carbonato coherentes con la estructura de la HA. Defectos típicos fueron consistentes con inclusiones de fosfato octocalcico, con un espesor de una celda unidad, embebida en una matriz de apatita. A partir de sus observaciones sugiere que la CDL son inclusiones de fosfato octocalcico, consistente en una celda unitaria de OCP embebida en la matriz de apatita. Proponen que tal vez en la primera etapa de la mineralización existan, nucleaciones y posteriormente se asocien a la Línea Oscura.

Por lo tanto, hay cuatro modelos sugeridos para explicar esta línea:

- 1) Se propone la existencia de vacancias de calcio de aproximadamente 41 nm de anchura pero sin desplazamientos de la red.
- 2) Fallas de apilamiento y como resultado una contracción del vector $[1/4 0 0]$.
- 3) La incorporación del OCP con un espesor de una celda unidad embebida en una de apatita.
- 4) La contracción de la capa central deficiente de Ca, poniendo átomos en sitios cercanos apatíticos correspondientes. Que con vacancias, la estructura del OCP se colapsara a la estructura de una apatita (Nelson 1986).

Cuisinier y sus colaboradores, estudiando cristales de esmalte dental fetal humano por microscopía de alta resolución observan nuevamente la forma clásica

de listones, descritos como los primeros minerales organizados que se forman durante la amelogenesis. Los cristales presentaron un cociente anchura / espesor de 9.5 y el 40% estaban unidos. En las imágenes de red se notó la presencia de la línea obscura central (CDL) asociada con manchas blancas. Ambas estructuras se encontraron en cristales con un mínimo de espesor de 8 a 10 nanómetros. La fase del esmalte se describe como una HA carbonatada no estequiométrica de cristales hexagonales, con numerosos defectos, distorsiones en la red, dislocaciones, fronteras de grano y simetrías hexagonales perdidas.

Se detectaron fronteras a bajo y alto ángulo. Las fronteras de bajo ángulo se observan en el centro del cristal, y podrían estar relacionados con la CDL y estar implicados en uno de los pasos de la nucleación en la formación de los cristales. Las fronteras de alto ángulo podrían resultar de la fusión de los listones de los cristales. Tales mecanismos podrían inducir una aceleración del crecimiento en espesor de los cristales observados durante el estadio de maduración de la amelogenesis. Mencionan que la CDL siempre se localiza en el centro de los cristales y termina antes de alcanzar los extremos del cristal, de ahí que sea ligada al mecanismo inicial de crecimiento. En este reporte se presentan dos hipótesis para explicar su origen.

- 1) La CDL que podría ser creada por variaciones cristalográficas locales (como dislocaciones o la introducción de impurezas), o ser atribuida a defectos bidireccionales, tales como fronteras que fueron observadas en cristales maduros pero que no eran absolutamente correlacionados con la CDL.
- 2) La CDL podría ser atribuida a sustituciones iónicas, tales como sustituciones carbonatadas en el centro del cristal.

Este grupo continuó con los estudios en cristales inicialmente formados durante la amelogenesis, utilizando técnicas de difracción por rayos X, que reveló solamente la existencia de hidroxiapatita carbonatada (cHA). Mientras que en investigaciones con MET mostraron que los cristales de esmalte en desarrollo tienen forma de listón y sufrían cambios en su composición, pudiendo indicar la presencia de diferentes minerales de cHA. Observan también la presencia de

partículas de tamaño nanométrico (figura 1.14) cercanas a los cristales de esmalte y los cristales en forma de listón.

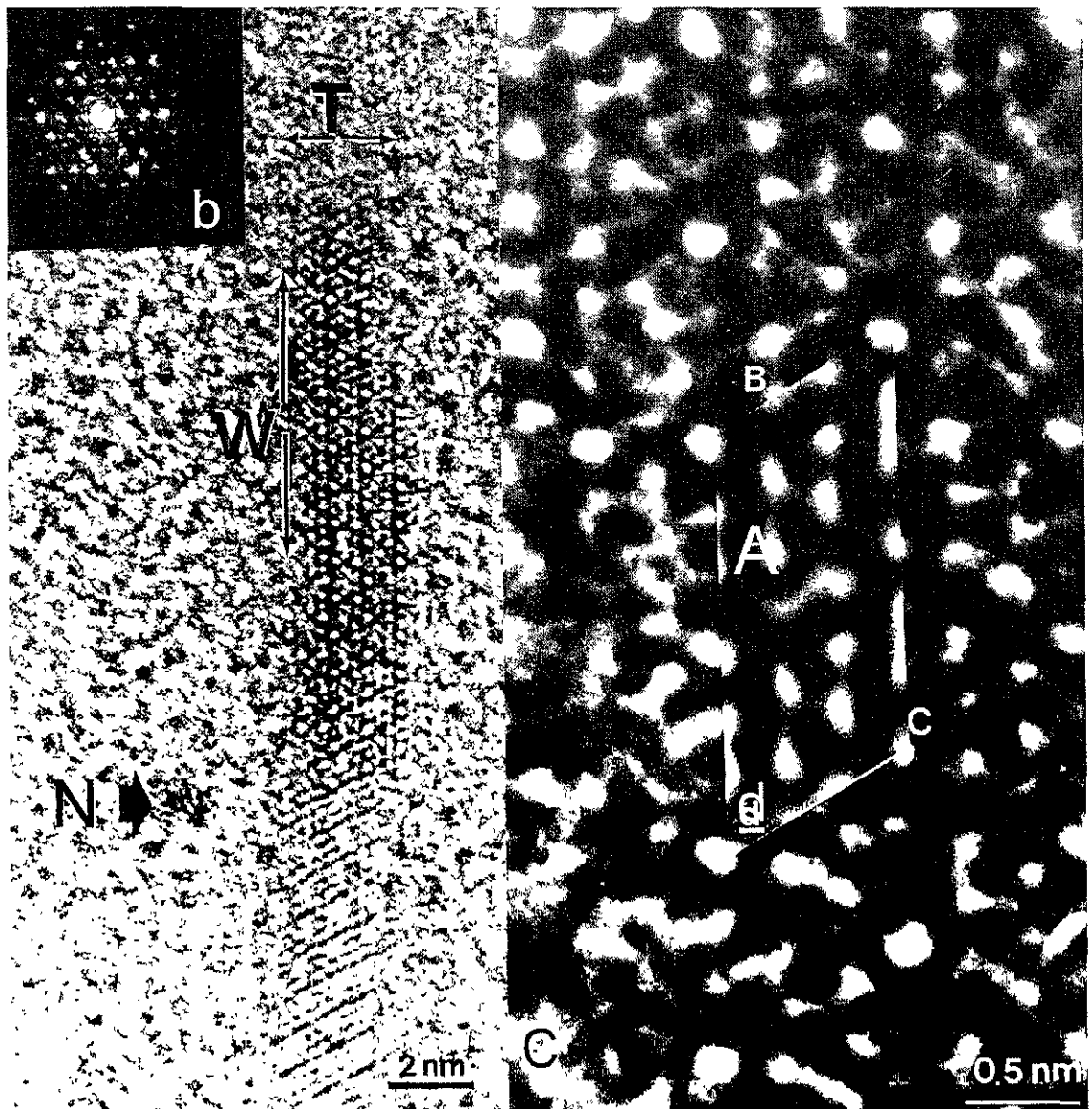


Figura 1.14. Micrografía de una posible fase precursora del cristal, un cristal N señalando su anchura (W) y espesor (T); b, su patrón de difracción; C, la imagen digitalizada; A, celda unidad (Cuisinier et al., 1992).

Estas partículas podrían ser una fase precursora de los cristales observados como listones. Esta hipótesis está basada en el hecho de que ambas formas cristalinas se encontraron durante la amelogénesis, el tamaño nanométrico de las partículas, nunca habían sido detectadas en el esmalte maduro (Cuisinier, 1992).

Buscando observar la CDL o interfase entre el OCP y la HA, Iijima (1992) y colaboradores llevan a cabo experimentos sintetizando mezclas laminares de cristales de fosfato octocalcico y apatita (**figura 1.15**), en un sistema de formación de esmalte en presencia de 1 ppm F^- a 37°C y un pH de 6. El cristal tiene una morfología como lámina delgada y larga, conteniendo una lámina de OCP en el centro de la matriz de apatita.

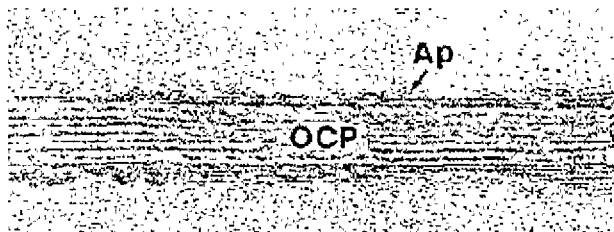


Figura 1.15. Sobrecrecimiento de fosfato octocalcico e hidroxapatita (Iijima et al., 1992).

El espesor de la lámina de OCP en dirección del eje a es una de varias celdas unitarias. Algunos cristales de apatita embeben una capa central en lugar de una lámina distinta de OCP. La lámina de OCP y la lámina central son paralelas al plano (100) de la apatita, mientras que el eje c del OCP es paralelo al eje c de la apatita. El análisis sugiere que el F^- causa el crecimiento de la apatita en el OCP y regula la formación de los cristales mezclados en láminas de OCP y apatita. Las láminas de OCP actuaron como un templete para el subsecuente crecimiento epitaxial de apatita y el crecimiento de cristales mezclados en láminas principalmente en dirección del eje c de ambos, el OCP y la apatita.

Estos resultados soportan fuertemente la idea de que el OCP actúa como un templete o substrato para el subsecuente crecimiento de apatita en la formación del esmalte. En la **figura 1.16** se muestra el modelo de crecimiento lamelar, cristales mezclados de OCP y apatita.

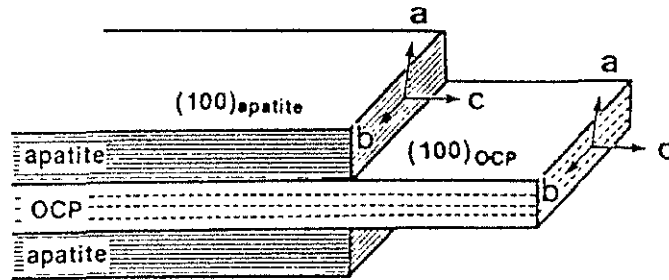


Figura 1.16. Modelo de crecimiento lamelar, cristales mezclados de OCP y apatita. Iijima, 1992.

Investigando los cambios en la morfología de los cristales de esmalte y usando esmalte secretorio porcino de entre 5 y 6 meses de nacidos, con HREM y FTIR, Miake (1993) y colaboradores observaron en el contorno de los cristales estructuras piramidales y retenían un contraste obscuro en su centro (CDL). Miake propone un modelo para explicar esa línea oscura central que quedaba retenida en los cristales de apatita después de las fusiones y las unidades de sobrecrecimiento. Se caracterizó como un crecimiento epitaxial de pequeñas unidades apatíticas unidas a una lámina delgada, conformando triángulos regulares (**figura 1.17-a y b**).

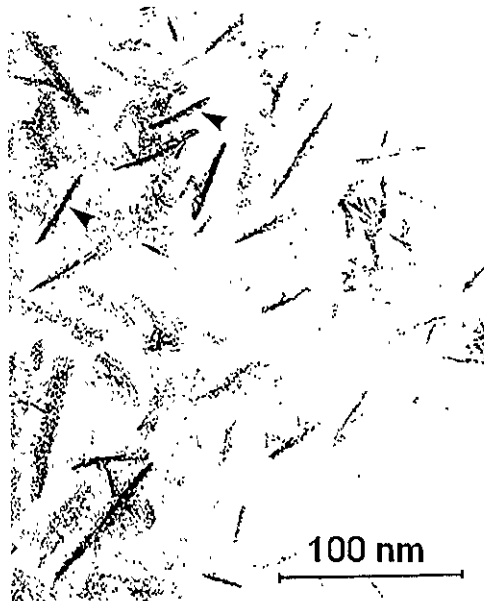


Figura 1.17a. Micrografía experimental del crecimiento de los cristales de HAP señalando la forma de triángulos con flechas (Miake et al., 1993).

Una importante conclusión del modelo de crecimiento propuesto es que la línea oscura central presente en los cristales de esmalte dental, representa el vestigio de una lámina precursora de OCP que ha sido enterrada (en el centro) por el sobrecrecimiento de unidades apatíticas (primero como triángulos, luego como rombos) y es menos frecuente su presencia en cristales sintéticos de carbonato apatita.

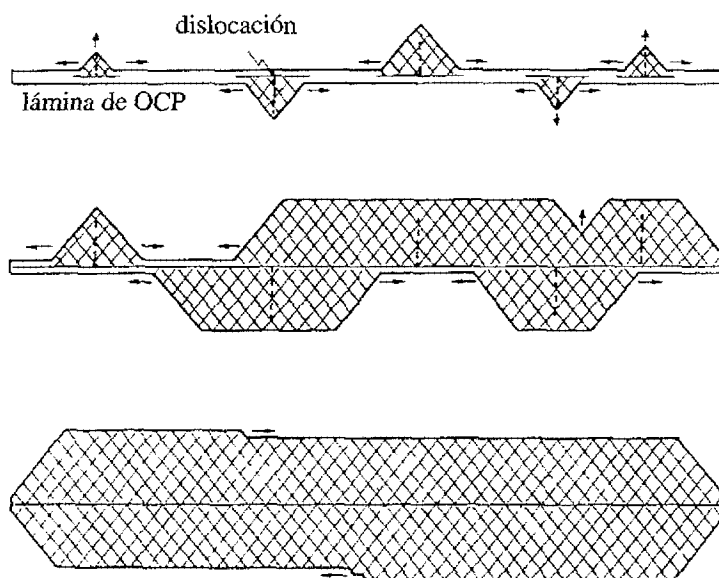


Figura 1.17-b. Ilustración del crecimiento epitaxial de apatita. Miake, 1993.

1.6. HIDROXIAPATITA Y EL FOSFATO OCTOCALCICO.

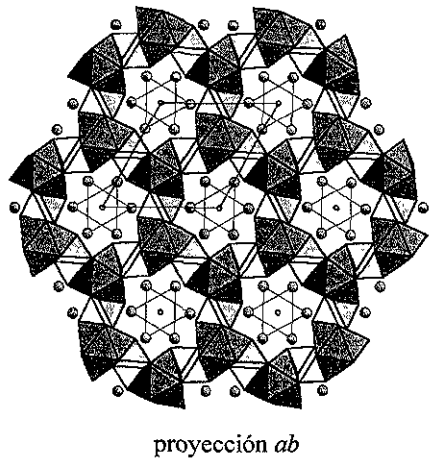
HIDROXIAPATITA

La hidroxiapatita es una sal doble de fosfato tricálcico e hidróxido de calcio y un compuesto bio-inorgánico microcristalino e isomorfo de una forma natural de fluorapatita. Pertenecen a una gran familia de sustancias isomorfas llamadas apatitas, nombre griego que significa embustero. Este nombre se debe a la dificultad que presentan en su identificación y a su existencia no estequiométrica. El término apatita se aplica a un grupo de compuestos (no solo a los fosfatos de calcio) de fórmula general $M_{10}(X_4)_6Z_2$; donde M^{2+} es un metal y X_4^{3-} es un radical ácido y Z^- es un anión. El nombre de cada apatita depende de los elementos o radicales M, X, y Z. Fluorapatita ($Z=F$), HAP ($Z=OH$) **figura 1.18 donada por el Dr. Lauro Bucio**, Cloroapatita ($Z=Cl$), y sus diferencias entre las propiedades físicas y químicas son debidas a las posiciones atómicas (Narasaraju y Phebe, 1996).

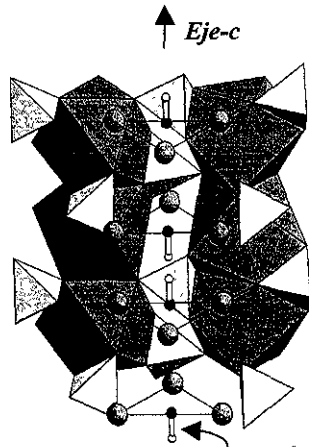
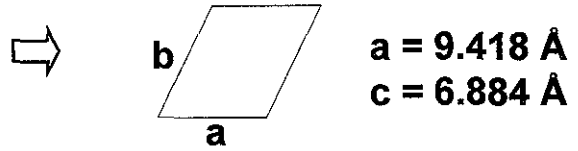
La hidroxiapatita estequiométrica presenta la estructura molecular apatítica, donde M es el calcio (Ca^{2+}), X es el fosfato (PO_4^{3-}) y Z es el radical hidroxilo (OH^-) la relación atómica Ca/P de la HAP sintética es de 1.67 y en el esmalte dental humano es de 1.62 (Eanes, 1979). Su formulación química es $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$. La HAP pura contiene 39% en peso de calcio, 18.5% de P y 3.38% de OH; mientras que la concentración de calcio en el esmalte dental humano es de 36.5%, y la HAP puede presentar sustituciones aniónicas y catiónicas.

Hay que tener en cuenta que en el material pueden llevarse a cabo sustituciones de iones (de PO_4^{3-} por, HPO_4^{2-} reduciendo la Ca/P entre 1.5 y 1.66) o deficiencias en los mismos lo que podría afectar las propiedades del material y su estabilidad química en diferentes medios. La fórmula química de estos compuestos es (Fulmer, 1992), $Ca_{(10-x)}(HPO_4)_x(PO_4)_{(6-x)}(OH)_{(2x)}$ donde $0 \leq x \leq 1$

La hidroxiapatita (HA) contiene fosfatos de Ca y es un material biocompatible, se usa como sustituto de hueso o bien para promover su regeneración ya que los tejidos óseos se componen en gran parte de fases minerales, que tiene resistencia a la corrosión, alta resistencia a la compresión, es inerte (entre más se acerque al valor 1.67 es más estable dentro del cuerpo, si la



celda unitaria
(sistema hexagonal)
GrupoEspacial $P6_3/m$ (No. 176)



Arreglo desordenado de los grupos OH^-

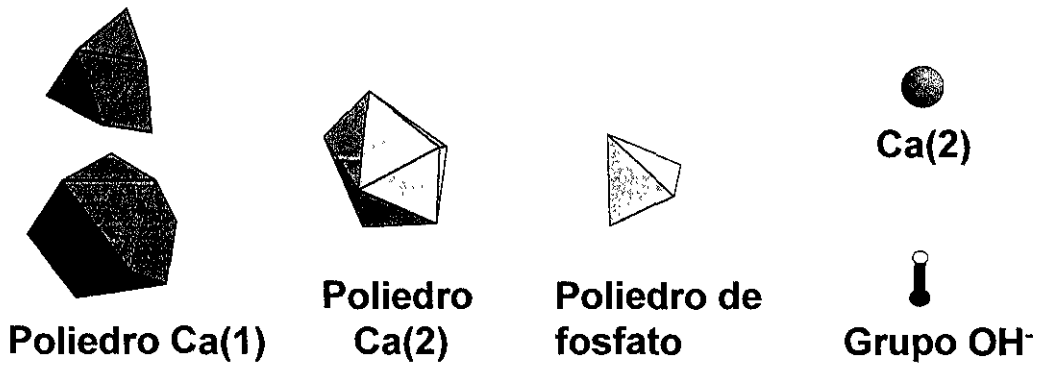
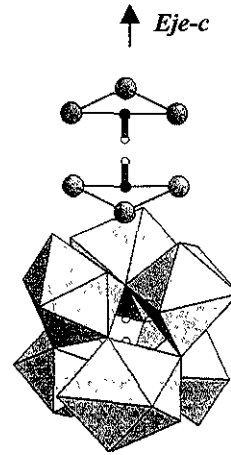


Figura 1.18 Estructura de la HAP (Bucio, 1999)

razón disminuye es más bioactiva), posee baja conductividad térmica y eléctrica (al medio ambiente).

Dentro de las desventajas físicas de la HAP se encuentran, el que tiene baja resistencia al impacto, falta de reproducibilidad de propiedades, dificultad de procesamiento y fabricación. Su resistencia mecánica es de 14 megapascales (Mpa) y su resistencia a la flexión es del orden de 110 Mpa (en pruebas de densificación en barras de 4.8 cm de largo, con sección transversal rectangular de 5x7 mm aplicando la prueba en cuatro puntos Thomas, 1980).

La HA es químicamente estable a temperatura y pH del cuerpo humano, 37°C y pH mayor a 4.2 y alrededor de 7, respectivamente (Neuman, 1958). A bajas temperaturas sólo la HA y el fosfato de calcio dibásico (DCP) pueden encontrarse en solución acuosa. La solubilidad de la HA se incrementa al disminuir el pH (Díaz, 1998). La deshidratación de la HA cuando se somete a tratamientos térmicos en ausencia de agua puede llevar a la conversión de esta fase a fosfato tricálcico.

Se sabe que a elevadas presiones de vapor ($P_{H_2O}=6.5 \times 10^5 Pa$), la estructura de la HA se conserva por encima de los 1000 °C (Lacout, 1992). Aún a temperaturas relativamente altas (aire, vacío y con un ambiente húmedo en ambos casos a 1300°C), la presencia de humedad promueve la estabilidad de la HA (Thomas, 1980).

La HA de esmalte dental humano sometida a calentamiento en el microscopio electrónico de transmisión, presenta dos fenómenos in situ; Uno es que se depositan moléculas de hidrocarbón en su superficie, formando estructuras fractales, ya que alcanza una energía de umbral después de la cual aparece un campo eléctrico produciendo estas estructuras y la otra es que hay una transición de conductividad dieléctrica (alrededor de 200°C, Reyes, 1997).

La HA cristaliza en un sistema hexagonal, aunque con alguna excepción en un sistema monoclinico. El grado de cristalinidad está directamente relacionado con el grado de reactividad del material. Su forma es de cristales alargados; gránulos gruesos y compactos; concreciones nodulares. Su estructura es cristalina y en el sistema hexagonal presenta los siguientes parámetros de red:

$$a = b = 9.418 \text{ \AA} \text{ y } c = 6.884 \text{ \AA}.$$

FOSFATO OCTOCÁLCICO.

Al fosfato octocálcico también se le llama trifosfato hidrogenado tetracálcico, $\text{Ca}_8 \text{H}_2 (\text{PO}_4)_6 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$. Se encuentra frecuentemente en sistemas conteniendo fosfatos de calcio más básicos que fosfatos dicálcicos y este parece tener un papel significativo en la química de huesos, dientes, fertilizantes de fosfatos y otros precipitados de fosfatos de calcio. Su existencia como una fase cristalina distinta más que una apatita defectuosa hidratada ha sido cuestionada. Resultados experimentales indican que el OCP está relacionado estructuralmente a la hidroxiapatita; sin embargo las dos sales no son isoestructurales y que el OCP está compuesto de capas de apatita que son paralelas al plano b-c y separados por capas hidratadas. El fosfato octocálcico tiene los siguientes parámetros de red:

$$a=19.87 \text{ \AA} \quad b= 9.63 \text{ \AA} \quad c= 6.87_5 \text{ \AA} \quad Z= 2(\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O})$$

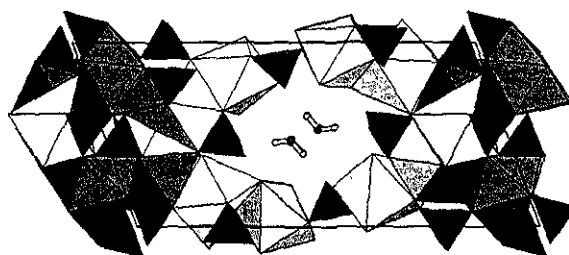


Figura 1.19. El OCP dentro de la estructura de su celda unitaria, tiene 8 tipos de Ca (azul, verde y amarillo), 6 tipos de P en sitios tetraédricos (rojo), y 5 moléculas de agua (al centro).

La química de la OHAP es complicada por su habilidad para formar mezclas de intercapas con OCP. La existencia de la mezcla de intercapas entre estas dos sales fue primeramente indicada por las similitudes de las celdas unidad, más aún cuando se asume que el OCP puede ser el precursor de OHAP y que la hidrólisis del OCP para producir OHAP se ha llevado a cabo in situ.

Eanes y Meyer en 1977, prepararon una serie de precipitados de fosfato de calcio en donde el cociente Ca/P podía incrementarse manteniendo los precipitados en contacto con la solución madre para variar los tiempos, la solución inicial fue supersaturada con respecto a ambas OCP e OHAP.

La hidroxiapatita y el fosfato octocálcico forman mezclas intercapas en las cuales algunos de sus picos de difracción de rayos X $h00$ interactúan para formar combinaciones de picos. Brown et al en 1979 correlacionan los datos experimentales de Eanes y Meyer, con los valores que calculan de esos picos obtenidos con patrones de difracción de rayos X como en d_{200} (OCP) $-d_{100}$ (OHAP) hacia espacios bajos de (9.34 \AA) como una función del cociente de Ca/P mostrando una correlación razonablemente buena con una dependencia lineal del espacio en el cociente Ca/P con un aumento de 1.33 a 1.67. Sugieren que el OCP actúa como precursor en la formación de los minerales de tejidos duros. Si fuese así las intercapas serían una consecuencia natural pudiendo afectar las propiedades del esmalte de muchas maneras, por ejemplo al ingerir flúor, acelerando la hidrólisis del OCP volviendo menos soluble a la apatita.

2. – Microscopía.

En esta sección comentaremos en forma breve los diferentes tipos de la técnica que más se utilizó en el análisis realizado en este trabajo de tesis: la microscopía. La microscopía nos representa un dato incuestionable sobre los resultados presentados: la visión directa del objeto bajo análisis. Es por esta razón, si se cuenta con los métodos de preparación de muestra adecuados, que la microscopía permite obtener la información que se requiere para dilucidar el origen de la línea oscura central presente en el esmalte dental.

2.1. Microscopía Fotónica

La microscopía óptica es una herramienta importante para el estudio microestructural de los materiales. Este estudio debe hacerse, sobre muestras cuidadosamente cortadas y pulidas. Además de pulir las muestras se puede hacer un ataque químico para revelar la estructura de grano y las fases presentes. La selección de los reactivos depende de las fases que nos interesen observar.

Las características principales de un microscopio, que determinan las características de la imagen son: la amplificación, la resolución, la profundidad de campo y el tipo de aberraciones que introduzcan las lentes.

Los detalles más pequeños que pueden distinguirse con un microscopio óptico son del orden de 200 nm. Esto se debe a que la mínima distancia que puede detectar el ojo humano es de 0.2 mm, Para un microscopio de luz monocromática verde 400 nm y una apertura del lente de 1.7, la resolución es de 175 nm.

Su profundidad de campo es deficiente comparada con la que se puede alcanzar con el MEB pero su capacidad de muestreo es mayor que cualquier otra de las técnicas descritas en este capítulo.

2.2. Microscopía de Barrido.

La microscopía de barrido (MEB) es un medio muy versátil para investigar la microestructura ya que hay equipos que cuentan con diferentes tipos de detectores como por ejemplo, el EDS que permite analizar la composición de diferentes materiales. El MEB ofrece posibilidades para obtener imágenes de superficies rugosas, gracias a su gran profundidad de campo (hasta de 40 μm).

El voltaje de operación del MEB está entre 2KeV y 40KeV y el diámetro del haz utilizado está entre 2 y 10 nm. El haz es barrido a través de la muestra por medio de unas bobinas deflectoras, mientras que un detector cuenta el número de electrones secundarios u otro tipo de radiación emitida por cada punto de la superficie (**figura 2.1**). Al mismo tiempo el "punto" de un haz de rayos catódicos es barrido a lo largo de una pantalla de televisión (CRT) y la brillantez del punto es modulada, amplificando la corriente que sale del detector. El barrido se hace por un conjunto de rectángulos conocidos como el "raster" y la amplificación lineal del aparato se define como la razón entre la longitud lateral del CRT y la longitud lateral del raster que actúa sobre la muestra.

Por ejemplo, si el haz de electrones barre un raster de 10 x 10 micras, y el tamaño del CRT es de 1200x100 milímetros, la amplificación es de 100 000 x.

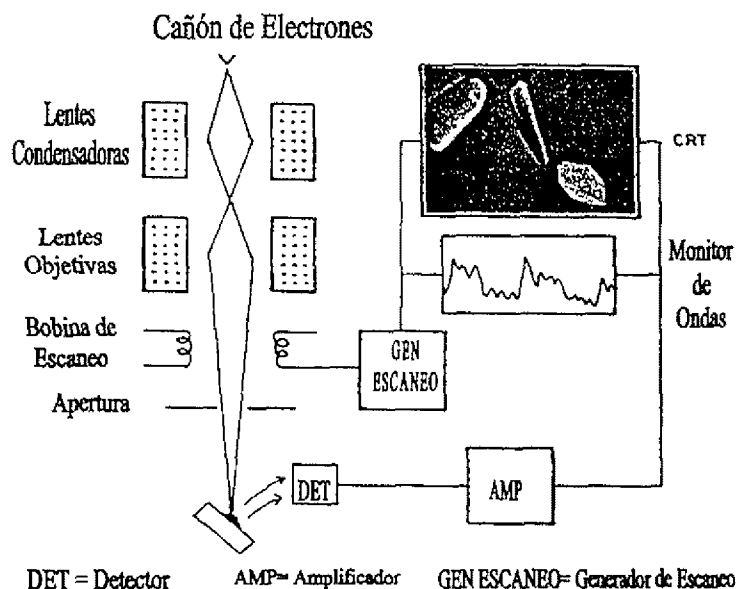


Figura 2.1. Sistema de operación del MEB para obtención de imagen.

Dentro de las funciones posibles en el MEB está la espectroscopia de dispersión de energía (EDS), que permite cuantificar la composición y la cantidad de un elemento químico dentro del material. Este análisis hace uso de la radiación emitida (rayos X) por cada elemento, después de ser colisionado por el haz debido a la diferencia en energía - producto del "salto" de un electrón de una órbita superior del átomo a una inferior - y de las líneas espectrales de cada elemento para hacer la cuantificación. Para mayor detalle de esta técnica se recomienda consultar las siguientes referencias (Bertin EP, Hearle JWS, 1973; Heinrich KFJ, 1981; Pouchou JL, 1984).

Aunque esta técnica es muy útil y versátil, existe la limitación de que la muestra debe ser conductora; de no ser así, se formará una densidad superficial de carga negativa en su superficie que deflectaría el haz de electrones antes de interactuar con la muestra.

2.3 Microscopía Electrónica de Tansmisión (MET)

Esta técnica se utiliza para hacer estudios minuciosos del material, con gran resolución. Provee información sobre las heterogeneidades del material como son: defectos, deformaciones, inclusiones, precipitados y germinación de nuevas fases en el primer estadio de formación. La preparación de las muestras necesarias para su análisis en microscopio electrónico de transmisión (TEM) es laboriosa.

El microscopio electrónico de transmisión permite obtener información acerca de la estructura del material pidiendo observar objetos a escalas comparables a las distancias interatómicas medias (3.0 \AA). Este microscopio usa como fuente de radiación un haz de electrones acelerados por una diferencia de potencial de 10 a 120 KeV, (ver (1) de la **figura 2.2**) Proporcionando la energía suficiente para ser transmitidos a través de una muestra delgada de aproximadamente un espesor de 100 \AA (ver (4) de la **figura 2.2**). A su paso, los electrones son dispersados por el material y al salir de la muestra, son enfocados por medio de "lentes" electromagnéticas, hacia la pantalla fluorescente (ver (9) de

la **figura 2.2**). La radiación así producida puede ser proyectada en un plano de dos formas: como patrón de difracción, ver (6) de la **figura 2.2** ó como imagen del objeto (Eberhart JP., 1991), ver (7) de la **figura 2.2**.

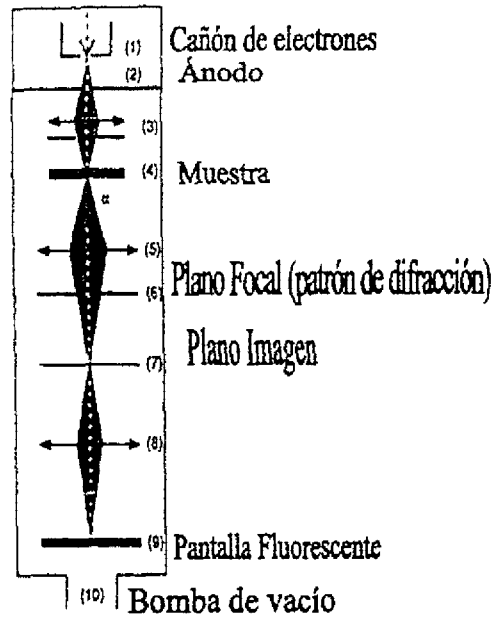


Figura 2.2. Partes de un microscopio electrónico de transmisión TEM. 1) Cañón de Electrones con voltaje. 2) Ánodo puesto a tierra. 3) Sistema Condensador. 4) Muestra delgada. 5) Lentes objetivas. 6) Plano focal anterior 7) Plano imagen. 8) Sistema de proyección de las lentes. 9) Pantalla Fluorescente. 10) Bombas de vacío.

Se obtiene una u otra proyección situando la lente proyectora en el plano focal de la lente objetiva, en cuyo caso se obtendrá el patrón de difracción, o bien en el plano imagen, en cuyo caso se obtiene la imagen del objeto.

En ambas proyecciones se obtiene información acerca de la estructura cristalina de la muestra, pero la contienen en forma distinta; la relación existente entre ambas proyecciones y sus diferencias, pueden esbozarse a partir de la óptica geométrica que sigue el haz de electrones al salir de la muestra.

Los patrones de difracción electrónicos son proyecciones en 2D del espacio recíproco, mientras que las proyecciones en el plano focal son las proyecciones en 2d del espacio real. La distancia entre dos puntos en el patrón de

difracción va como el inverso de la distancia entre esos puntos en el espacio real [i.e $\text{dist}(\text{espacio recíproco}) \propto \text{dist}(\text{espacio real})$] (Verhoeven JD, 1975).

El punto más intenso situado en el centro del patrón de difracción es resultado del haz que no fue difractado por el material y sirve como punto de referencia para medir la distancia entre los puntos con respecto al centro. La distancia entre los puntos vecinos, a la cual se conserva la periodicidad, es una medida del grado de orden que hay en el arreglo de átomos en el material. En el caso de un sólido cristalino.

Los puntos se repetirán periódicamente hasta el límite que marque a la abertura del haz, en el caso de un material amorfo, solamente la distancia a primeros vecinos esta bien definida, por lo que solamente se verán los primeros vecinos del punto central.

Si la zona seleccionada para difractar posee muchos cristales, entonces el patrón de difracción estará formado de anillos y no de puntos discretos. Si los granos son poco cristalinos, entonces solamente se apreciara correctamente el primer anillo (primeros vecinos).

2.3.1 Preparación de Muestras.

Las muestras ideales para microscopía electrónica de transmisión (MET) deben ser delgadas (60-90 nm), planas, con lados paralelos - para evitar variaciones fuertes en el contraste de masa - estables y representativas del material. Durante la preparación hay dos pasos básicos, el corte y el adelgazamiento (Reyes-Gasga, 1987).

El tamaño recortado de la muestra debe ser de 1mm ó menos de espesor y unos 3 milímetros de diámetro (Eberhart JP., 1991)

Partiendo de las muestras pulidas a espejo se requieren tres etapas de corte y desbaste mecánico.

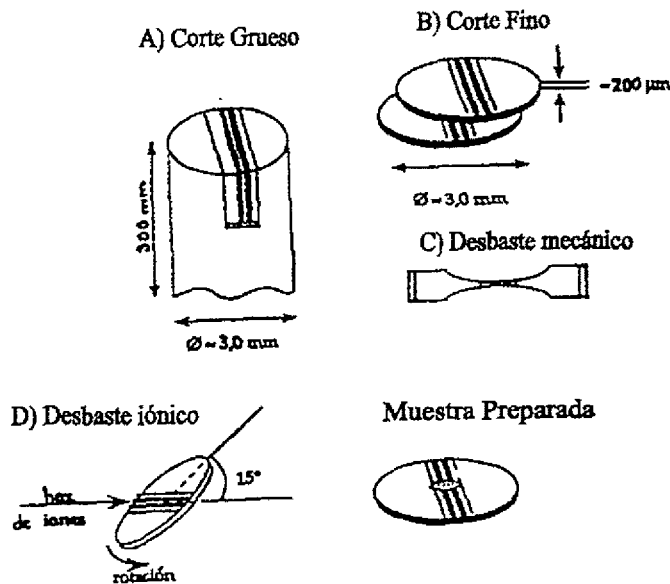


Figura 2.3. Ejemplo de preparación de la muestra para TEM.

A) corte grueso, B) corte fino, C) desbaste mecánico, D) desbaste iónico.

1º Cortar una rebanada del compuesto colado en forma cilíndrica de dimensiones: 3mm de diámetro por 300 mm de longitud (ver inciso a la de la **figura 2.3**).

2º Cortar una rebanada de $200 \mu\text{m}$ con la ayuda de un disco con filo de diamante, o desbastar con cuidado con lija de 100 hasta lograr un espesor del cilindro entre 100 y $200 \mu\text{m}$ (ver inciso b de la **figura 2.3**).

3º Adelgazar la muestra mecánicamente en forma cóncava en el aplomo del compuesto y sobre las dos caras, obteniendo un espaciamiento residual de $20 \mu\text{m}$.

El procedimiento de adelgazamiento varía según el tipo de material; para muestras no conductoras, muy frágiles para prepararse manualmente ó que contienen fases diferentes que se corroen a velocidades diferentes, se usa el bombardeo iónico. El desbaste se lleva a cabo por medio de un erosión en la parte central de la muestra con iones de argón ó un haz de átomos neutros, hasta lograr una perforación sobre la muestra (ver incisos c y d de la **figura 2.3**).

La capa delgada de material (100 Å a 200 Å), que queda alrededor de la perforación, será la zona visible en el microscopio de transmisión. Para información más detallada de este proceso refiérase a Eberhart JP., 1991.

2.3.2. Limitaciones de la técnica.

Para ver muestras por MET éstas deben ser suficientemente delgadas como para ser “transparentes” a los electrones. Un espécimen que cumpla con esta condición podrá transmitir suficientes electrones para producir la intensidad necesaria para proyectarse en una pantalla o película fotográfica. Generalmente esta condición es función tanto de la energía del electrón como del número atómico promedio del espécimen. Típicamente para electrones de 100KeV, los especímenes de aleaciones de aluminio deben alcanzar un espesor del orden de cientos de angstroms, de hecho, entre más delgado sea el espécimen mejor. El espesor puede ser mayor cuando se usan voltajes altos, y debe ser estrictamente menor cuando se usa HRTEM (MET de alta resolución). El proceso de adelgazamiento debe ser tal que se dañe lo menos posible la estructura y la química del espécimen. También deben identificarse los artefactos más comunes que se generen en el espécimen adelgazado con el proceso standard.

2.4. - Microanálisis

Es el análisis químico de muestras “muy pequeñas” por técnicas a base de electrones, cuando los electrones de energía apropiada afectan a la muestra, causan la emisión de rayos X cuyas energías dependen de la composición de la muestra. Usando este fenómeno para analizar el contenido elemental de microvolúmenes (de uno a varios cientos de micrómetros cúbicos) es a lo que comúnmente se le llama microanálisis.

Para analizar muestras microscópicas el microanálisis por dispersión de energía (EDS) es el método más fácil, pues es sensible a bajas concentraciones, los límites de detección mínimo (MDLs) están por abajo del 0.1% en el mejor de

los casos y típicamente menores a 1%, es un rango dinámico que corre de MDLs al 100%, con una precisión relativa de 1% a 5% durante todo el registro.

Se considera el proceso que sigue a la excitación de la muestra por un haz electrónico donde con los rayos X emitidos son colectados, clasificados y contados. Las emisiones energéticas de un electrón excitado de la muestra se traducen en datos analizables captados en el detector EDS del microscopio de barrido o transmisión. Esta energía de la radiación emitida entonces es igual a la diferencia de energías entre los dos niveles electrónicos involucrados. La diferencia de energías es bastante grande para las capas internas, la radiación aparece como rayos X. Cuando los electrones son excitados con suficiente energía, cada elemento en una muestra emitirá por lo tanto en un único y característico patrón de rayos X. Bajo condiciones de análisis dados, el número de rayos X emitidos por cada elemento tiene una relación mas o menos directa a la concentración de ese elemento.

Convirtiendo estas emisiones de rayos X a datos analizables, es el trabajo de una serie de componentes electrónicos, los cuales al final producen un espectro digital de la radiación emitida. El fotón de rayos X primero crea un pulso de carga en un detector semiconductor, y es entonces convertido en un pulso de voltaje cuya amplitud refleja la energía de los rayos X detectados. Finalmente, este pulso de voltaje es convertido en una señal digital causando un conteo, estos conteos acumulados de una muestra producen un espectro de rayos X (Kevex, 1989).

3- Procedimiento experimental.

Dentro de las estructuras altamente conservadas durante el proceso evolutivo en diferentes mamíferos y otras especies, como los escualos por ejemplo, son los dientes los que presentan mayor similitud en cuanto a su desarrollo embriológico, histológico, morfológico, estructural y composición. El utilizar fetos de ratón para los experimentos se debe a:

- a) la homología en la estructura primaria de las amelogeninas, para la formación de las principales amelogeninas en dientes de ratón con respecto a los de los humanos (Zeichner-David et al, 1995);
- b) que el período de gestación es más corto;
- c) su manipulación es fácil y su relativo bajo costo.

Aunque por otro lado su tamaño representa un grado de dificultad mayor al diseccionar la muestra y la cantidad obtenida restringe el uso de otras técnicas de estudio.

Hasta ahora, en el Instituto de Física de la UNAM, para analizar el material inorgánico del esmalte por MET, se han utilizado técnicas de preparación de muestras pertenecientes al área de la Ciencia de Materiales; esto es, adelgazamiento por lija hasta espesores de 60 micras, un adelgazamiento preferencial en el centro hasta espesores de 10 micras, y finalmente el adelgazamiento por medio de pulido iónico hasta perforar la muestra logrando alrededor de la perforación, un espesor de aproximadamente 90 a 100 nm, adecuado para ser observado por MET.

Sin embargo, para estudiar el material orgánico existen técnicas de preparación de muestras para microscopía electrónica pertenecientes al área de las Ciencias Biológicas que permiten obtener información sobre el material orgánico y, tal vez, sobre una fase diferente de la HAP.

Sin embargo hubo que aplicar variantes en la técnica, como lo muestran los resultados experimentales reportados en la literatura, para estudiar la transformación de fase de la HAP, que permitirían analizar las estructuras orgánicas del esmalte dental, así como obtener mayor información sobre la

con la finalidad de localizar la zona donde se encontraban los ameloblastos.

3.1. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

Los ratones se pusieron en lotes de cinco parejas por un sistema de cruzamiento monogámico (una hembra y un macho por 24 horas), de la cepa albina BALB-c. El diagnóstico de los ratones hembra preñados se hace al siguiente día de haberlos apareado, determinándose por medio de la presencia del tapón vaginal, iniciando el conteo de los días de gestación, con el día cero a partir de la presencia del tapón vaginal y hasta el día 19 (error \pm 24 horas) para obtener los productos, casi al término de la gestación. Los ratones hembra preñadas se sacrificaron mediante dislocación cervical, que es un método rápido, efectivo, útil y no interfiere en el resultado del experimento. Se obtuvieron y prepararon los fetos (seis en promedio por ratón hembra preñada), de una hembra de 16 días de gestación, dos de 17, una de 18, para observar el grado de diferenciación en los ameloblastos, dos de 19 días sacrificándose en las doce primeras horas de ese día y dos poco antes del nacimiento.

Obtención de material biológico

De acuerdo al método de la eutanasia física, se sujeta al ratón tomándolo de la cola (aproximadamente a tres cm del comienzo de la misma) colocándolo en una superficie donde se pueda asir con sus cuatro patas. Sin dejar de sujetar la cola, se coloca un instrumento detrás de la nuca en una acción rápida, presionando y al mismo tiempo jalando la cola (**figura 3.2-a**).

Una vez sacrificada la madre el procedimiento debe ser rápido. Se coloca en posición decúbito dorsal. En la línea media ventral se hace una incisión en la piel con la tijera (**figura 3.2-b**) localizando el tejido que une los músculos abdominales por la línea media y se realiza un corte perpendicular hacia las extremidades inferiores y se extraen los sacos uterinos que contienen a los fetos vivos. Cuando se tiene la bolsa con el feto, se abre se expone, se decapita, se corta la parte anterior de la mandíbula y se fija la muestra en glutaraldehído al 2.5%, amortiguado en solución de fosfatos (PBS) esta

maniobra se lleva a cabo en 5 minutos máximo, depositándolas en frascos pequeños.

En una caja de Petri o sobre una hoja de cera de toda estación, con unas gotas de glutaraldehído, se disecan por microcirugía las mandíbulas con el auxilio de un microscopio estereoscópico, para liberar la parte anterior de las mandíbulas del tejido blando, aunque también se obtuvieron dientes completos, todos ellos para ser procesados para microscopía electrónica, **(figura 3.3)**.

3.2. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA EL ANÁLISIS DEL MATERIAL ORGÁNICO.

Se preserva la muestra con glutaraldehído para detener la actividad biológica y para la estabilización de los componentes celulares con la mínima distorsión estructural y espacial. Esta es la fijación que se logra por medios físicos y de reacciones químicas. Con métodos de fijación química se pretende que las sustancias deben tener determinados grupos reactivos que interactúan con los componentes celulares, entre los cuales se forman enlaces cruzados y de lo cual resulta la estabilización del tejido lo más parecido al estado vivo.

La preparación de la muestra biológica para MET requiere, mezclas de sustancias reactivas en un amortiguador que permite mantener las condiciones de pH a niveles fisiológicos e isotónicos. El pH varía según la hidratación del tipo de tejido. En general se recomienda llevar a cabo la fijación de muestras a temperatura ambiente de 1 a 2 horas, aunque esto cambia por ejemplo al utilizar fijadores aldehídicos pues se lleva a cabo en un cuarto frío a bajas temperaturas (4°C).

Para la fijación se puede usar el glutaraldehído al 2.5% y el tetraóxido de osmio al 1% en un paso secuencial para estudiar estructura general, aunque el osmio está contraindicado si se requiere un método de contraste preferencial o una reacción inmunocitoquímica.

Ya fijada la mandíbula, se procede a su deshidratación. Se continúa reemplazando gradualmente el agua con un fluido que actúa como sustituto de este elemento y como solvente de algunos materiales de inclusión, la deshidratación se puede realizar con alcohol, metanol, acetona o acetonitrilo. En algunos casos se requiere de un paso intermedio con óxido de propileno para eliminar completamente el agua y para una adecuada inclusión solubilizando la resina, facilitando su penetración y que alcance una polimerización adecuada; con esta maniobra el tejido mantiene su morfología.

La muestra se coloca en moldes plásticos y se cubre con la resina de inclusión. Para la polimerización de esta resina (epon), (**figura 3.4**) se meten dichos moldes con las muestras a la estufa a 60° durante 48 horas, para que adquiera plasticidad, dureza y facilite la obtención de láminas ultradelgadas.

Para cortar la muestra biológica y obtener láminas nanodelgadas (60-90 nm) se utiliza un ultramicrotomo (**figura 3.5**). El corte se hace con cuchillas de diamante o de vidrio, estas últimas se adaptan con cinta adhesiva en forma de recipiente, se llena con agua destilada para recibir los cortes y que queden flotando (**figura 3.6**). Las muestras se depositan en rejillas previamente cubiertas con una membrana de formvar (**figura 3.7**).

Una vez que se tiene la rejilla con la muestra se contrasta. El contraste depende de la aplicación de soluciones de sales de metales de elevado número atómico que presentan afinidad por las moléculas orgánicas de interés. Estas moléculas permiten la formación de imágenes en la pantalla fluorescente del MET; y según el tipo de resina usada, serán sus condiciones de manipulación.

Para obtener una buena preparación biológica para MET, es importante adaptar un recipiente como se observa en la **figura 3.8**, mantener la atmósfera húmeda (algodón húmedo y las lentejas de NaOH) y no precipitar el contraste ya que la formación de precipitados interfiere con la observación y daña la columna del MET, por lo que se lava abundantemente (Asociación Mexicana de Microscopía, 1997).



Figura 3.6. Cuchillas de vidrio y contenedor con los cortes, a la derecha la mordaza con el bloque que contiene la muestra.

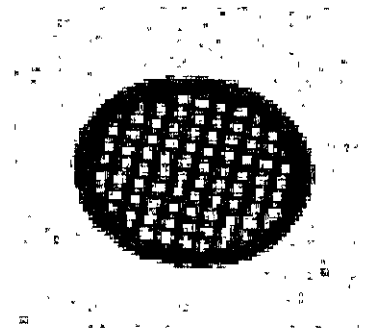


Figura 3.7. rejillas de cobre recubiertas con membrana de Formvar.



Figura 3.8. Recipiente para evitar la formación de precipitados, del lado izquierdo se usa una tapadera de metal cuando se trabaja con el acetato de uranilo y el citrato de plomo, del lado derecho se depositan lentejas de sosa cáustica (NaOH) y un algodón húmedo. Al centro agua para lavar las rejillas entre cada contrastante

El protocolo que se utilizó puede ser resumido en 10 pasos de la siguiente forma:

- 1) Fijación. Glutaraldehído al 2.5% amortiguado en PBS (amortiguador de fosfatos salino) 2 hrs a temperatura ambiente; 2) enjuagado con PBS, 3 veces, 5 minutos cada vez; 3) Postfijación en tetraóxido de osmio (OsO₄) al 1% en agua bidestilada, de 1 a 24 hrs; 4) Deshidratación con etanol, al 70% 5 minutos, al 80% 5 minutos, al 90% 5 minutos, al 96% 5 minutos y al 100% 5 minutos. 3 veces; 5) Óxido de propileno 5 min. 3 veces; 6) preinclusión en mezcla de resina epóxica + óxido de propileno (proporción 1:1) ~ 16 hrs; 7) Se orienta la muestra y se incluye en resina epóxica, se deja en la estufa 48 hrs; 8) Para obtener los cortes de aprox. 40 a 90 nm de espesor se utiliza el ultramicrotomo; 9) Los cortes se montan en rejillas de cobre cubiertas con membranas de formvar; 10) El contraste se hace con acetato de uranilo al 5% por 20 minutos y citrato de plomo al 0.5% por 10 minutos.

3.3. PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS DE MATERIAL INORGÁNICO.

Por otra parte debe mencionarse que la preparación de muestras de tejidos duros para MET realizadas hasta ahora, dentro del laboratorio de Microscopía Electrónica del IFUNAM, como en el estudio de los cristales de esmalte dental humano en dientes erupcionados, para la caracterización de la fase inorgánica, consiste en una técnica de preparación similar a la utilizada para los materiales cerámicos.

Esta técnica se inicia con el corte del órgano dentario, de manera transversal y longitudinal siguiendo las marcas hechas previamente para lograr un corte cuadrangular, mediante una recortadora marca Jean Wirtz con disco de diamante de 4 por 3 pulgadas de diámetro, hasta lograr bloques de 3x3x1 mm de esmalte dental, esto se observa por microscopía óptica y/o de barrido (MEB). Sin embargo para transmisión y microscopía de alta resolución el espesor de las muestras a observarse debe ser menor de 100 nm (Yacamán,

1995). Para lograr espesores con estas dimensiones, la muestra primero debe desgastarse mecánicamente. Para ello, cada corte se pega al portamuestras de la pulidora con material termoplástico que se lleva a una parrilla de calentamiento para que se derrita el termoplástico y pueda adherirse la muestra.

Una vez que se enfría el pegamento se desgasta la muestra en el Minimet polisher marca Buehler (que es un pulidor automático), hasta que quede plana, con lijas graduales 320 o 600, 1200 y 4000 hasta obtener el espesor adecuado (150 μm . aproximadamente). Dé ahí se pasa al Dimpler, para obtener ataque iónico. La muestra se pega a una rejilla de cobre con un orificio en el centro utilizando silicona Devcon durante cinco minutos, se espera a que se enfríe (10-15 min.) Así queda lista para trabajarse y pulirse; se verifica que el desgaste en forma de cazuela se logre centrado, el desgaste ahora es a un espesor aprox de 15 a 20 μm . Para un desbaste ultra-fino <90 nm, la muestra se translada al Dual ion mill posteriormente (aparato que desgasta ionicamente por capas), con la finalidad de obtener una perforación pequeña central y así poder ser observado por el MET y en alta resolución. Ya obtenido el grosor requerido de la muestra, se le recubre con una capa fina de carbón en la evaporadora para hacer a la muestra conductora ahora está lista para ser observada.

3.4. CONSIDERACIONES FINALES PARA LA PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE TEJIDO DURO PARA SER OBSERVADAS POR MET Y POR HREM.

Como se ha mencionado la preparación de la muestra en su aspecto biológico para poder ser observado en el MET sigue una técnica diferente ya que hay necesidad de preservar el aspecto vital de los tejidos. Es necesario que el material sea procesado para soportar las condiciones a que debe ser sometido dentro del cañón electrónico, además de que se contrasta y se recubre con carbón para ser observado por MET.

Hay que mencionar que deben hacerse algunas modificaciones para observar las muestras por HREM, por ejemplo omitiendo el uso de contrastantes de cualquier tipo y depositando las muestras en rejillas sin película de soporte, ya que su espesor debe ser entre 40 y 60 nanómetros.

Para minimizar el daño causado a la muestra por el haz en el momento de ser observada, se le deposita una capa de carbón. Durante la sesión para obtener micrografías, se procura tener el haz tan bajo como sea posible para enfocar y corregir el astigmatismo haciéndolo en un área cercana a la de interés. Minimizando el tiempo de exposición, se toman las fotografías del área selecta en campo claro y campo oscuro, esto nos permite detectar la presencia de la zona de cristales y se toma su patrón de difracción de electrones. Las redes periódicas de los cristales fueron indexadas por comparación de sus distancias interplanares con los valores calculados. Al obtener las micrografías de alta resolución se utilizó una pantalla de congelamiento de imágenes para la búsqueda de los cristales y tener el menor daño electrónico.

Se utilizó un microscopio JEOL 100 X a 100 KV; JEM 200 CX a 200 KV; JEOL 2010 con un voltaje de aceleración de 220 KV, con una resolución de punto a punto de 2.3 Å, equipado con una microsonda para análisis químico elemental NORAN y un JEOL 4000 CX a 400 KV con resolución de 1.7 Å.

3.5. PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA MEB.

Las muestras para observación en barrido, fueron los bloques cuadrangulares seccionados de esmalte dental fetal embebidos en epon y muestras llevadas a punto crítico, montadas en los portamuestras fijadas con papel engomado por ambos lados, recubriendo la muestra con una capa de oro. La imagen de los bloques se observó con un microscopio electrónico a través de electrones retrodispersados y las de las muestras llevadas a punto crítico con electrones secundarios.

Las técnicas utilizadas en el análisis químico son: el análisis por espectroscopia de dispersión de energía de rayos X característicos (EDS), el microscopio cuenta con el dispositivo adecuado para obtener imágenes de concentración conocidos como mapeos químicos. Se utilizaron los microscopios electrónicos de barrido Philips XL30 acoplado a una microsonda para análisis químico elemental EDAX modelo NEW, tipo zafiro, bajo condiciones de trabajo entre 20 y 25 KV, al alto vacío y con una distancia de trabajo de 10 a ± 1 mm, utilizando electrones secundarios y retrodispersados.

3.6. PROCESAMIENTO Y SIMULACION DE IMÁGENES.

Una vez logradas las micrografías de alta resolución, se realizó la interpretación de sus imágenes. Su contraste depende de varios parámetros entre los que se encuentran, la dirección del haz electrónico con la muestra, el espesor de esta, las condiciones de operación del microscopio y la habilidad del operador; aunque nos ayudamos con la simulación de imágenes por computadora, donde se toma un modelo de la celda cristalográfica de la muestra (hidroxiapatita) y se genera un cristal con las dimensiones de ésta, obteniéndose imágenes simuladas que se compararon con las obtenidas experimentalmente, mostrando si había coincidencia de sus contrastes. Teniendo el modelo atómico se procedió también a obtener la simulación de los patrones de difracción.

4. – RESULTADOS.

En esta sección se presentarán éstos siguiendo una secuencia del mundo milimétrico al mundo nanométrico. De esta manera, primero se presentan los resultados obtenidos con la microscopía de luz, siguen los resultados a nivel micrométrico observados con la microscopía de barrido y finalmente se presentan los resultados a niveles nanométrico y atómico de la microscopía de transmisión y de alta resolución.

4.1. Microscopía fotónica

Después que se procedió al sacrificio del ratón para obtener las muestras de los fetos y seguir el protocolo ya estipulado hasta obtener los cortes y montarlos, se observaron éstas con el microscopio de luz.

La figura 4.1 es una imagen tomada por microscopía óptica con luz transmitida donde se muestra un corte transversal de un incisivo de feto de ratón de 18 días en las primeras horas. Esta imagen muestra un epitelio cúbico estratificado, en donde observamos la zona en la cual se originarán los ameloblastos, indicada con la letra “a”, la letra (P) corresponde a tejido de origen mesenquimatoso que va a formar la pulpa dental. En este estadio las células están organizándose para posteriormente entrar a un periodo de morfodiferenciación.

En la figura 4.2 se muestra un corte semifino, de 250 nanómetros aproximadamente; en la parte superior podemos observar del lado derecho el epitelio estratificado. En esta figura, el número (1) corresponde a la zona de vesículas mostrada en la imagen de MEB de la figura 4.3. Podemos observar también en la figura 4.2 que los ameloblastos están diferenciados, bastante alargados y en estado secretorio. Al final de estos ameloblastos, en la punta, se tiene una zona que correspondería a las fibras de Tomes (fT). El número (3) de la figura 4.2 pertenece a la interfase C-P, o sea entre la parte clara y el borde oscuro del peine, lo que veremos posteriormente con mayor detalle en

fotografías de barrido (figura 4.3). Con el número (4) se identifica una zona clara del peine donde se comienzan a depositar una mayor densidad de iones de calcio, mientras que el número (5) denota el depósito de los futuros cristales, o zona principal de lo que será el esmalte. También puede observarse la interfase indicada por el número (6) con la preentina (Pd), que es una secreción de los odontoblastos (O). La pulpa dental esta identificada con la letra P. Esta nomenclatura es muy importante ya que es la que usaremos más adelante para identificar las zonas de interés en otras micrografías por microscopía electrónica de barrido y microscopía electrónica de transmisión convencional como la de alta resolución. Esta es la importancia de la figura 4.2.

4.2. Microscopía de Barrido

Las observaciones mediante la microscopía electrónica de barrido resultaron muy interesantes. Es necesario comentar aquí que las imágenes usando los electrones secundarios no eran tan obvias puesto que estas son muy útiles en la microscopía electrónica de barrido para identificar escalones y estudiar la morfología de la superficie, pero en este caso eran cortes finos y por lo mismo muy planos. Entonces se utilizaron electrones retrodispersados para poder tener un contraste más reconocible. Las imágenes por electrones retrodispersados dependen del número atómico de la zona que los produce, y por lo tanto cualquier zona que tuviera diferente composición se contrasta inmediatamente.

Así haciendo uso de este tipo de imágenes, se muestra en la figura 4.3. un bloque que se preparó de incisivo de feto de ratón de 19 días incluido en epon. Este bloque fue retallado para eliminar lo que correspondería propiamente a la zona dentinaria y dejar específicamente la zona de formación del esmalte.

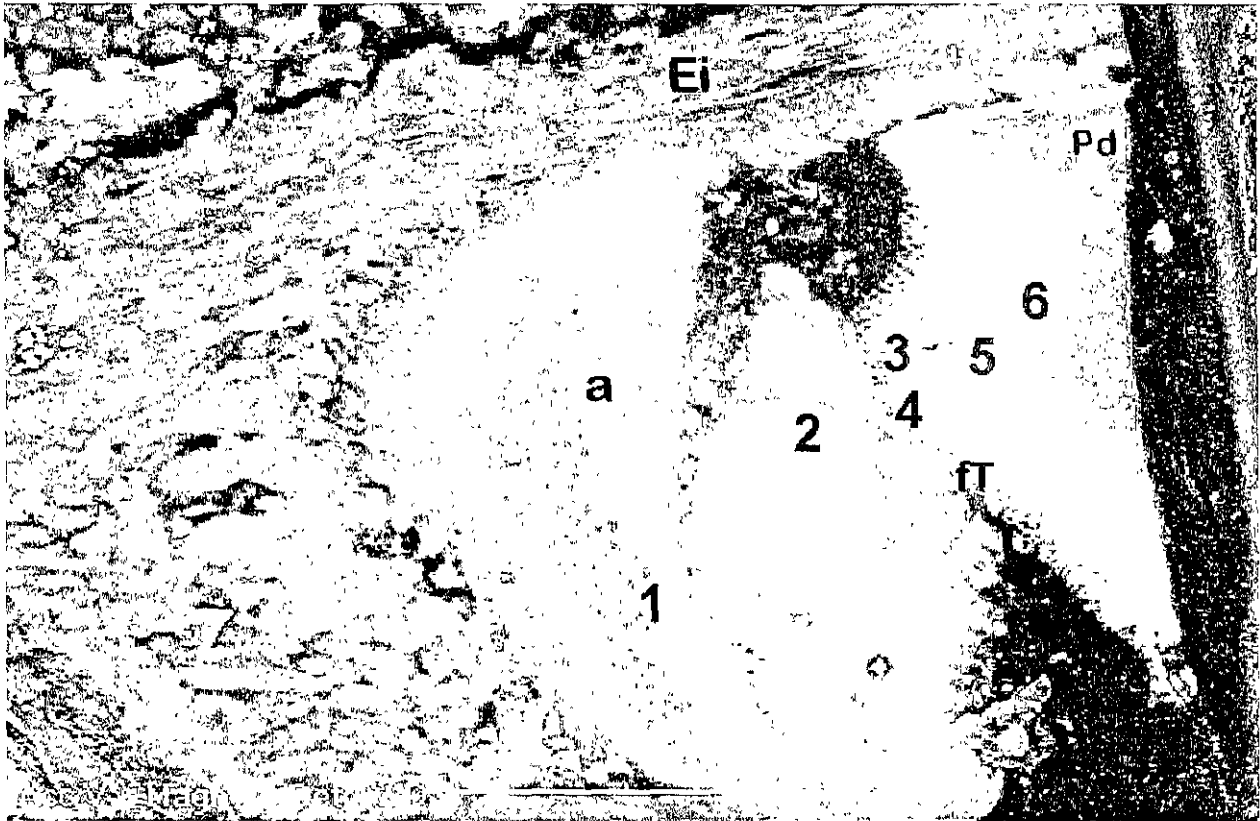


Figura 4.3. Micrografía de MEB con electrones retrodispersados de un corte transversal de la inclusión en epon de un incisivo de feto de ratón de 19 días. La numeración indica las zonas analizadas por EDS, (Ei) estrato intermedio, (a) zona de ameloblastos, (ft) fibras de Tomes, (Pd) predentina. Ver el texto para mayor información.

En esta figura 4.3 nuevamente se han indicado las diferentes zonas en las cuales vamos a dividir el área para poderla trabajar mas adelante. Se ha tratado de continuar con el mismo tipo de nomenclatura desde las imágenes de microscopía óptica para poder identificar la zona a la que nos estamos refiriendo. Así, por ejemplo, si se hace una comparación entre las indicaciones que tiene la figura 4.2 con la figura 4.3 o con la figura 4.12, se puede identificar la zona a la cual nos estamos refiriendo pues los números utilizados para identificar las zonas son concordantes con el tipo de información que vamos a presentar.

En la figura 4.3 podemos distinguir varios puntos que son de interés para el análisis de este trabajo. Así tenemos por ejemplo: (Ei), que nos representa el estrato intermedio, la (A) que corresponde a la zona de ameloblastos, el número (1) está en el extremo hacia el exterior de lo que sería la parte incisal del diente que corresponde a la zona vesicular, el número (2) es el chinito (esta parte del tejido puede ser que se deba a un doblez causado por el corte y no volvamos a ver esta imagen), el número (3) corresponde a lo que serían las fibras de Tomes (fT), pero justamente donde empieza ya a llevarse a cabo el depósito de lo que serán los cristales, el número (4) es la zona oscura que corresponde a los primeros depósitos de cristales, la zona identificada con el número (5) corresponde a una franja continua donde están la mayoría de los iones que van a formar propiamente el esmalte dental, y el número (6) identifica la interfase entre el tejido del esmalte y la preentina, siendo la preentina denominada con las letras Pd.

Es preciso aquí decir que las figuras 4.2 y 4.3 muestran las imágenes que representan la base con la cual vamos a trabajar en lo que resta de esta tesis para estudiar el origen de la nucleación y el crecimiento de los cristales del esmalte dental a partir de las zonas mostradas.

4.3. Microanálisis por MEB.

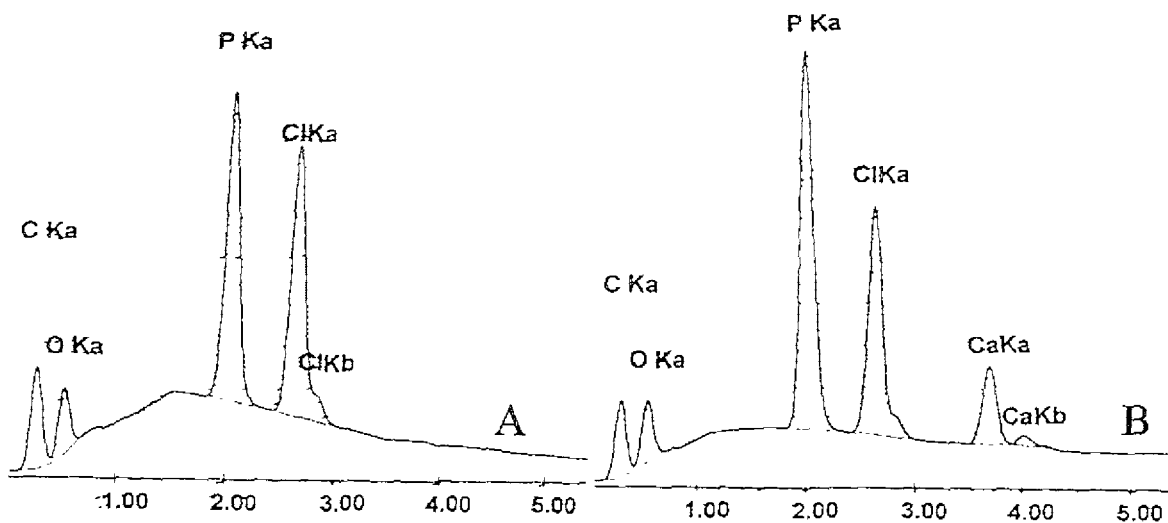
En la figura 4.3 se ha realizado el análisis químico de cada una de las zonas mostradas y los resultados se presentan en la figura 4.4 y en la tabla

1V.1. Como se comentó anteriormente, el microanálisis nos permite conocer el tipo de elementos que presentan las zonas en conjunto con las concentraciones que se registran.

En la figura 4.4 se muestran dos espectros EDS de rayos X característicos que son representativo de toda la zona. La figura 4.4-A muestra el espectro característico obtenido en el número 1, 2, y 3, parte de la vesícula el chinito y la interfase; mientras que en la figura 4.4 B se muestra el espectro característico observado en la zona clara, en la interfase dentina y en el peine de la zona clara, que corresponden a los números 4, 5, y 6 de la figura 4.3. Los espectros de EDS de las zonas con los números 1, 2, y 3 no presentan calcio, sin embargo si se presentan concentraciones de fósforo; además existen concentraciones de carbón y de oxígeno. De igual manera nos llama la atención la concentración de cloro.

En la tabla 1V.1 se presentan las concentraciones del promedio de los análisis realizados con microanálisis, y así tenemos, por ejemplo, que el calcio no se presenta en la vesícula ni en el chinito ni en la interfase sino se presenta en el peine, en la zona clara, y en la interfase con la dentina. De igual manera vemos que el sodio se presenta solamente en la zona clara y el potasio solamente en la interfase. La observación de cloro se mantuvo a lo largo de todos los puntos de análisis y fue mayoritario en la zona vesicular, chinito e interfase e inclusive en el peine y disminuyó en la zona clara y volvió a aumentar en la parte de la interfase con la dentina. Este es un resultado muy interesante puesto que el cloro se encuentra en zonas muy definidas. Su origen es de las sales que se usaron como lo es el PBS.

El hecho de que haya muchos elementos celulares probablemente sea la causa de que se encuentre el cloro y el sodio, o bien que se deba al método de preparación de la muestra. Sin embargo ya que hemos determinado que se trate de una sal de cloruro de sodio, porque además no se presentan los 2 elementos Cl y Na en todas las fases, pudiera también tratarse de membranas donde hubierase bombas dependientes de cloro y que esas bombas estuvieran funcionando. Ya que las concentraciones de cloro van variando, posiblemente



Figuras 4.4-A) Espectro de EDS de rayos X característicos de las zonas 1, 2, y 3 mostradas en la figura 4.3. B) Espectro de EDS de las zonas 4, 5 y 6, mostrado en la figura 4.3.

Tabla 1V.1. Resultados del análisis químico por EDS de las zonas marcadas del 1 al 6 en la figura 4.3. Se presentan los promedios tanto en wt % (a) como en At % (b).

a

Elemento	1. Vesicular	2. Chinito	3.Int. C-P	4.PeineZ-C	5.Zona Clara	6.Int.Dentina
C	60.92	62.31	64.87	53.59	16.78	50.15
O	17.72	15.02	14.1	18.1	24.06	15.73
P	10.39	11.68	11.21	13.76	23.17	14.82
Cl	10.97	11	9.83	10.25	0.85	7.03
K	0	0	0	0	0	0.49
Ca	0	0	0	4.31	33.78	11.79
Na	0	0	0	0	1.36	0

b

Elemento	1. Vesicular	2. Chinito	3.Int. C-P	4.PeineZ-C	5.Zona Clara	6.Int.Dentina
C	74.32	76.14	78.03	69.35	30.54	67.98
O	16.23	13.78	12.73	17.58	32.87	16
P	4.92	5.53	5.23	6.9	16.35	7.79
Cl	4.53	4.55	4.01	4.49	0.52	3.23
K	0	0	0	0	0	0.21
Ca	0	0	0	1.67	18.42	4.79
Na	0	0	0	0	1.29	0

no sean las mismas concentraciones en una región con membranas de morfología lisa que con membranas de bordes estriados. Para tener resultados adicionales que permitan dilucidar este aspecto, tendría que emplearse otro tipo de técnicas.

También es de notar que la concentración de calcio se encuentra a partir del peine, y en la zona clara es altísima (de 18.42), y luego disminuye en la interfase con la dentina. La concentración mostrada en la tabla 1V.1 permite conocer la razón calcio-fósforo (Ca/P) en diferentes zonas. En la zona del peine, en la zona clara, y en la interfase, la razón Ca/P va desde 1.24, pasa por 1.13 y disminuye a 0.61 respectivamente. Esto es interesante ya que la de la hidroxiapatita es de 1.67, y en el esmalte se han reportado valores que van de 1.3 a 2. Así que aquí la hidroxiapatita podría considerarse como aún incipiente.

Otra cosa que es de notar en la tabla 1V.1 es que la presencia del fósforo es altísima principalmente en la zona clara y disminuye hacia la parte vesicular del chinito y la interfase C.P.; y también disminuye hacia la interfase con la dentina. Otro modo de operación que presenta el microanálisis es que permite obtener mapas químicos, es decir mapas en los cuales se muestren las áreas de las cuales proviene el elemento en consideración. El mapa químico de la zona relacionado con la figura 4.3 se muestra en la figura 4.5.

La figura 4.5 nos muestra en el inciso A la imagen de microscopía electrónica obtenida por electrones retrodispersados que vendría siendo la imagen original que se observan en la cámara de televisión del microscopio. Una vez que tenemos ésto, y después de hacer el análisis químico por medio de la adquisición de los espectros EDS, podemos solicitar a la computadora del microanalizador que presente las zonas de las cuales proviene el elemento.

De esta manera tenemos, por ejemplo, en el inciso b de la figura 4.5 el mapeo químico del oxígeno. Comparando ambas imágenes podemos identificar inmediatamente de donde proviene la señal más abundante en oxígeno. En la figura 4.5 C se muestra el mapeo químico del fósforo. Aquí se puede fácilmente comparar las zonas que contienen oxígeno y aquellas que contienen fósforo. En el inciso D de la figura 4.5 se puede observar que esa misma zona presenta bastante calcio puesto que esta figura es el mapeo químico del calcio.

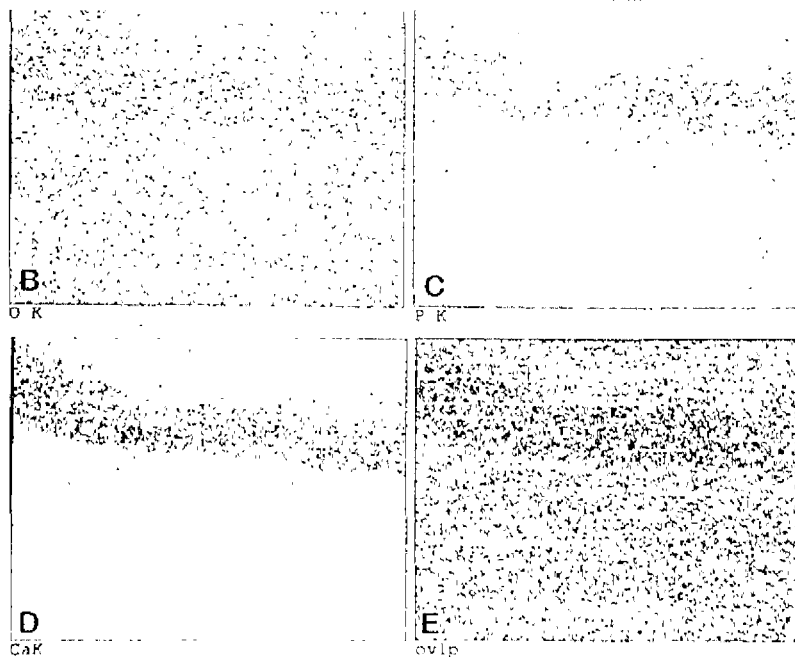
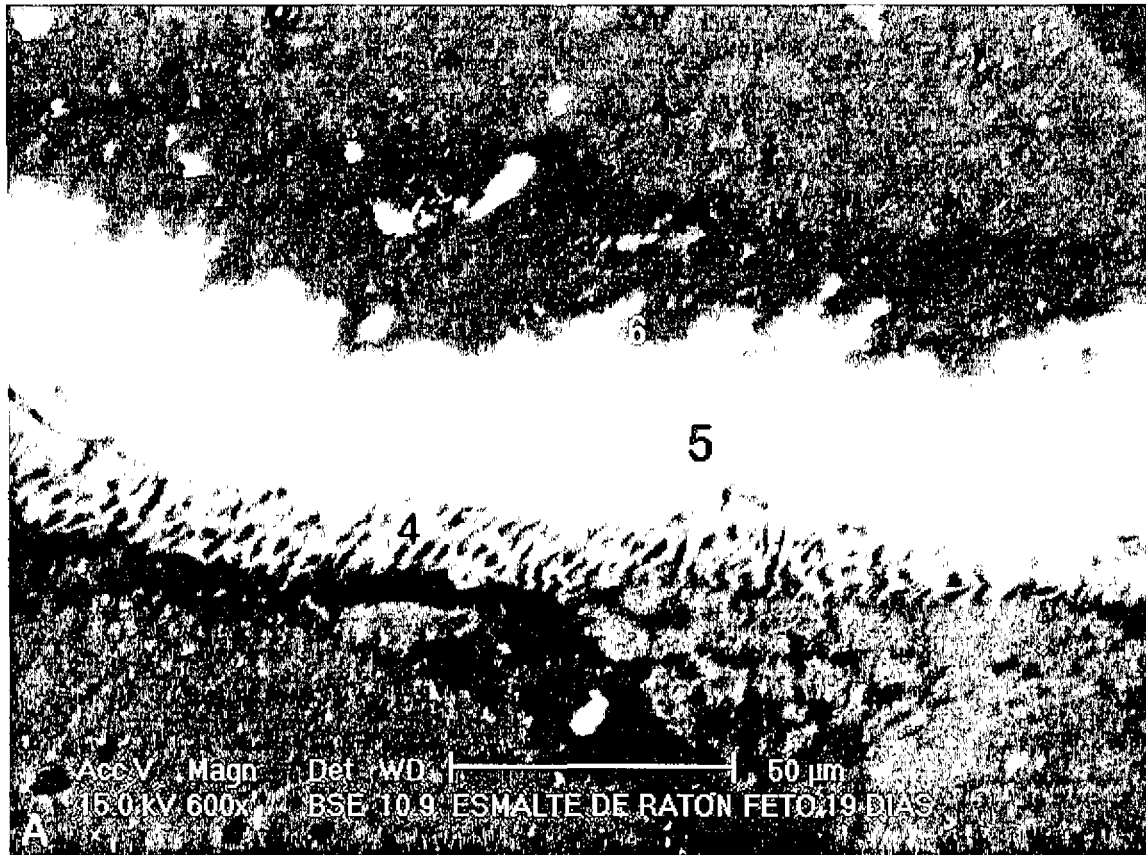


Figura 4.5-A. Micrografía de barrido con electrones retrodispersados: el número (4) indica la zona del peine parte gris, (5) la zona blanca, donde se localizaron la mayor cantidad de iones y (6) la interfase con la dentina. (B-E) el mapeo realizado por EDS de la zona blanca: (B) mapa de O, (C) mapa de P, (D) mapa de Ca, y (E) mapa mostrando la unión de los tres elementos.

En el inciso E de la figura 4.5 se muestra la sobreposición de estos 3 elementos y se puede comparar esta, con la figura del inciso A. Se puede observar por el análisis químico (EDS), que en la zona indicada con el número 5 la concentración de calcio y fósforo es muy alta, pues seguramente ya se ha sido depositada una gran cantidad de elementos que provienen de las vesículas secretadas desde aparato de Golgi y que finalmente se rompen depositándose en los alrededores de las fibras de Tomes.

La figura 4.6 muestra dos imágenes, una es la imagen general de la zona y la otra es la imagen del daño causado por el haz posterior al análisis. La tabla nos muestra un promedio del análisis de la zona 5 de la figura 4.3, con la concentración de los elementos encontrados en peso y porcentaje atómico. Así podemos observar que tenemos, aparte de calcio y de fósforo, sodio y cloro.

El microanálisis también se realizó en muestras íntegras. La figura 4.7 muestra la imagen donde se llevaron a cabo estos microanálisis. Se trata de una muestra de un feto de 19 días pero llevada a punto crítico. Los microanálisis en la zona incisal fueron tres en los puntos indicados con los números (1,2,3) de la parte externa hacia la parte media. Otro más se realizó en la zona marcada con el número (4), esta zona se localiza apicalmente. Esta muestra se fracturó, lo que permitió hacer también un par de análisis más, uno en dentina (D) y otro en la zona central correspondiente a pulpa (P). Cabe mencionar que se observa parte del hueso. Los resultados se muestran en la tabla 1V.2.

En la figura 4.8 podemos observar una muestra también de un feto de 19 días, llevada a punto crítico. En ella se realizaron cuatro microanálisis químicos de la parte externa hacia la parte media en la zona incisal, se indican los puntos (1,2,3,4) en los cuales se realizaron los análisis.

El espectro de EDS más representativo de la zona incisal se presenta en la figura 4.9, en la cual podemos ver las concentraciones de los elementos a parte de calcio, fósforo y de oxígeno. En este caso también se detectaron concentraciones de sodio, magnesio, aluminio y cloro. Las concentraciones relativas y los promedios obtenidos se presentan también en la tabla 1V.2. En esta tabla se presentan los valores de concentración de los elementos tanto en

Label:ZONA CLARA

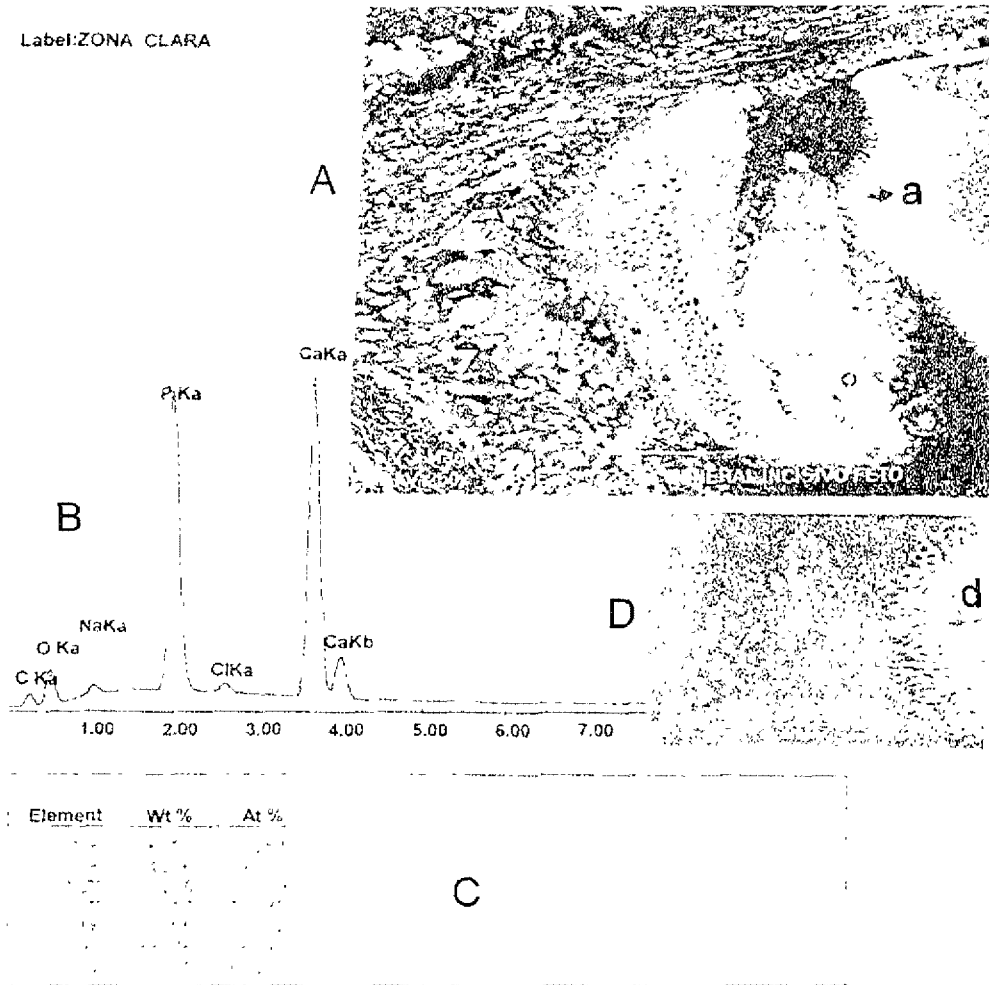


Figura 4.6. (A) Zona donde se realizó el análisis (a) por EDS. (B) Espectro de EDS característico. (C) Tabla con las concentraciones de los elementos mostrados en (B). (D) Misma micrografía que en (A) pero mostrando el daño (d) causado por el haz en la zona estudiada.

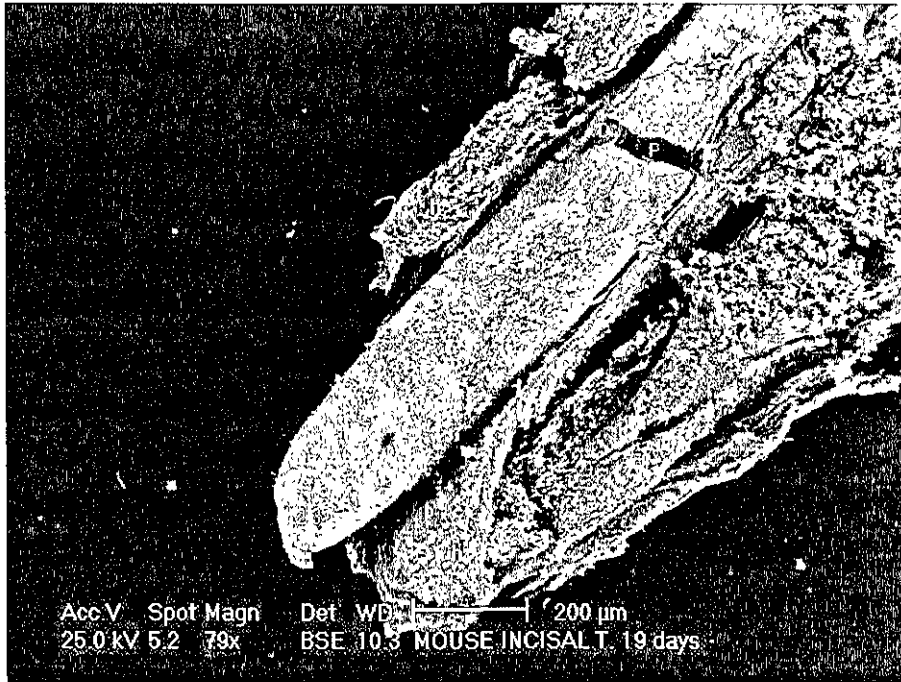


Figura 4.7. Micrografía de MEB mostrando la imagen con electrones secundarios de un incisivo inferior de feto de ratón de 19 días, preparada a punto crítico para análisis por EDS en el MEB; sitios de análisis zona incisal (1, 2, 3), más hacia apical (4), una fractura del esmalte en la zona dentinaria (D) y la zona pulpar (P). También se observan los restos de hueso alveolar y mandibular (h).

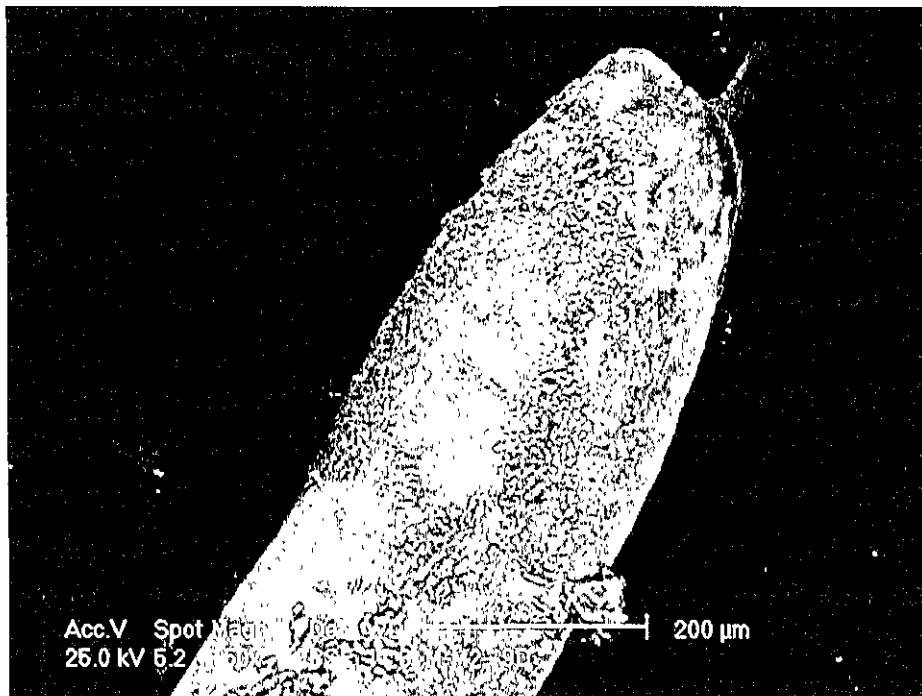


Figura 4.8. Micrografía de MEB por electrones secundarios de una muestra preparada en las mismas condiciones que la presentada en la figura 4.7. También se señalan los sitios de análisis químico (EDS) I1, I2, I3, I4.

porcentaje atómico como del porcentaje en peso. Como puede observarse por el análisis químico la concentración de fósforo y calcio es considerable, continuando con el oxígeno. Es decir, con estos resultados se trate probablemente de hidroxiapatita. Las relaciones de sodio, magnesio y aluminio, muy probablemente estén dentro del rango de los valores reportados para el esmalte dental adulto.

En la figura 4.10-A y B se muestra el espectro típico de la zona de la dentina mostrada en la figura 4.7. En este caso también encontramos fósforo, calcio y oxígeno, aluminio, sodio, magnesio y cloro. Un aspecto que es importante notar es que se encuentra un pico considerable de azufre. De hecho la concentración de azufre es relativamente alta comparada con el cloro, e inclusive que la de calcio y el magnesio. Es más o menos igual en proporción al sodio. Las consideraciones de estos elementos, tanto en porcentaje atómico como en porcentaje peso, se muestra en la tabla 1V.3.

En la figura 4.11 se presenta un espectro típico de los observados de la muestra de la figura 4.8. En este caso no se detecta azufre como en el caso del espectro en la figura 4.10. Se observan los elementos que normalmente se presentaban y que, aparte del calcio, fósforo y oxígeno, se presentan, sodio, magnesio, aluminio y cloro con las concentraciones presentadas en la tabla 1V.4.

En el comentario final de esta sección, podemos decir que la técnica de microanálisis, en conjunto con el método experimental desarrollado en este trabajo de tesis, ha permitido analizar en forma puntual y por zonas la concentración de los elementos que participan durante la nucleación y crecimiento de los cristales de esmalte dental.

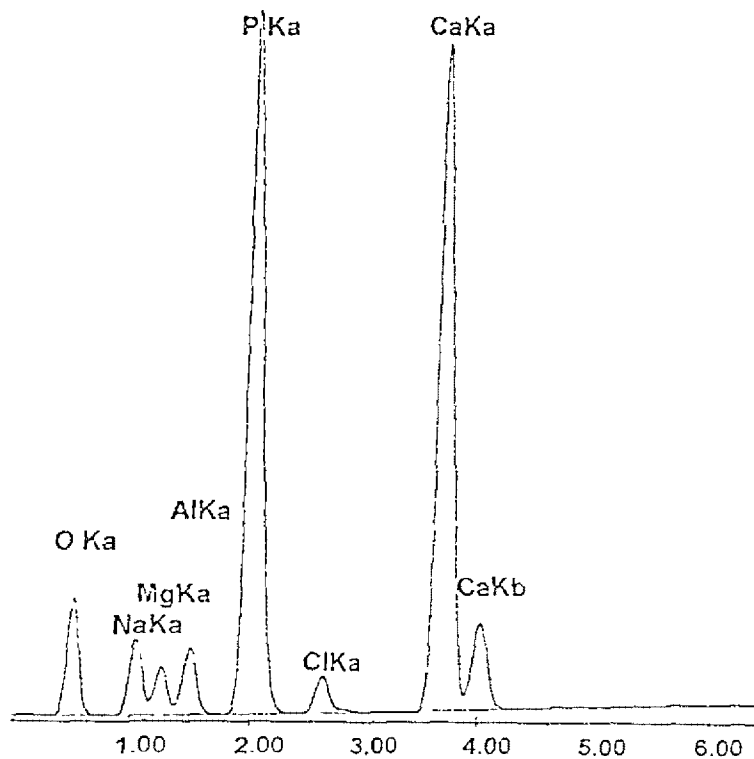


Figura 4.9. Espectro de EDS de rayos X característicos representativo de la zona incisal de la figura 4.7.

Tabla 1V. 2. Resultados del análisis por EDS de la zona Incisal (I1), I2, I3, I4, de la figura 4.7

Elemento	Zona Incisal (I1)		Zona I2		Zona I3		Zona I4	
	Wt %	At %	Wt%	At%	Wt%	At %	Wt %	At %
O	17.98	31.62	25.58	43.54	29.45	46.15	30.76	47.8
Na	4.25	5.2	1.55	1.83	5.92	6.46	6.08	6.58
Mg	2.09	2.42	1.02	1.15	2.67	2.75	2.38	2.44
Al	3.39	3.53	1.84	1.86	3.06	2.84	2.55	2.35
P	30.34	27.56	19.56	17.2	26.27	21.26	25.29	20.3
Cl	2.27	1.8	1.72	1.32	1.59	1.13	1.33	0.93
Ca	39.68	27.86	48.72	33.1	31.03	19.41	31.61	19.61

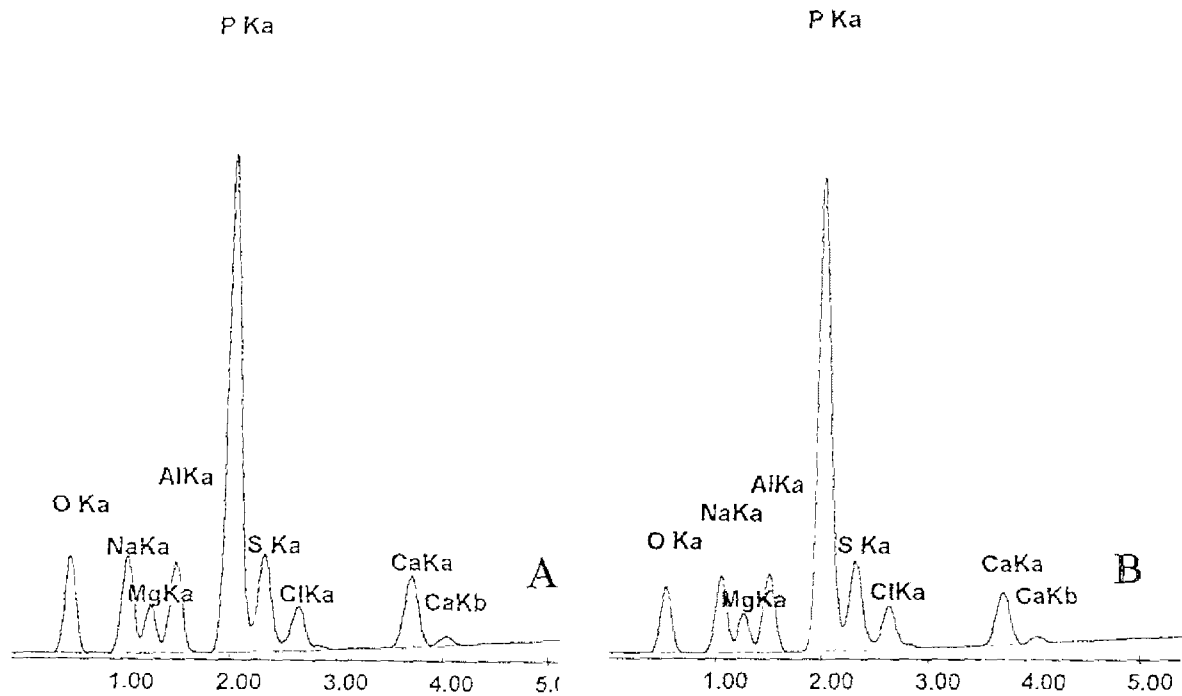


Figura 4.10-A) Espectro de EDS de la zona (D) dentinaria de la figura 4.7. (B) espectro de EDS de la zona (P) central o pulpar.

Tabla 1V.3. Resultados del análisis por EDS cerca de la zona apical señalado con la letra P (zona de la pulpa) y D (zona de la dentina) de la figura 4.7.

Elemento	Zona P		Zona D	
	Wt %	At %	Wt %	At %
O	25.01	38.28	28.8	42.75
Na	9.18	9.78	10.09	10.42
Mg	3.89	3.92	4.08	3.99
Al	6.65	6.03	6.74	5.93
P	35.71	28.23	32.02	24.55
S	9.37	7.16	6.3	6.15
Cl	4.71	3.25	3.88	2.6
Ca	5.48	3.35	6.08	3.6

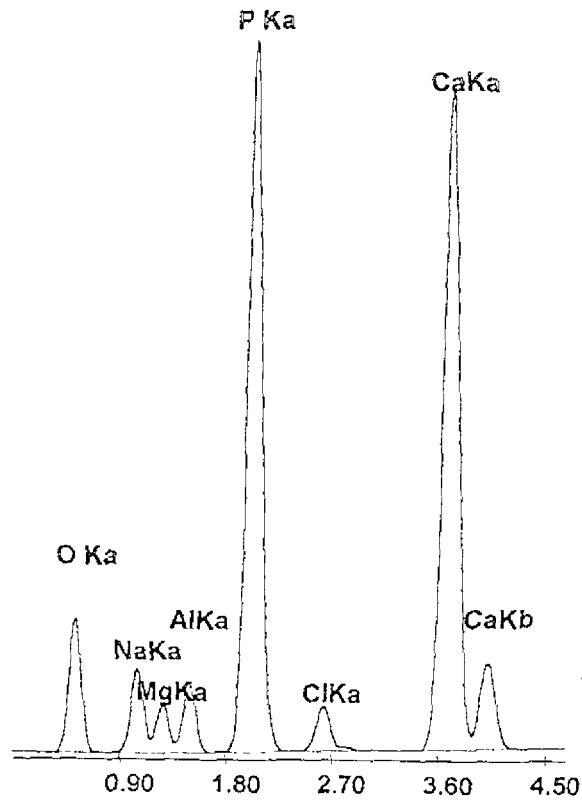


Figura 4.11. . Espectro representativo de la zona incisal de la figura 4.8.

Tabla 1V.4. Resultados del microanálisis por EDS de la muestra analizada en la zona incisal I1, I2, I3, I4, de la figura 4.8.

Elemento	Zona Incisal (I1)		Zona I2		Zona I3		Zona I4	
	Wt %	At %	Wt%	At%	Wt%	At %	Wt %	At %
O	43.62	58.55	42.57	57.69	30.56	46.89	31.27	48.18
Na	10.93	10.21	10.88	10.26	7.49	7.99	6.14	6.58
Mg	5.31	4.69	5.09	4.54	3.09	3.12	2.64	2.68
Al	5.85	4.65	5.71	4.59	3.71	3.38	3.11	2.84
P	21.16	14.67	21.33	14.94	26.1	20.69	25.56	20.34
Cl	2.78	1.68	2.51	1.53	1.82	1.26	1.84	1.28
Ca	10.36	5.55	11.91	6.44	27.23	16.68	29.45	18.11

4.4. Microscopía de Transmisión.

En el área de microscopía electrónica de transmisión, las muestras fueron preparadas de acuerdo a lo estipulado en la parte del procedimiento experimental y los resultados se pueden observar en las siguientes imágenes.

La figura 4.12 representa la zona de análisis en la cual se realizaron los trabajos de microscopía electrónica de transmisión. Esta zona la podemos comparar fácilmente con la figura 4.2 y la figura 4.3 sin ningún problema puesto que hemos utilizado el mismo tipo de nomenclatura en esta fotografía que en aquellos casos.

Así tenemos, por ejemplo, con el número (1) los núcleos de los ameloblastos, la letra (A) nos indica la zona de ameloblastos, las letras (fT), nos indica las fibras de Tomes que es la zona clara y la letra (e) es la zona principal de depósito de los futuros cristales del esmalte. De esta manera tenemos que el número (5) es donde ya se depositaron los primeros cristales y, conforme se van depositando más, van engrosando la zona donde empiezan a mineralizarse. Estos cristales corresponden en la figura 4.2 y 4.3 a la zona blanca. De la misma manera tenemos que las letras (id) y el número (6) es la interfase con la dentina, mientras que la zona (Pd) indica la pre dentina. También se muestra otra nomenclatura que es nueva en este caso: las letras (C i), con las cuales hemos identificado el área donde se presentan los cristales incipientes.

Podemos comentar que estos cristales incipientes tienen forma de agujas o de listones, reportados en la literatura, se encuentran cercanos a las fibras de Tomes. En esta figura 4.12 se han señalado dos áreas, (A1) y (A2), de las que posteriormente podremos observar algunas ampliaciones. De esta manera podemos decir que gracias a las figuras 4.2, 4.3 y 4.12 hemos podido identificar las zonas de interés en las que vamos a presenciar la nucleación y el crecimiento de los cristales del esmalte dental. Cabe comentar que, utilizando el método experimental comentado en la sección 3, es posible observar las zonas donde se encuentra el material orgánico y las zonas de nucleación de los cristales, presentados en la figura 4.12 en una vista general.

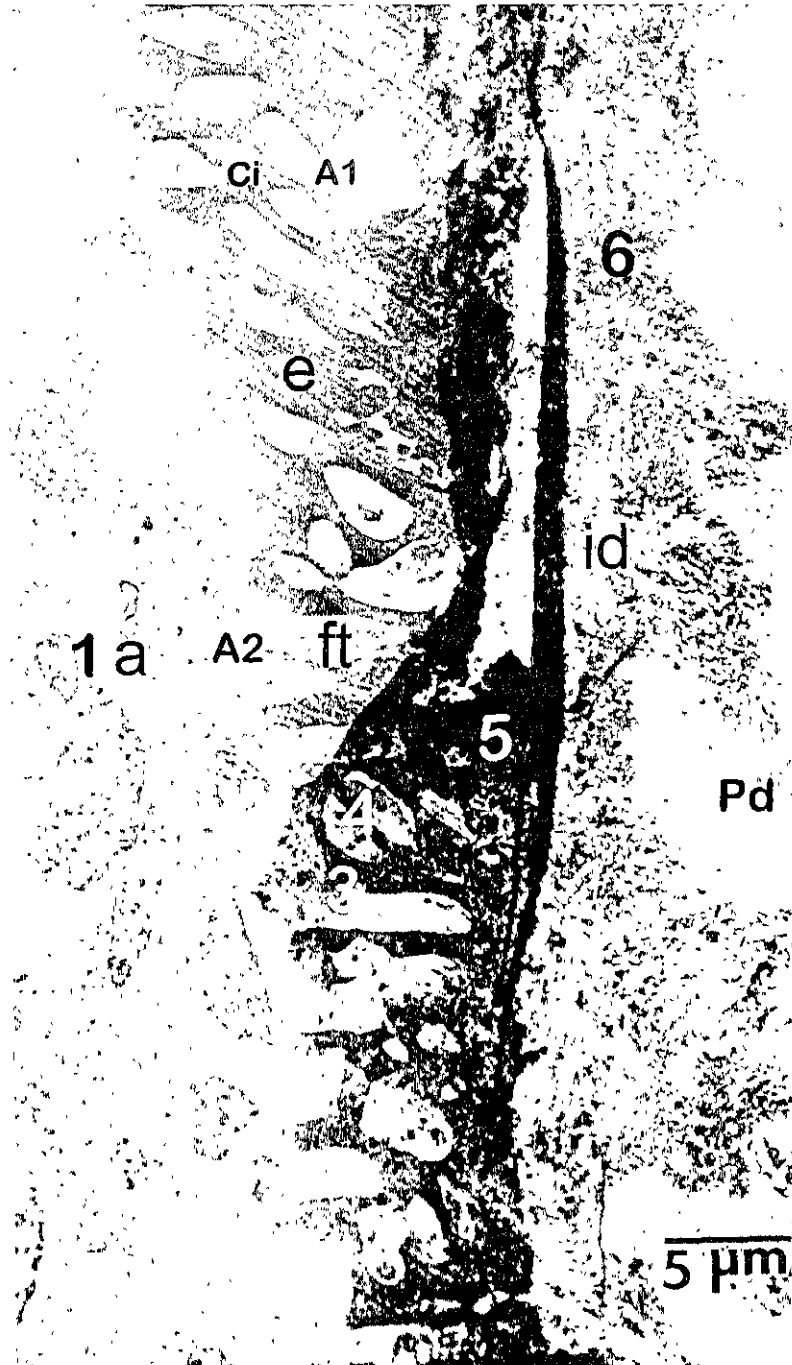


Figura 4.12. Imagen (estadio secretorio) de MET donde se muestran: núcleos de los ameloblastos (1a) ver figura 4.13, interfase C-P (3), peine zona clara (4), zona clara con mayor % de Ca (5), en la zona principal de depósito de los futuros cristales de esmalte(e), interfase con la dentina (6-id), Cristales incipientes o inmaduros (Ci), fibras de Tomes (ft), predentina (Pd). A1 y A2 zonas de las que se mostrará una amplificación posteriormente.

La figura 4.13 muestra la belleza de la imagen obtenida con el microscopio electrónico de transmisión, producto de la calidad en la preparación de la muestra en conjunto con el procedimiento experimental seguido. En la figura 4.13 se muestra la variedad de estructuras que constituyen a la célula del ameloblasto.

En la figura 4.14-A se muestra la zona de material orgánico un poco alejada del área que presenta el número 4 de la figura 4.5, es una zona aledaña de las fibras de Tomes. Esta figura presenta la zona celular de los ameloblastos en donde se observa el aparato de Golgi, restos de mitocondrias, de algunos otros organelos y muchas vesículas. Probablemente en lisis para después dar paso a lo que serán los cristales. En la micrografía número 4.14-B y C podemos observar unas zonas extracelulares con algunas vesículas posiblemente rompiéndose para poder depositarse probablemente, los elementos que van a constituir dichos cristales.

Debemos comentar que el número (1) que se muestra en la figura 4.12 corresponde al número (1) que se presenta en la figura 4.2 y 4.3. Es exactamente la misma zona de la figura 4.14-A (con elementos celulares como el aparato de Golgi). La figura 4.14-B y C es una zona más próxima de los puntos de mineralización (zona extracelular).

En la figura 4.15-A se muestra una zona muy interesante; es un corte donde podemos apreciar elementos de los ameloblastos, pero también, en la parte superior, los posibles núcleos de crecimiento de los cristales. Podemos observar en la figura 4.15-B, un acercamiento de esa zona de la figura A donde se pueden distinguir los cristales en formas de agujas; es decir, la zona de esta figura muestra áreas en las cuales da inicio la nucleación de los cristales del esmalte dental. Nótese el conglomerado que estas agujas forman.

En la figura 4.16 se presenta un área cercana a donde se localizan los cristales del esmalte dental y que corresponde al número 5 en la figura 4.2, 4.3 y 4.12. Aquí se muestra una vez más la presencia de conglomerados de los cristales en forma de agujas. En la figura 4.17 las imágenes A, B y C muestran ampliaciones de los cristales en forma de agujas y las cuales se presentan

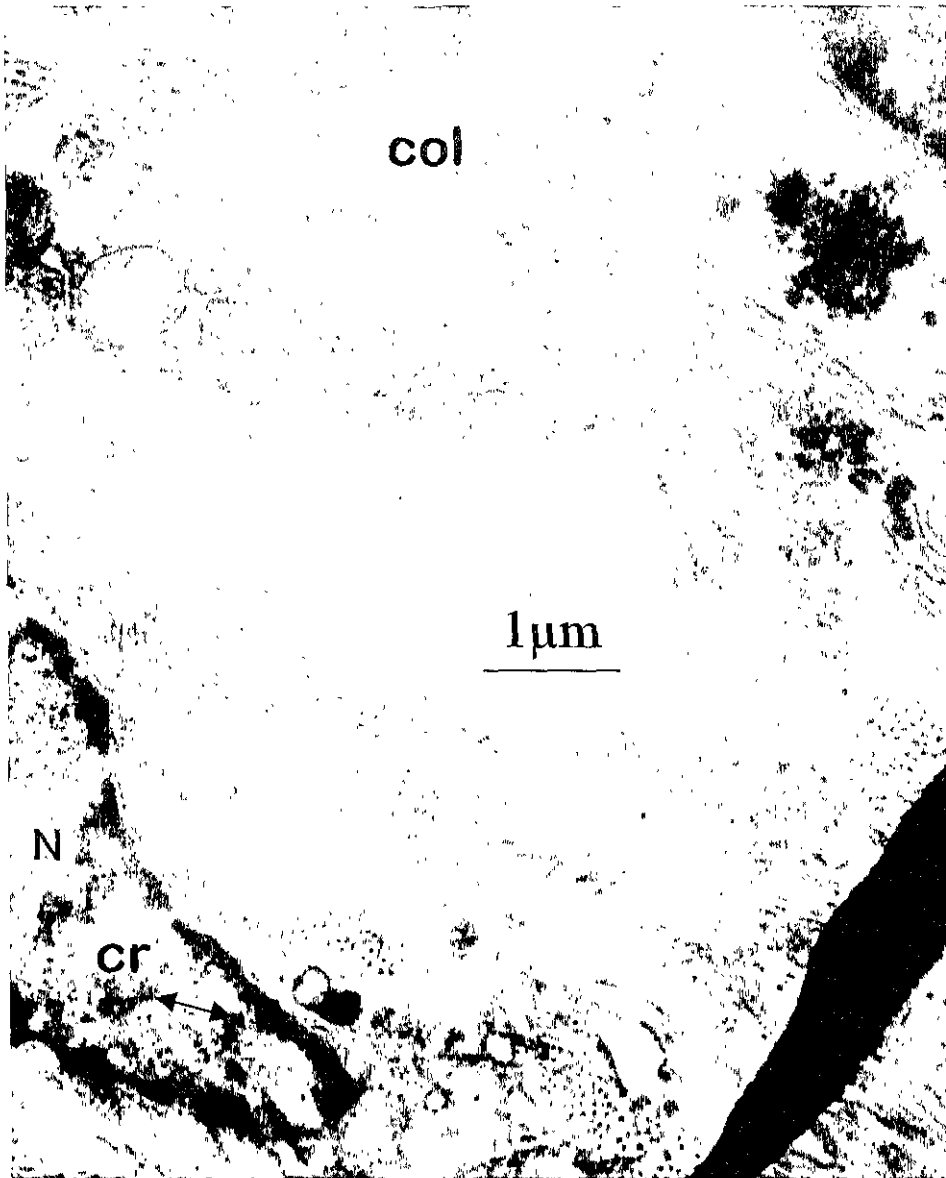


Figura 4.13 Micrografía de MET en campo claro en donde se observan estructuras del ameloblasto, que constituyen la célula (zona 1a figura 4.12), el núcleo (N), la cromatina (cr, flechas) y colágeno (col) entre otras.

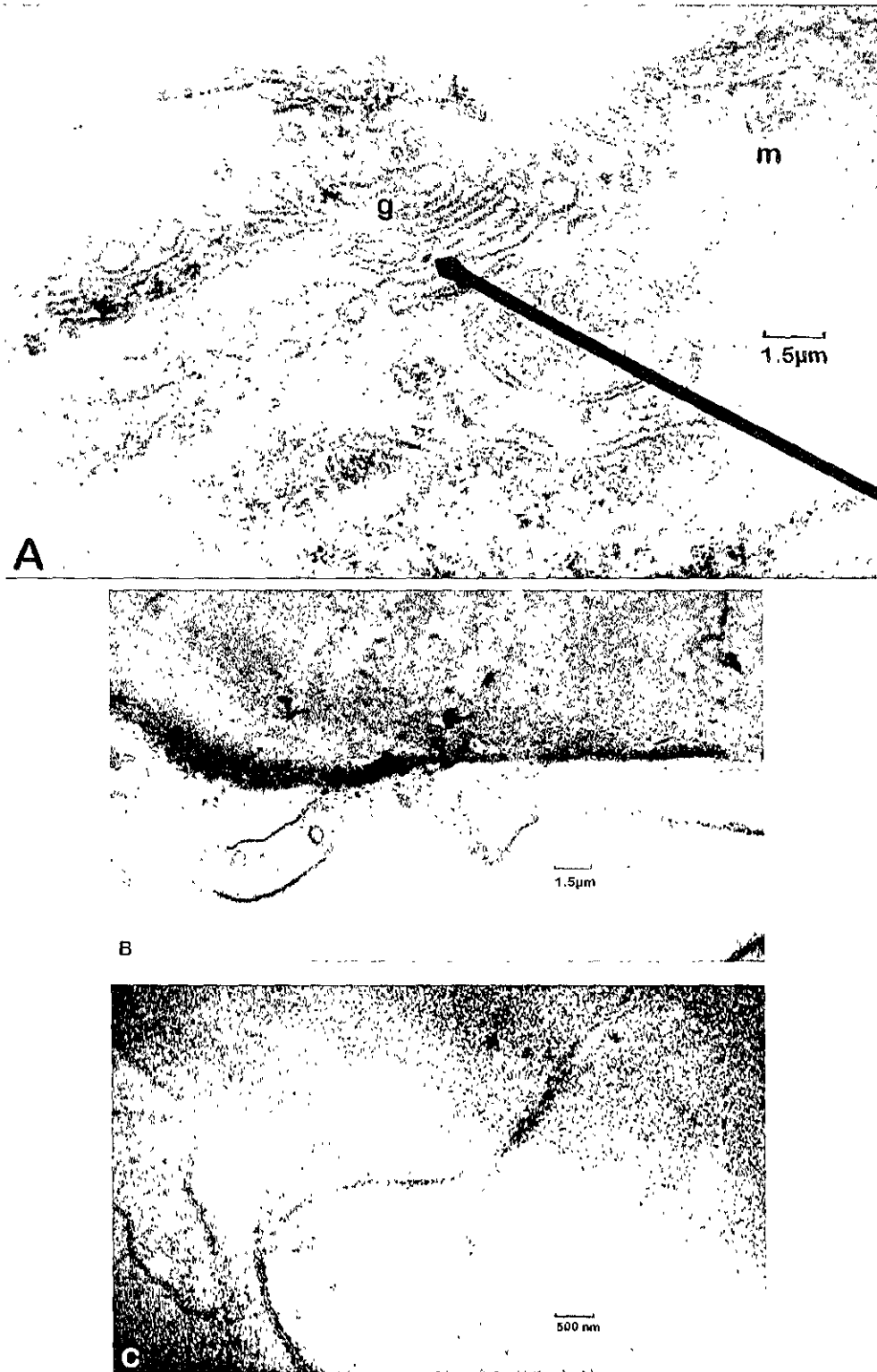


Figura 4.14 (A). Micrografía de MET en campo claro de la zona celular de los ameloblastos. Aparato de Golgi (g), mitocondria (m). B-C zonas próximas a los puntos de cristalización. (B) Vista extracelular. (C) Posible depósito del material

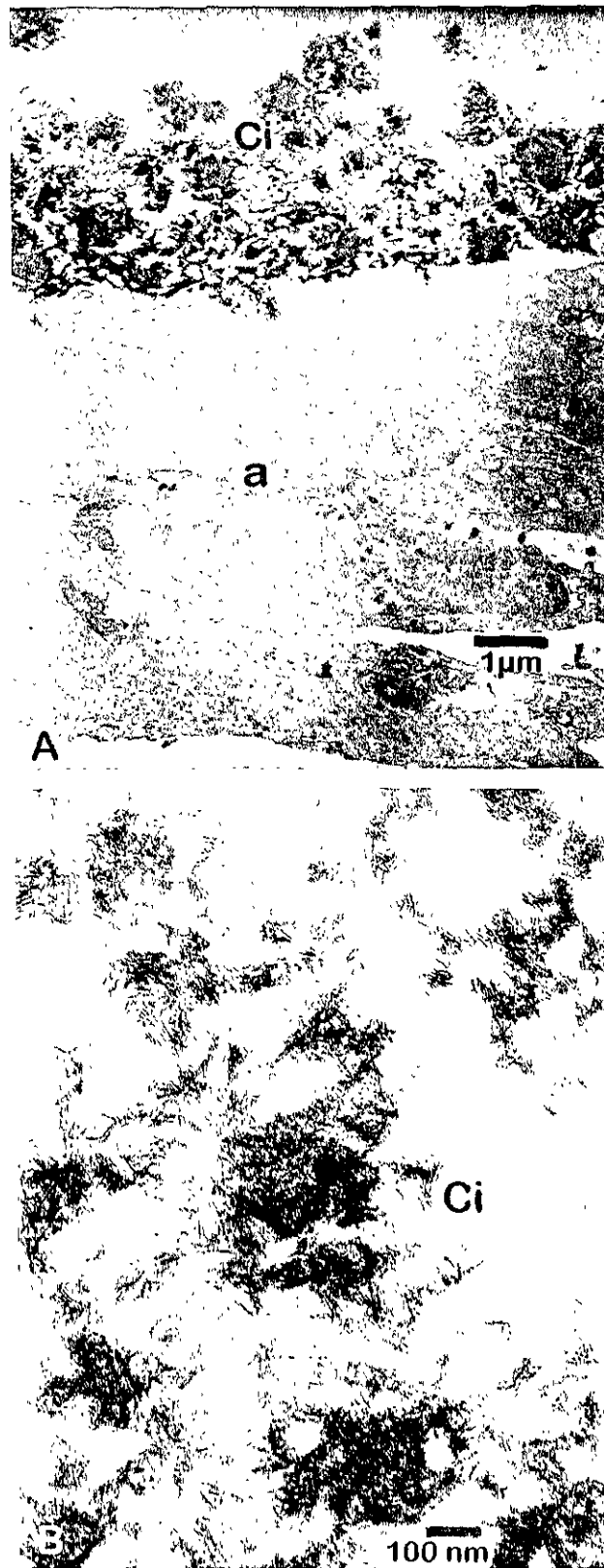


Figura 4 15-A). Micrografía de MET en campo claro donde se observan: la zona de ameloblastos (a) y cristales incipientes (Ci). B) Acercamiento de uno de los sitios de nucleación de la zona muestra los conglomerados de cristalitas incipientes en forma de agujas (Ci).

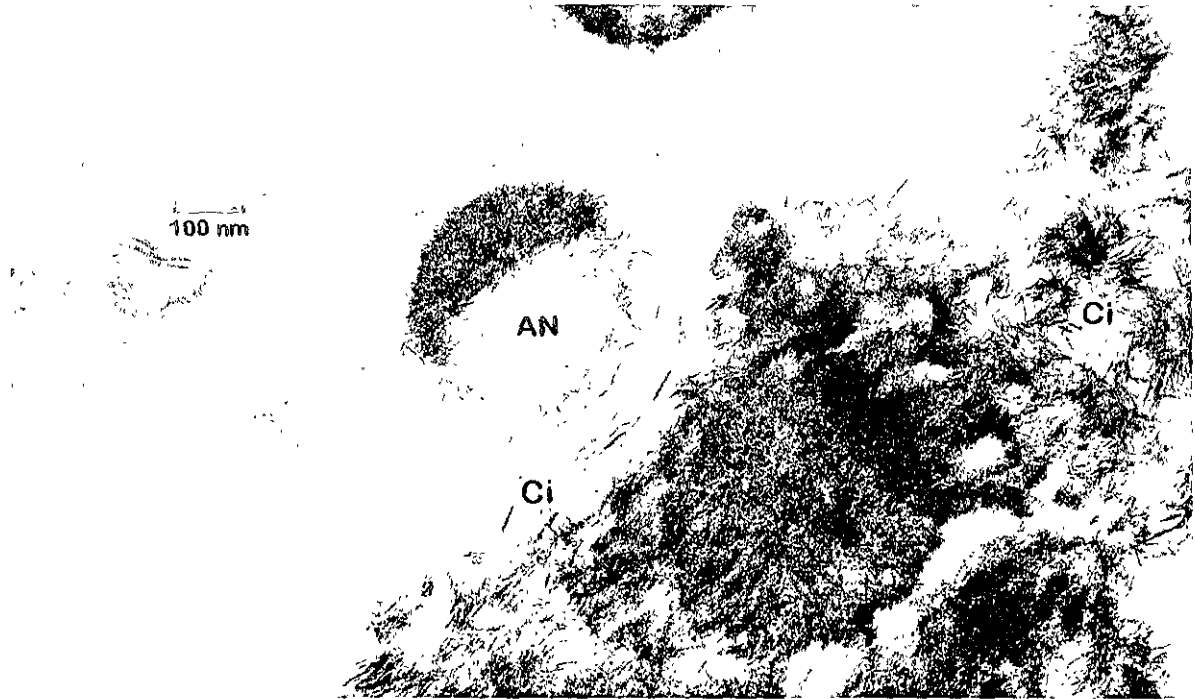


Figura 4.16-A). Micrografía de MET de los sitios de depósito de los cristales, cristales incipientes (Ci), área de nucleación (AN). B) Conglomerado de cristales incipientes en forma de agujas (Ci)

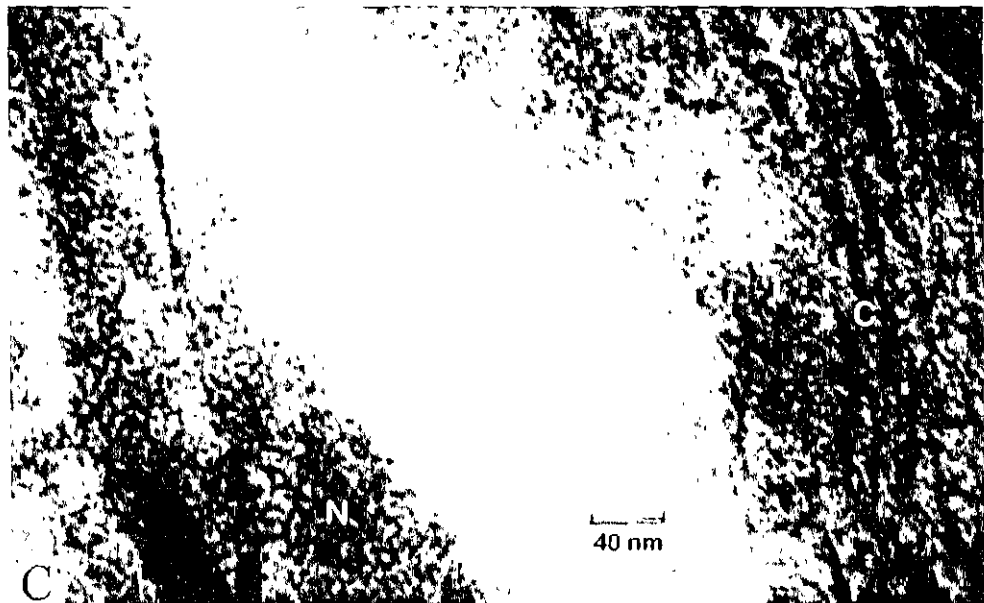
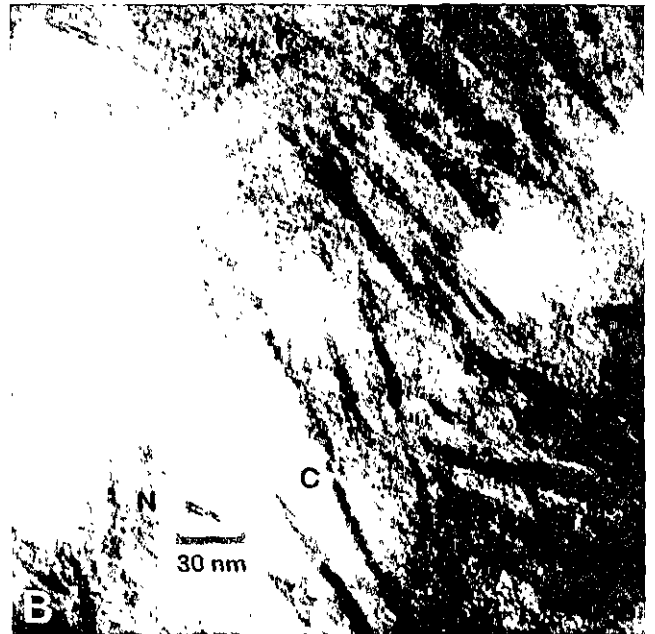
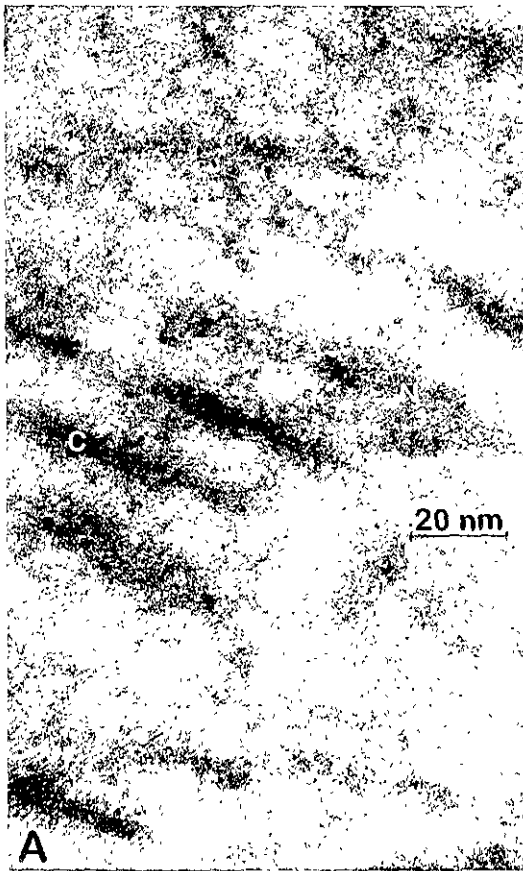


Figura 4.17-A, B y C. Micrografías de MET en campo claro de los cristales en forma de agujas (C). Posiblemente las zonas marcadas con (N) corresponden a las nanoesferas.

como líneas oscuras las que posteriormente serán los cristales. También se ven perfiles grises, las posibles nanoesferas del material orgánico (a los 19 días).

En la figura 4.18 se muestra la franja de cristales incipientes o inmaduros que presenta la nucleación de los cristales de esmalte dental, y que corresponden al número 5 en las figuras anteriores. Los patrones de difracción de esta región son casi amorfos (figura 4.19-B) pero, como vamos a ver mas adelante, corresponde a un patrón donde la zona esta compuesta de muchos nanocristales en conjunto con material orgánico. Esta zona es muy interesante puesto que aquí ya se presenta la mayor mineralización de la muestra.

La figura 4.19-A muestra una zona con un mayor acercamiento de la figura 4.18. En este caso se observan fibras que rodean el material orgánico, las fibras de Tomes, presentan restos celulares. Se observan diferentes tamaños de cristales o elementos que los van a formar, pero que todavía están en una etapa inmadura. También se observa el material contenido en las vesículas provenientes del aparato del Golgi.

Se observan cristales en forma de listones (marcados con la letra C). El contraste mostrado con la letra N representa posiblemente material orgánico que esta dirigiendo la orientación de los futuros cristales. En la figura 4.19 B podemos observar el patrón de difracción de electrones de esa zona; como se comentó anteriormente este es un patrón no muy bien definido. El anillo que presenta, corresponde a la distancia interplanar del plano (211) de la hidroxiapatita. Lo único que nos esta mostrando el patrón de difracción es la existencia en esta zona de cristalitos de orden nanométrico claramente sumergidos en un material orgánico.

Un mayor acercamiento de este tipo de imágenes se presenta en las figuras 4.20 y 4.21. De hecho, estas figuras corresponden a una amplificación de la zona del recuadro mostrado como A1 en la figura 4.12. En este caso se muestra una fibra de Tomes y un posible depósito del material proveniente de las vesículas y su inmediata degradación para hacer espacio a la maduración de los futuros cristales del esmalte dental. Una amplificación del depósito de material observado en la figura 4.20 se muestra en la figura 4.21, donde se

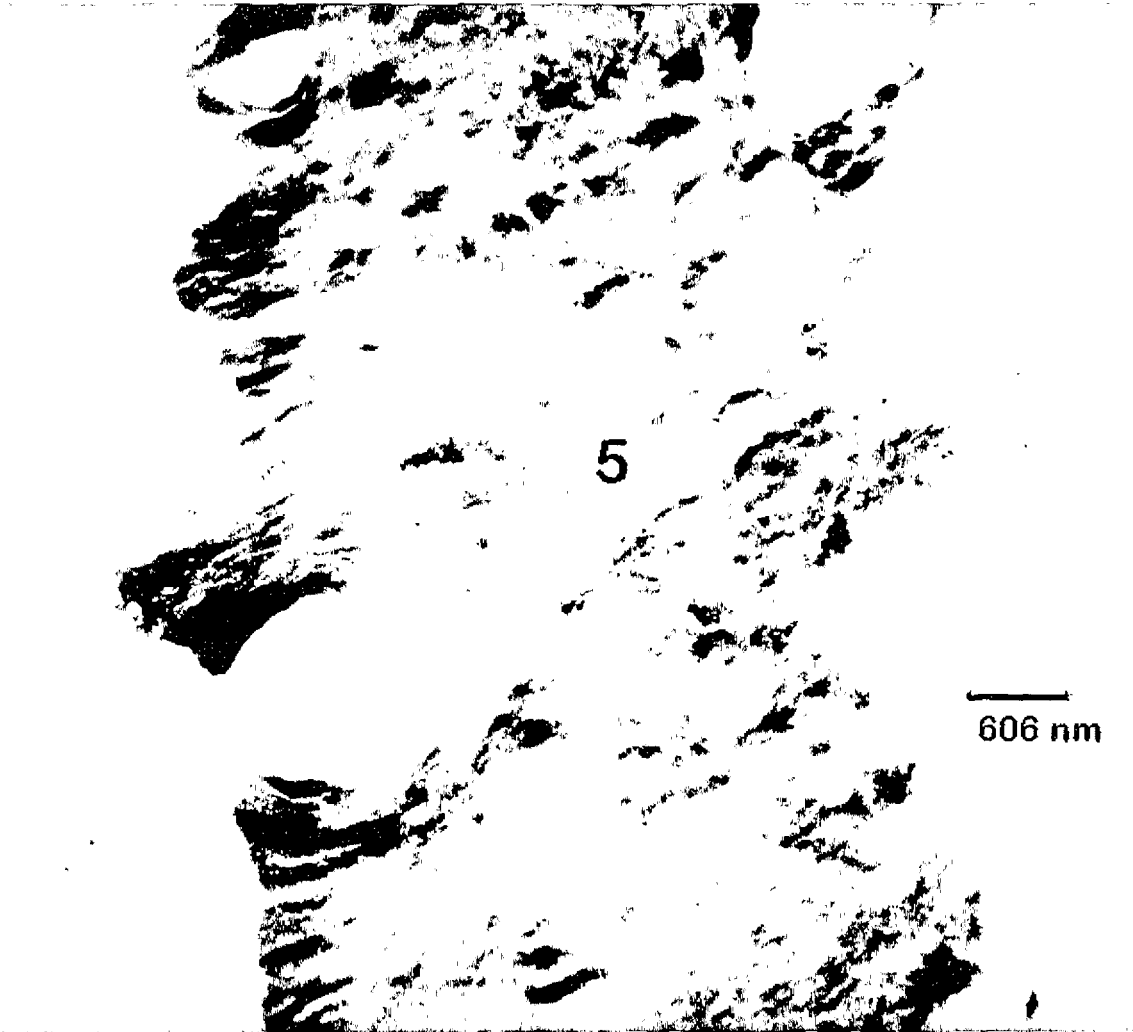


Figura 4.18. Micrografía de MET en campo claro de una franja de la zona 5 en la figura 4.12 donde se observaron cristales inmaduros del esmalte dental.

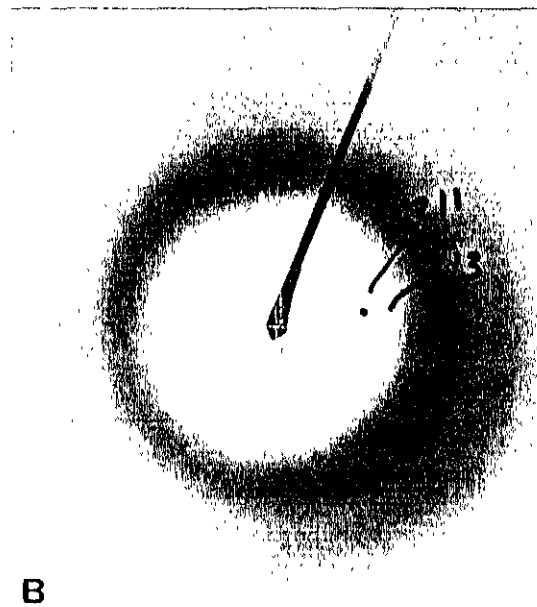
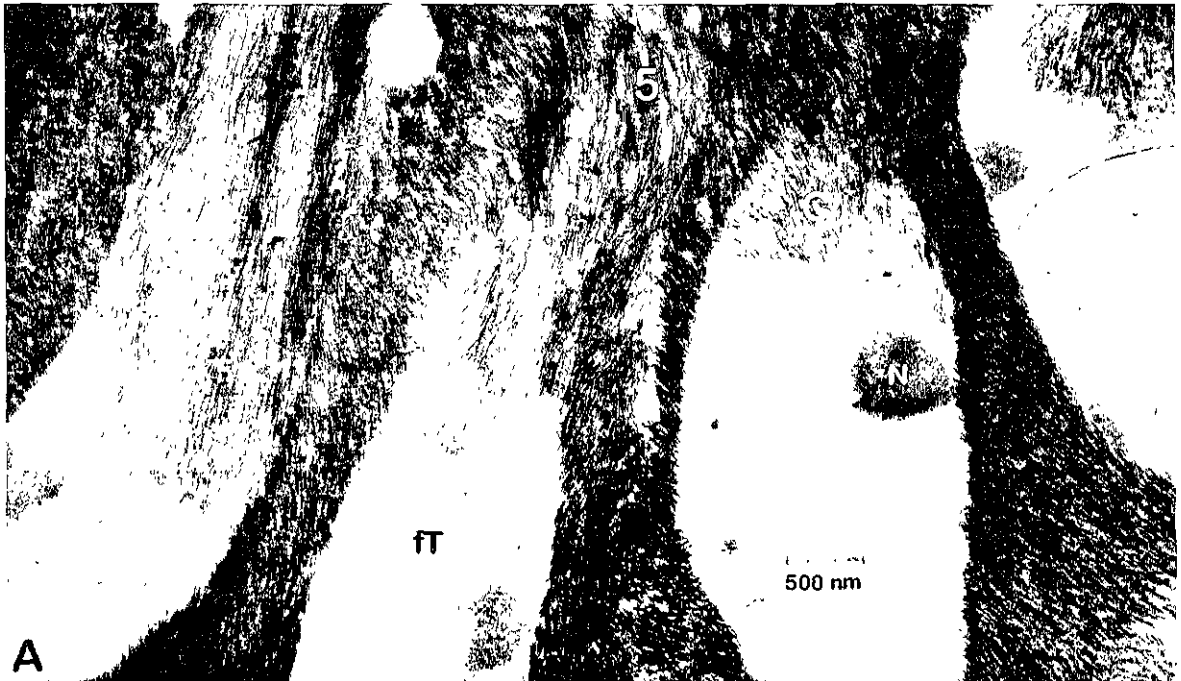


Figura 4.19. A) Restos celulares que se localizan en las fibras de Tomes (ft), posible material orgánico (N) (nanoesferas), cristales inmaduros (Ci), futuros cristales de esmalte en diferentes direcciones (5). B) Patrón de difracción de electrones de la zona 5, aún amorfa, material tomado de incisivo inferior de feto de ratón de 19 días 10 hrs.

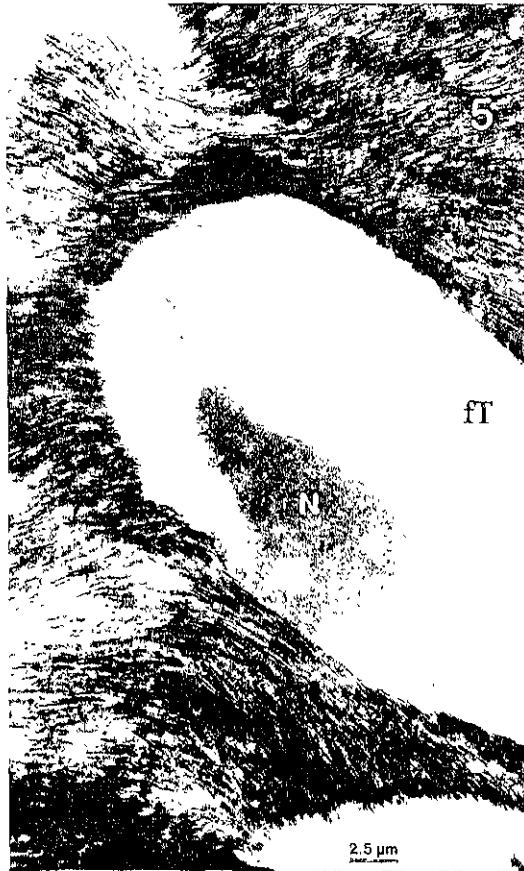


Figura 4.20. Micrografía de MET (zona A1 figura 4.12) en campo claro donde se muestran las fibras de Tomes (**ft**), las nanoesferas (**N**) y zona de depósito de los cristales (**5**). Incisivos inferiores de feto de ratón de 19 días.



Figura 4.21. Amplificación de la zona indicada por (**N**) donde se observan las nanoesferas.

observan alrededor de este depósito elementos orgánicos precursores de los cristales; posiblemente estamos observando un contraste que puede corresponder a las nanoesferas a las cuales se hizo referencia en la sección número 1 (figura 1.3).

Un punto importante, que nos interesa a estas alturas, es la observación de los cristales del esmalte dental. Para eso analizemos con mayor detenimiento la figura 4.22. Esta es una imagen de microscopía electrónica de transmisión de los cristales de esmalte, pero todavía en un estado inmaduro. Es decir, en este estadio las fibras, que después de un tiempo de maduración adicional serán los cristales del esmalte, se encuentran en un estado de reciente inicio de la mineralización.

La zona se compone en su mayoría de material orgánico. Si obtenemos el patrón de difracción de la zona mostrada en la figura 4.22 (un acercamiento), es muy semejante al mostrado en la figura 4.19-B. Esto indica que la zona se compone de cristales de tamaño nanométrico y que las fibras que se observan se conforman en mayor proporción de material orgánico.

En la figura 4.22 se pueden ver los cristales en forma de listones y, además, se observan 2 tipos de contrastes muy bien identificados: uno son los listones que corren a lo largo de la diagonal y otro son los cristales más pequeños que posiblemente representen estos listones pero en dirección transversal.

En la figura 4.23 observamos una amplificación del recuadro mostrado como A2 en la figura 4.12. En ésta figura se puede observar una gran cantidad de vesículas con el producto secretorio proveniente del aparato del Golgi, se observan células nerviosas de Schwann con axones en proceso de mielinización, con una lámina concéntrica de mielina, fibras de Tomes, mitocondrias, restos membranosos, incluyendo algunos listones que van a formar el esmalte dental durante la nucleación. En la figura 4.24-A se observa en un acercamiento a la interfase entre las estructuras de agujas y de material orgánico de la figura 4.23. Aquí se muestra que son cristales incipientes correspondientes al esmalte dental en proceso de formación y además incluidos en material orgánico, lo cual produce los contrastes observados en los patrones

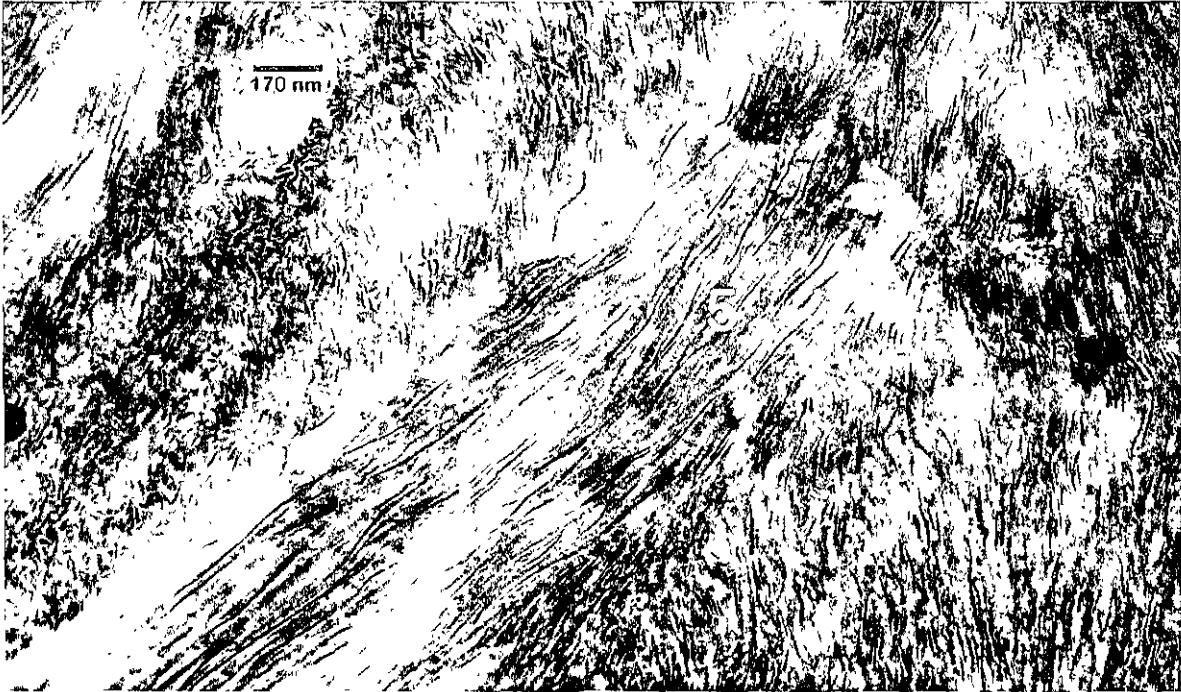


Figura 4.22. Micrografía de MET en campo claro de la zona 5 (figura 4.11). Se muestran cristales inmaduros en diferentes direcciones.

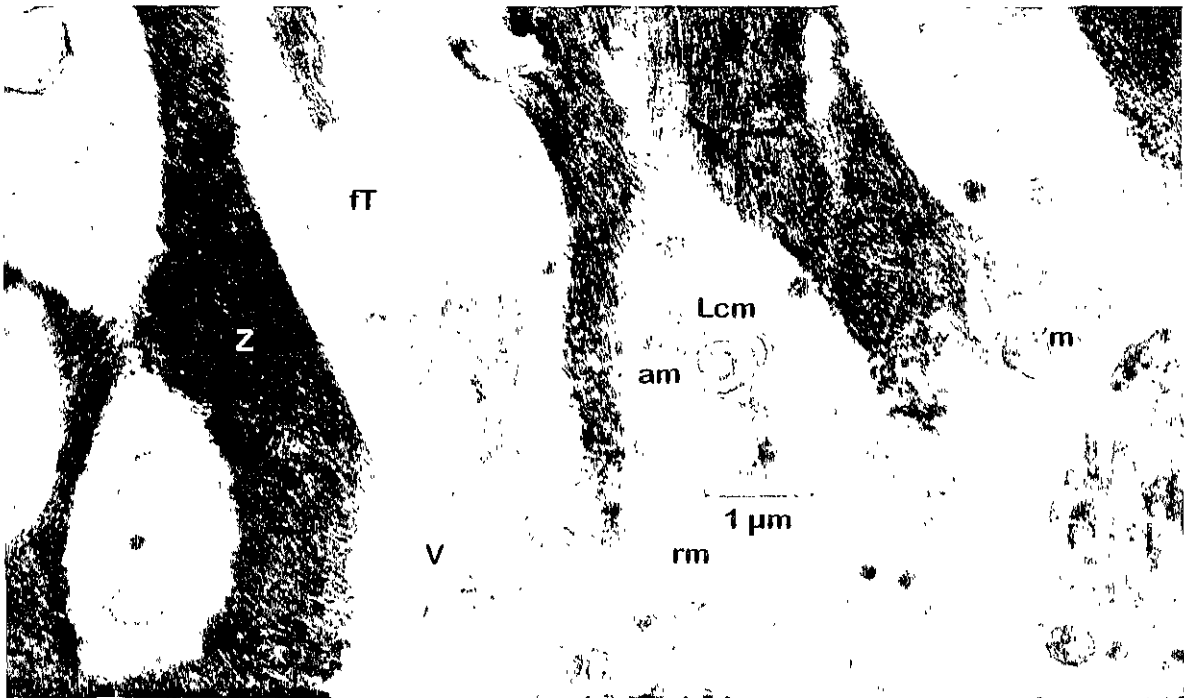


Figura 4.23. Se observa gran cantidad de vesículas (V) con el producto secretorio proveniente del aparato de Golgi. Se encuentran también células nerviosas de Schwann involucrando a las fibras nerviosas en proceso de mielinización, axón mielinico (am), láminas concéntricas de mielina (Lcm), fibras de Tomes (ft), zona más oscura donde se encuentran los cristales (z), mitocondrias (m) y restos membranosos (rm).

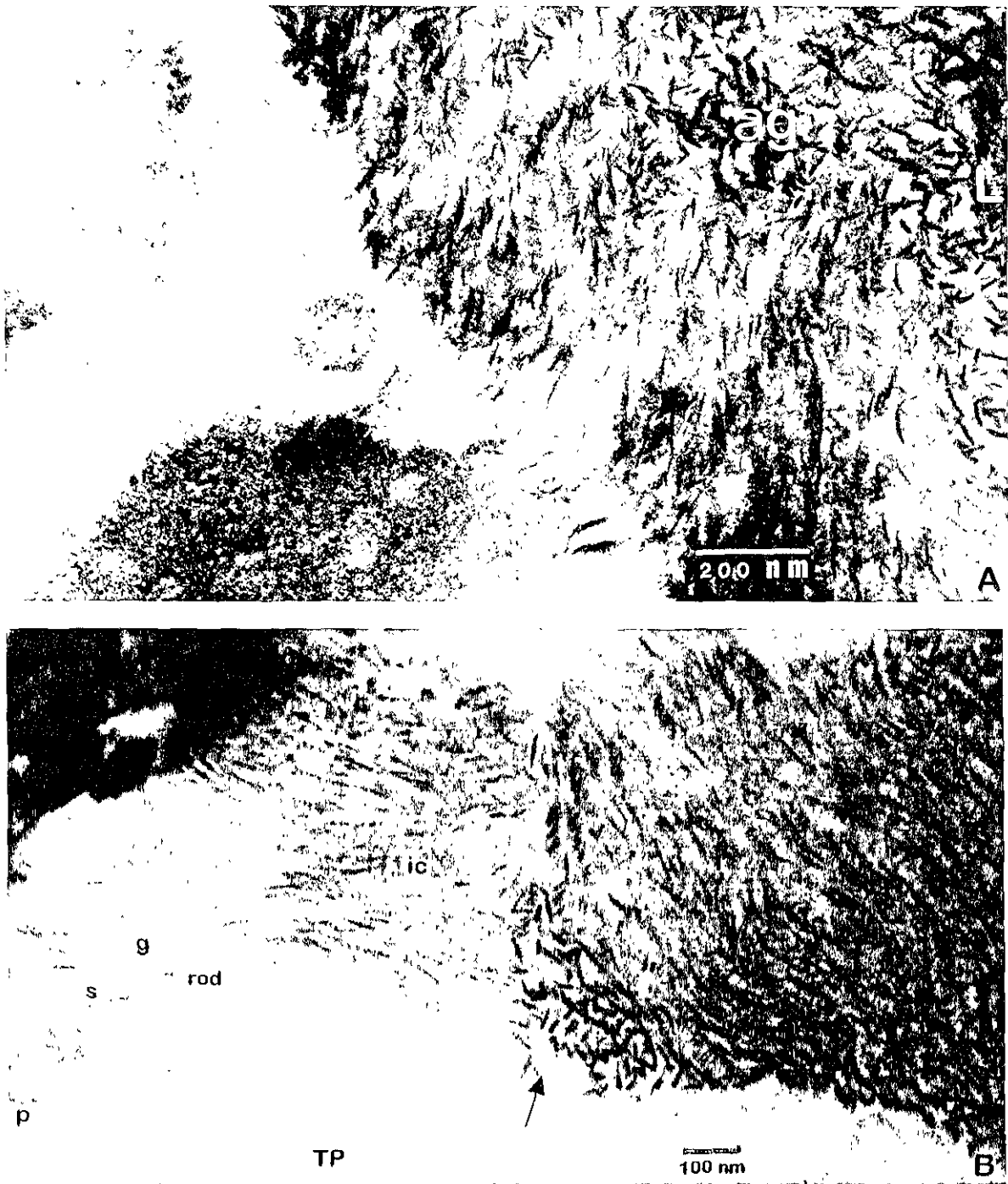


Figura 4.24. Micrografías de MET en campo claro. A). Se observan gran cantidad de estructuras como agujas (**ag**) y listones con diferente dimensiones y material amorfo (**L**). B) Acercamiento a una zona donde se muestran delgadas líneas pálidas (**P**), unas como líneas filosas oscuras como agujas (**s**), perfiles grises (**g**) posible zona de nanoesferas, cristales orientados longitudinalmente se ven en el camino (**rod**) del depósito del esmalte, cristales incipientes (**ic**), las fibras de Tomes (**TP**) o **ft**. Agujas vistas en dirección transversal indicadas por la **flecha**. Obsérvese la similitud con la figura 1.11-A.

de difracción de la figura 4.19-B. Aparte de las agujas, se observan contrastes de círculos más claros que podrían representar la manera de depositarse el material que forma las nanoesferas, de las que se hizo mención en el capítulo uno. La figura 4.24-B, también es una imagen ampliada de una zona de agujas o “líneas filosas” como las llama Warshasky (1982); (g) denota los perfiles grises que podría tratarse del material orgánico, las fibras de Tomes y las diferentes direcciones que siguen los cristales. La zona marcada con la flecha corresponde a los mismos cristales solo que en dirección transversal, y no longitudinal como el resto de ellos.

Finalmente la figura 4.25, es una figura muy importante, nos muestra una imagen de microscopía electrónica de transmisión en campo oscuro; éste fue realizado poniendo la apertura de la lente objetiva en el primer anillo del patrón de difracción mostrado en la figura 4.19-B. En esta figura podemos ver claramente en contraste brillante los **cristales de tamaños nanométricos que representan el inicio de la nucleación de los cristales del esmalte dental**. Esta imagen fue observada muy cercana a la zona número 5. Como puede verse en la figura 4.25, las dimensiones de los cristales del esmalte dental son muy pequeños, del orden de nanómetros y para poderlos observar en detalle se requiere una mayor resolución; es decir, es necesario utilizar la microscopía electrónica de alta resolución.

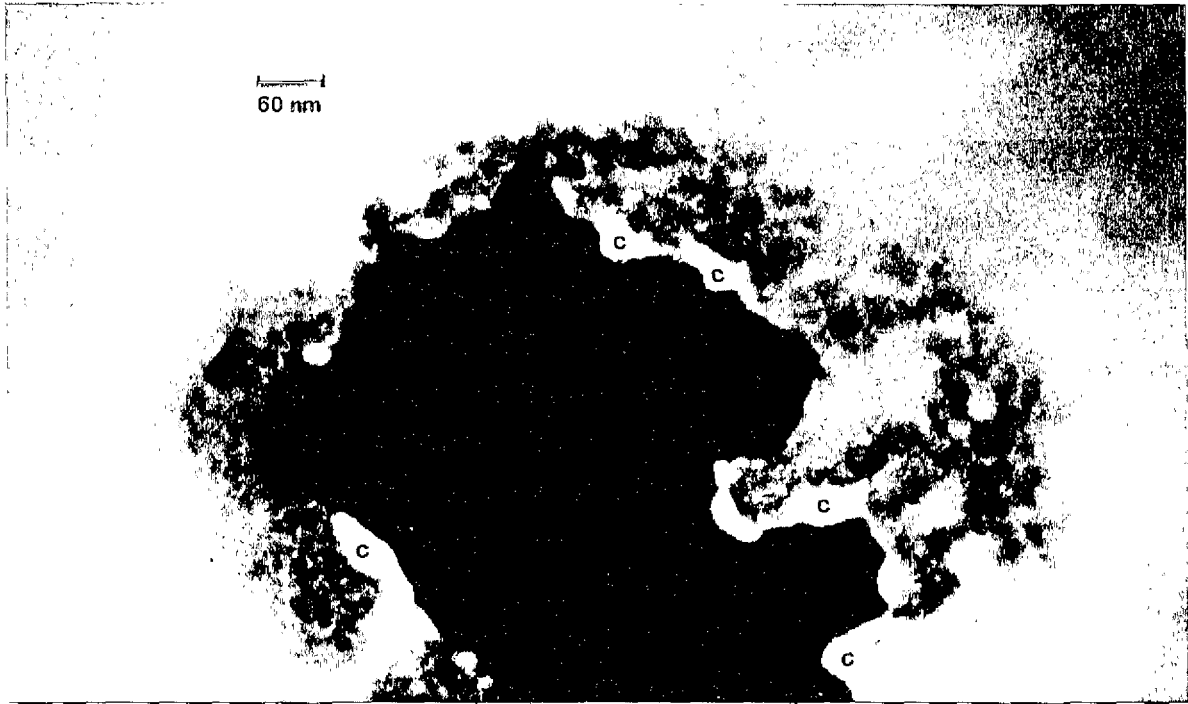


Figura 4.25. Micrografía de MET en campo oscuro de los cristales de esmalte (C). En este modo de operación del MET los cristales son todos los puntos brillantes que se encuentran alrededor del orificio oscuro. Obsérvese las dimensiones que presentan: son, en promedio, de décimas de nanómetros.

4.5. Microscopía de Alta Resolución

Utilizando la microscopía electrónica de alta resolución se observan los cristales a resolución atómica. Las áreas como la mostrada en la figura 4.25 fueron las adecuadas para la observación por MET de alta resolución. En la figura 4.26-A se muestran dos cristales al nivel atómico CE y C. Estos cristales presentan dimensiones nanométricas, entre 20 nm de espesor y 60 nm de longitud aproximadamente. Vemos cristales o en el momento de nucleación, en los cuales se puede observar un arreglo casi hexagonal en ambos cristales.

La figura 4.26-B muestra otros cristales durante la nucleación. En esta imagen el arreglo se ve diferente, al presentado por los cristales mostrados en la figura 4.26-A, como en forma de gota o como si se fueran a fusionar después estos cristales para crear uno más grande.

En la figura 4.27 se observan cristales que presentan un arreglo hexagonal que además está curvados; es decir, en (A) tenemos varios cristallitos del esmalte formando lo que vendría siendo una fibra, cristales en forma de aguja o un listón como le hemos llamado en la sección anterior. También es interesante hacer notar que se observa el contraste de la línea oscura en la amplificación de la figura 4.27-B. Entonces, podemos decir en este momento, que en esta imagen se observa la nucleación y el crecimiento de los cristales del esmalte dental.

El cristal mostrado en la figura 4.26 con las letras CE ha sido procesado computacionalmente, de tal manera que tengamos una mejor imagen con menor ruido y mayor información.

Ésta se presenta en la figura 4.28. Es interesante notar en esta imagen la presencia de dislocaciones y varias fallas de apilamiento en la unión de dos partículas que conforman el cristal.

En la figura 4.29 se muestra lo que se buscaba como objetivo del presente trabajo de tesis: la obtención y observación de cristales con la presencia de la línea oscura central en su estructura. La flecha en la figura 4.29 la detecta. Aquí se muestra la forma en que crece el cristal: en forma

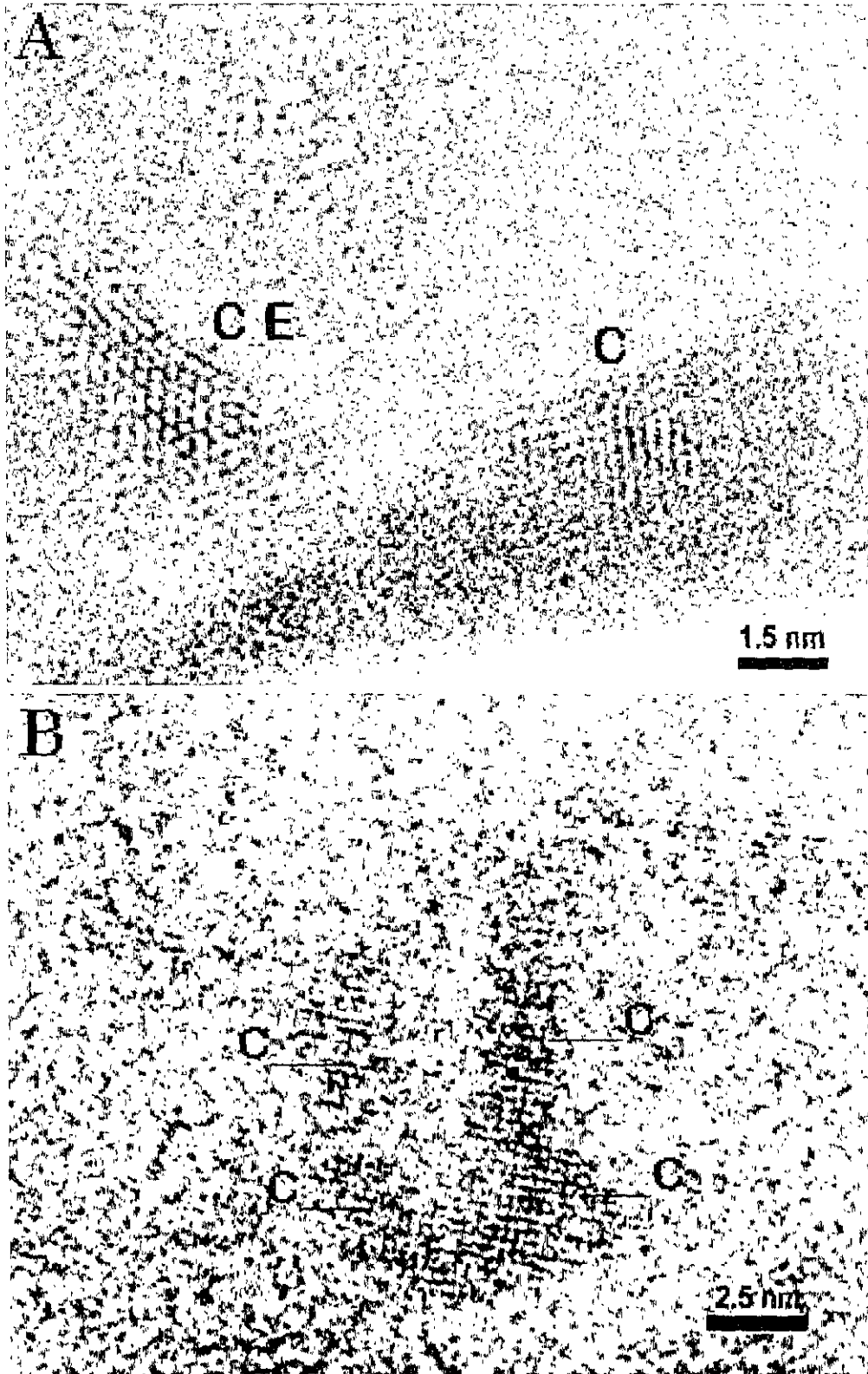


Figura 4.26. Micrografía de MET en alta resolución de los nanocristales observados en la figura 4.25. La estructura de la partícula (C) no está tan definida como la partícula (CE) la cual presenta un arreglo hexagonal. B) Partículas que presentan un arreglo cuadrado siguiendo un patrón en forma de gota.

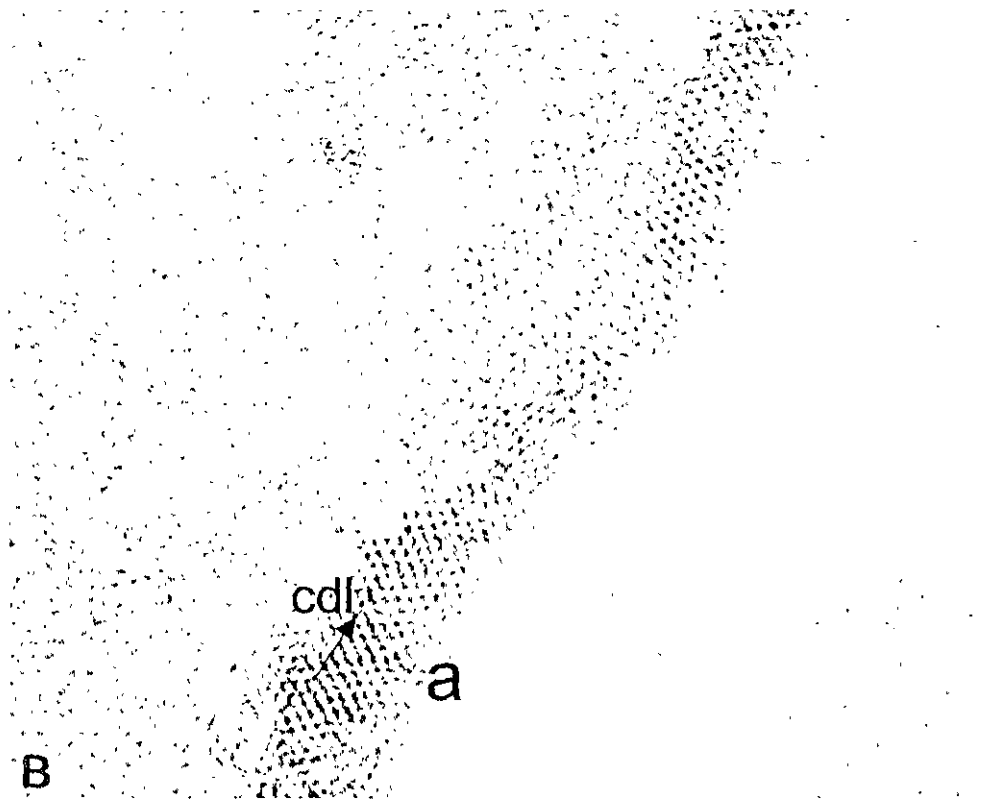
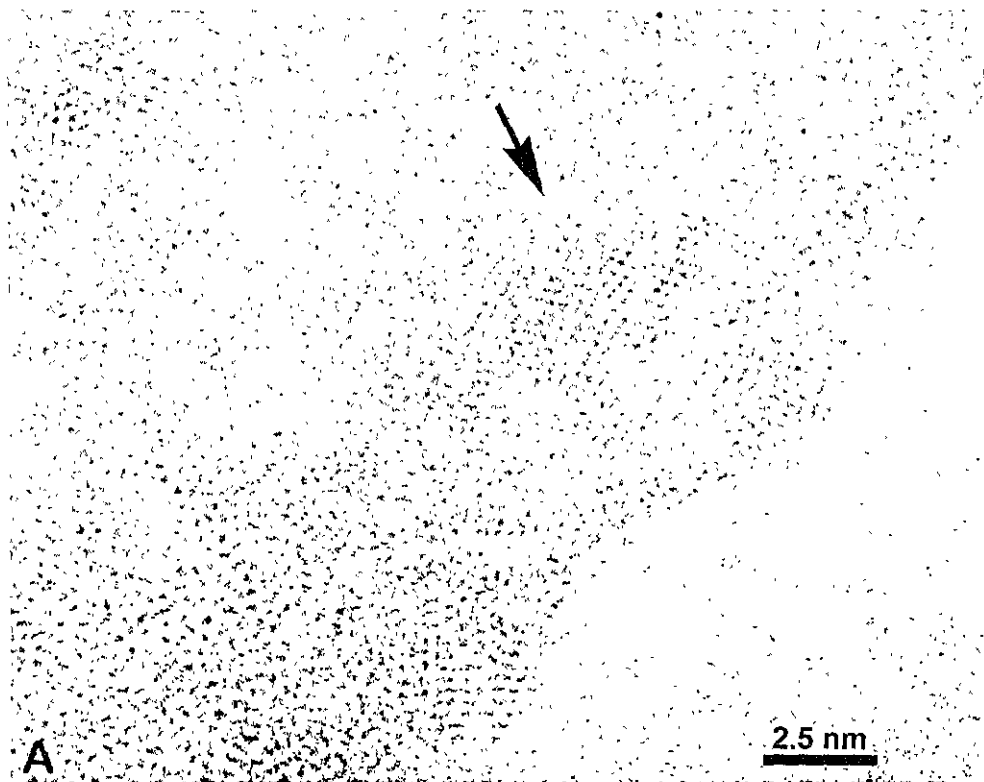


Figura 4.27. Micrografías de MET de alta resolución de los nanocristales observados en la figura 4.25. A) La **flecha** indica la nucleación y el crecimiento de los cristales. B) Amplificación de la partícula que presenta el contraste de la línea obscura central, **flecha** entre las letras **cdl** y la letra **a**.

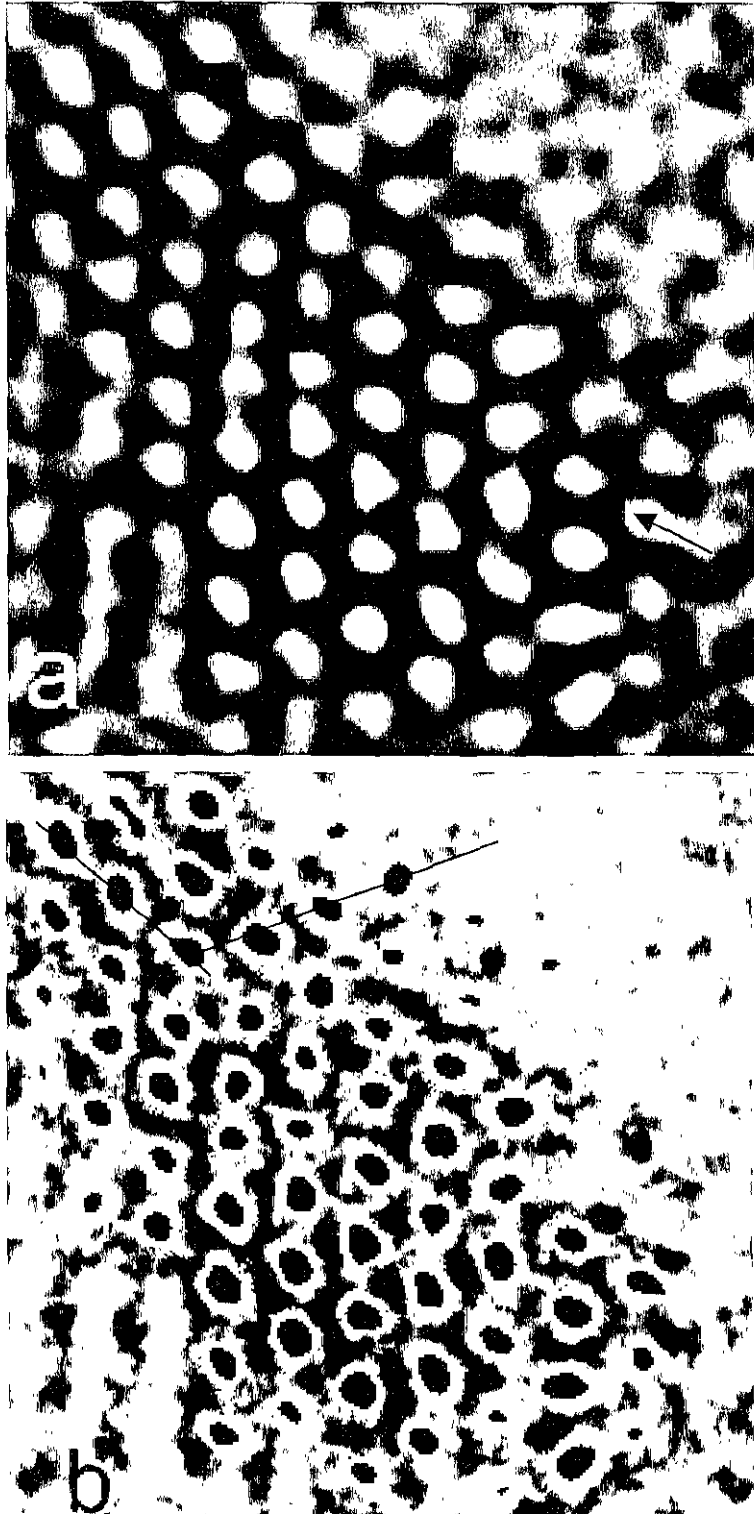


Figura 4.28. Imágenes de MET de alta resolución digitalizadas del cristal mostrado como (CE) en la figura 4.26 **a)** Zona ampliada donde no se presenta defecto excepto por la curvatura de las posiciones atómicas a lo largo de la dirección indicada por la flecha; **b)** imagen a menos ampliación donde se presenta con dos líneas la unión de al menos dos partículas que conforman el cristal.

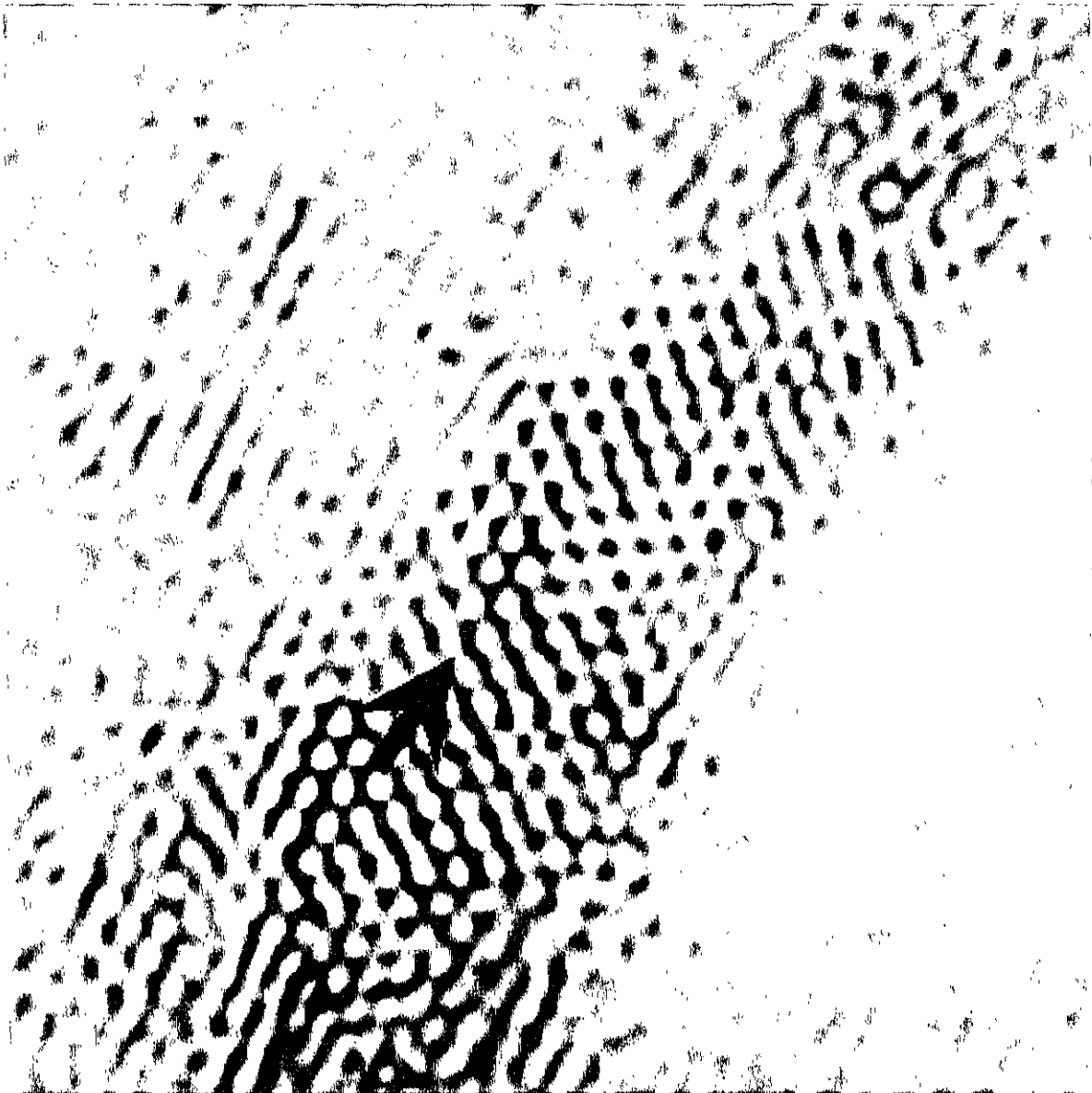


Figura 4.29. Micrografía digitalizada de MET de alta resolución de la partícula presentada en la figura 4.27b que muestra la línea oscura indicada con la *flecha*.

piramidal. Es decir, los átomos se van apilando de tal manera que se forman las pirámides ya reportadas en la literatura. Es de notarse en la figura 4.29 que todas las características estructurales reportadas para un cristal de esmalte dental humano son observadas aquí. En principio, no se observan defectos estructurales a través de la línea obscura mostrándose un buen ajuste atómico entre una y otra parte del cristal a pesar de la presencia de la línea. Además se demuestra que la curvatura que presenta el cristal se obtiene por medio de dislocaciones que se encuentran dentro de la estructura de uno y otro lado de la línea obscura, pero no a través de la línea obscura.

4.6. Microanálisis químico (EDS) de la línea oscura en cristales de esmalte de ratón adulto.

Para examinar los cambios químicos, y principalmente en y alrededor de la línea oscura en diferentes áreas de los cristales del esmalte, se utilizaron cristales de esmalte maduro, el cual se pulverizó y el polvo se colocó en una rejilla de cobre previamente cubierta con colodión y una capa de carbón para mayor resistencia.

Los cristales de esmalte de ratón adulto se observaron por MET, localizándose la presencia de la línea oscura central como se muestra en la figura 4.30. Se realizó el microanálisis a lo largo del cristal tal y como lo muestra la figura 4.31. Las técnicas de estudio fueron a través de MET de alta resolución y la técnica de EDS de microanálisis de rayos X característicos en conjunto con la técnica de nano difracción, que permite enfocar el haz electrónico en un área circular con un diámetro de aproximadamente 10 nm.

El análisis químico se obtuvo en diferentes posiciones en varios planos del cristal, con especial interés en la presencia de la línea oscura central (figura 4.31). La zona analizada en la CDL, no mostró diferencias significativas en las posiciones atómicas en comparación con el resto del grano, pero tuvo mayor cantidad de calcio (tabla 1V.5). Como se puede ver la concentración de Ca/P varía considerablemente dependiendo del punto analizado (tabla 1V.5).

Se encontraron diferencias en el cociente en Ca/P desde 0.68 a 1.77 en porcentaje atómico de sus centros hacia el exterior y sobre la CDL. Sin embargo del lado izquierdo el cociente fue de 1.77, mientras que del lado derecho de la CDL fue de 1.35. Por otro lado en el cristal mismo el cociente Ca/P fue de 0.68 y 1.0. Todos estos porcentajes son completamente diferentes de aquellos en HA pura, que es de 1.67.

Antes de sacar una conclusión de este análisis debe tenerse en cuenta que éste fue realizado usando un haz electrónico con sección transversal de aproximadamente 10 nm. Este haz cubre, por lo tanto un área con 10 nm de diámetro, y esta es el área de la cual proviene la información del microanálisis.

La línea oscura tiene un espesor de aproximadamente 1.5 a 2 nm. De aquí que el análisis químico provenga de una zona que contenga no solo la

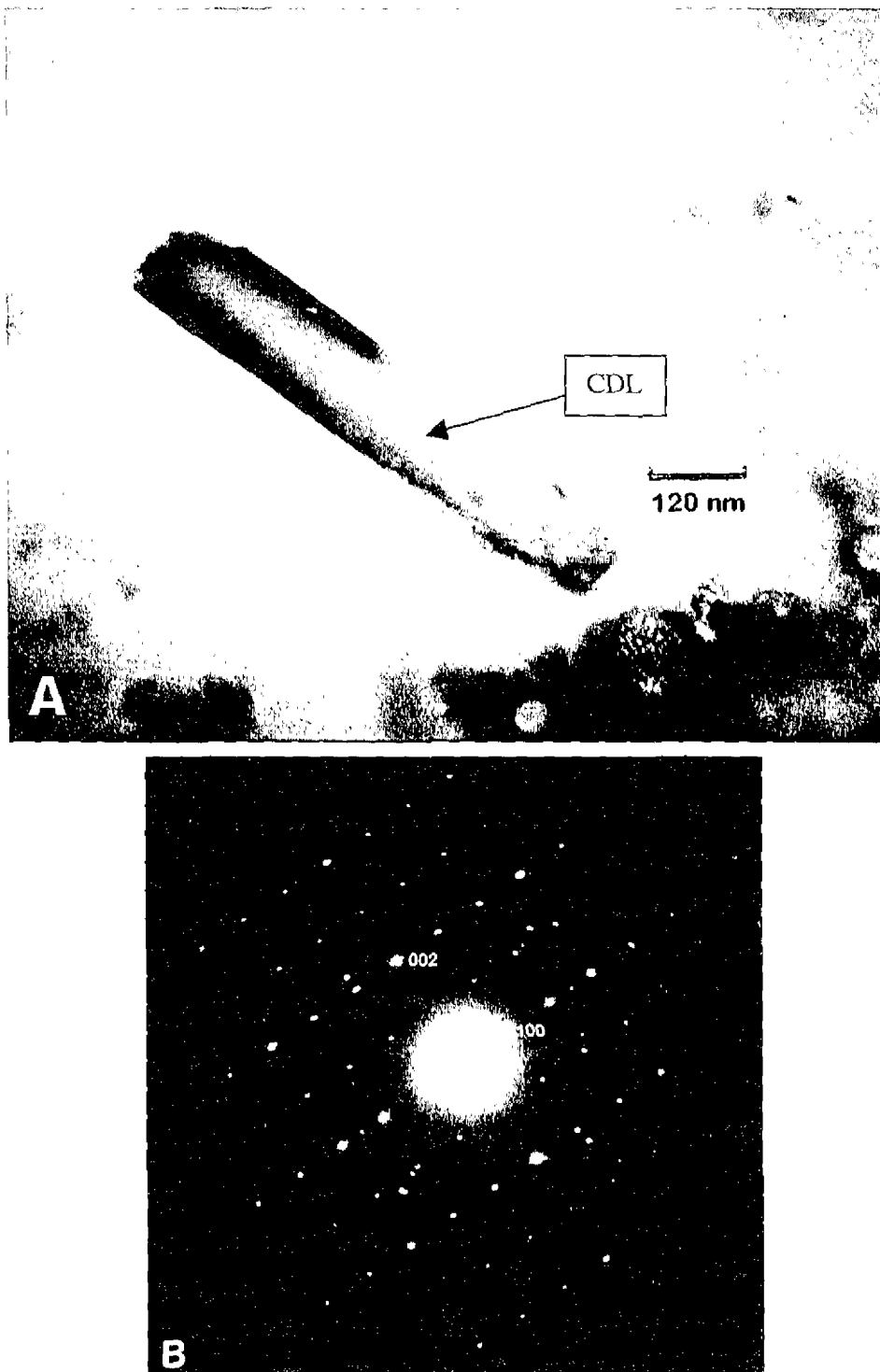


Figura 4.30-A) Micrografía de MET de campo claro de un cristal de esmalte de ratón adulto, se observa en el centro la CDL. B) Patrón de difracción de electrones del cristal anterior, confirmando que se trata de HAp, en la dirección $[01\bar{1}0]$. Compare este patrón con el mostrado en la figura 4.19.

línea oscura, sino también parte del cristal. Esto en el caso de los análisis obtenidos para los sitios mostrados en las figuras 4.31a y b; en el caso de los mostrados en las figuras 4.31c y d, es muy probable que la zona de análisis incluya la interfase del cristal con la parte orgánica e inclusive podría incluir parte de otro cristal. De aquí las variaciones obtenidas para los valores de Ca/P.

Sin embargo y a pesar de lo expuesto con respecto a las condiciones experimentales, es imposible pasar por alto la variación que se presenta en los valores de Ca/P. Aún con las limitaciones técnicas que se presentaron es claro que Ca/P no es constante y que, dependiendo de la posición a lo largo del cristal, presenta valores diferentes.

A lo largo de la línea oscura (figura 4.31, posiciones a y b) el valor obtenido para Ca/P fue 1.77 y 1.35; mientras que supuestamente en las áreas a los lados de la línea el valor fue de 0.68 y 1, lo cual es probable que incluya partes orgánicas, por lo tanto la concentración Ca/P disminuya y aumente el del C y O, aunque esto no es lo reportado en la figura 4.31. Además, la señal de C también proviene de la capa que recubre la superficie del esmalte de acuerdo al procedimiento experimental que se siguió para preparar la muestra para su observación por MET.

Si tomamos en cuenta los valores de Ca/P reportados en la tabla 1V.5, diríamos que existen varios compuestos de la familia de los fosfatos cálcicos en el esmalte dental. La brushita (fosfato hidrogenado de calcio dihidratado u ortofosfato hidrogenado de calcio dihidratado $\text{CaHPO}_4(\text{H}_2\text{O})_2$), por ejemplo, presenta una relación Ca/P de 1 al igual que la monetita sintética (fosfato hidrogenado de calcio $\text{Ca}(\text{HPO}_4)$). Sin embargo la celda unitaria de la brushita es monoclinica (con parámetros de red $a=0.58$, $b=1.52$ y $c=0.62$ nm con $\beta=116^\circ$) y la de la monetita es triclínica (con parámetros de red $a=0.69$, $b=0.66$ y $c=0.69$ nm, con $\alpha=96.34(2)$, $\beta=103.82(2)$, $\chi=88.33(2)$). Además si estas estructuras están presentes deberían ser fácilmente detectadas por MET de alta resolución; lo cual no ha sido así.

Por otro lado, valores de Ca/P de 1.3 y 1.5 nos llevan a los correspondientes del fosfato octocálcico (1.33) y de la Whitloquita (ortofosfato beta cálcico $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). El fosfato octocálcico presenta una celda triclínica

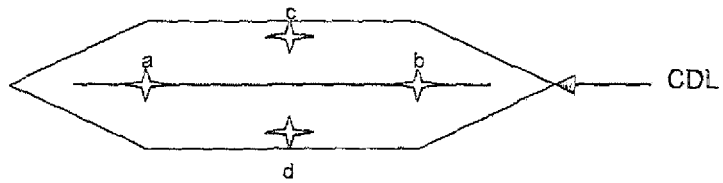


Figura 4.31 Representación esquemática de los diferentes puntos en donde se obtuvieron los espectros de EDS y cuyos resultados son mostrados en la tabla IV.5.

Tabla IV.5. Valores de Ca/P, tanto en Wt% y At%, correspondientes a los espectros de EDS de diferentes puntos mostrados en la figura 4.31.

Sitio de análisis fig. 4.30	Ca/P Wt %	Ca/P At %
A	2.30	1.77
b	1.75	1.35
c	0.88	0.68
d	1.28	1

$a=1.98$, $b=0.96$ y $c=0.68$ nm, con $\alpha=89.28$, $\beta=92.22$, $\chi=108.95$) y la whitloquita puede ser hexagonal o monoclinica (hexagonal; $a=1.04$ y $c=3.73$ nm; con $\chi=120$; monoclinica, $a=2.28$, $b=0.99$ y $c=1.71$ nm).

Sin embargo, ya ha sido demostrado que la estructura de la hidroxiapatita es aquella que mejor ajusta los resultados estructurales y químicos del esmalte dental. Y se ha propuesto que el fosfato octocálcico es el adecuado para interpretar la estructura de la línea oscura.

4.7. Simulación computacional de la línea oscura.

Los resultados de la sección anterior muestran que el cristal del esmalte es hidroxiapatita, mientras que algún fosfato cálcico diferente, tal como el fosfato octocálcico, es el que se presenta como línea oscura.

Se ha sugerido que la hidroxiapatita y el fosfato octocálcico pueden formar una interfase altamente coherente y que, por esta razón, la hidroxiapatita puede crecer en forma epitaxial a partir de una capa de fosfato octocálcico (Brown 1962, 1979; Nelson 1986). Por lo tanto se ha sugerido que la línea oscura se produce durante la nucleación del cristal del esmalte cuando un templete de fosfato octocálcico es usado para crecer la hidroxiapatita del esmalte (Iijima, 1992).

A partir de estas ideas, y tomando en cuenta los resultados de las secciones anteriores, proseguimos a crear un modelo de la línea oscura para comparar sus características con las reportadas.

Para el modelo de la CDL, se usaron dos interfases de HAP-OCP de acuerdo al modelo de Brown con solamente una celda unitaria de OCP en medio (figura 4.32). Por lo tanto de acuerdo con este modelo, el ancho de la CDL debe estar en el rango de 1.85 nm a 2.59 nm, y esto produciría un cambio de 0.23 nm entre el plano $\{1010\}$ de la HA de un lado y al otro de la CDL.

Una vez formado el modelo se llevó a cabo la simulación de las imágenes de MET en la computadora, utilizando para esto el programa de simulación de imágenes MACTEMPAS. Las imágenes obtenidas, para diferentes valores de desenfoque y con un espesor de 4.5 nm, son mostradas en la figura 4.33.

Analizando la figura 4.32 se observa que no se obtiene un crecimiento epitaxial y una interfase altamente coherente entre la HAP y el OCP. Como lo indican para el caso de la línea oscura los resultados experimentales, la interfase fue formada por la mitad de la celda unitaria de la HA y una celda unitaria de OCP y después de la relajación del sistema de interfase, el ángulo entre a_{HA} y a_{OCP} no es de 132° sino de aproximadamente de 129° . Más aún se encontró que los planos (0001) de HA y (001) de OCP no son coplanares.

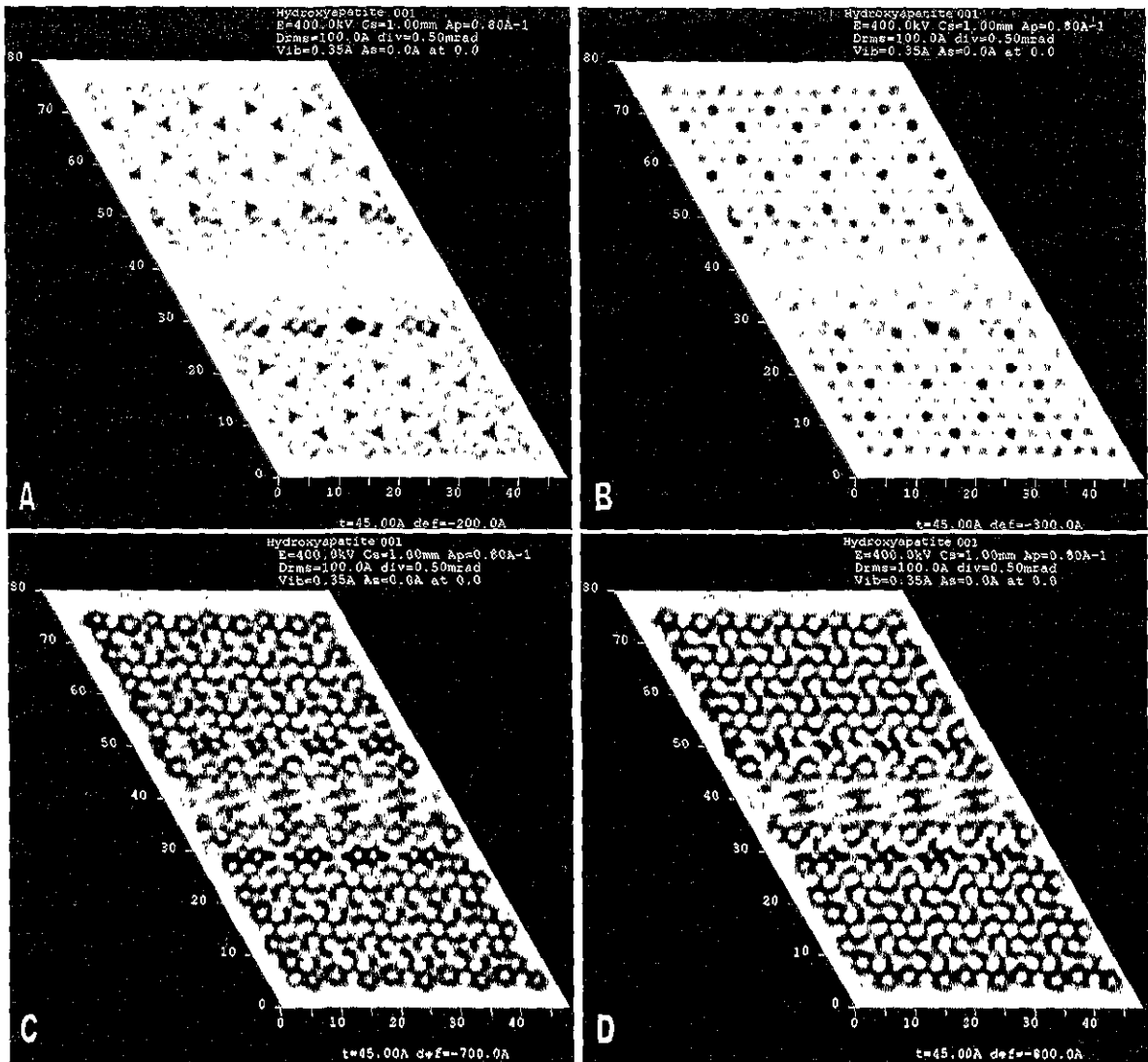


Figura 4.33. Imágenes simuladas computacionalmente a partir del modelo presentado en la figura 4.32. El espesor del cristal se supuso de 4.5 nm, la aberración esférica de 1.0 mm y el voltaje del microscopio electrónico de 400 KV. Las imágenes corresponden a los desenfoques de 20 nm (A), 30 nm (B), 70 nm (C) y 80 nm (D). Si se observan las imágenes en incidencia rasante, se observará el corrimiento que se produce por la existencia de $S = 0.23$ nm mostrado en la figura 4.32.

Por lo tanto, el modelo generado no reproduce completamente las observaciones experimentales. Nótese que para que se pueda dar este modelo, el eje a_{HAP} de la celda de la hidroxiapatita debe ser paralelo al eje b_{OCP} de la celda del OCP. El corrimiento S generado entre los planos de la HAP a ambos lados de la línea oscura es un generador de defectos cristalinos, tales como dislocaciones y fallas de apilamiento. Estos defectos estructurales, al menos dentro de los límites de resolución de los MET utilizados, no han sido observados ni reportados.

5. - Discusión.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis pueden calificarse de excelentes. Trabajando con incisivos mandibulares de fetos de ratón, y utilizando técnicas de microscopía electrónica y análisis de rayos X, se observó y analizó la amelogénesis en su estadio secretorio, la nucleación y el crecimiento de los cristales del esmalte. Se observó la presencia de la línea oscura en cristales de dimensiones nanométricas y se estudiaron sus características. A partir de estos, se sometió a prueba el modelo del fosfato octocálcico de Brown para la línea oscura, quedando la siguiente propuesta.

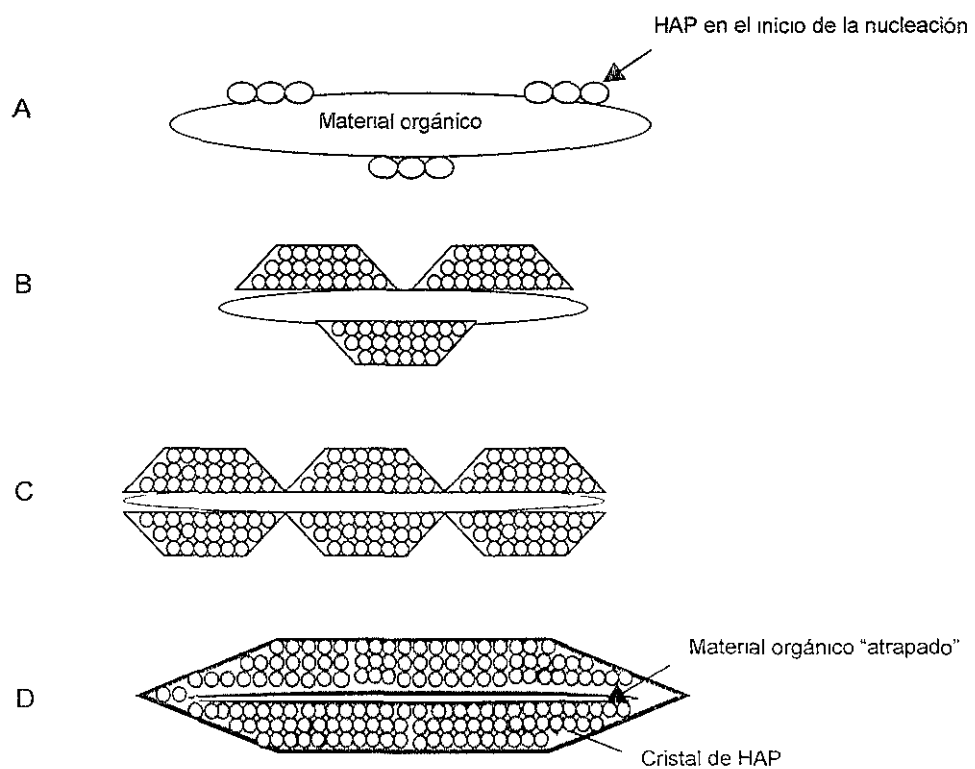


Figura 5.1. Modelo de nucleación y crecimiento propuesto a partir de los resultados del presente trabajo de tesis. A) El material orgánico de las agujas funcionan como templete para la HAP. B y C) El crecimiento "piramidal" de la HAP se da también hacia "adentro" del material orgánico. D) Restos de material orgánico queda atrapado en el centro del cristal de HAP formando así el cristal del esmalte.

5.1. Microanálisis en los incisivos mandibulares de fetos de ratón hembra de 19 días.

Durante el presente trabajo de tesis se realizaron estudios en dos grupos de incisivos mandibulares de fetos de ratón de 19 días de gestación, con una diferencia de 12 horas entre uno y otro, en los cristales de reciente formación con forma de agujas. En toda la zona celular los elementos presentes C, O, P, y Cl son apropiados a la región estudiada debido a las reacciones del proceso celular. El área que corresponde a los primeros depósitos de iones fue observada primero como una interfase. Las zonas oscura y clara alrededor del proceso de Tomes presentaron iones de Ca, pero en diferentes concentraciones según el sitio de análisis.

El promedio de la relación Ca/P fue de 0.24 indicando el inicio de los primeros depósitos de iones. La zona principal de depósito de Ca fue identificada como Zona Clara donde la relación Ca/P fue de 1.126. Esta zona sugiere un mayor depósito de iones formadores de los cristales, sin embargo el patrón de difracción de electrones solo mostró un amorfo.

La región de la interfase con la dentina tuvo una relación Ca/P menor que la encontrada en la zona blanca en el tejido formador de esmalte y fue de 0.615, como resultado de la menor cantidad de cristales en este tejido. Aunque el patrón de difracción de electrones mostró la presencia de material más mineralizado.

Durante el análisis por EDS en la zona incisal de los dientes preparados a punto crítico, los elementos encontrados en la zona incisal más externa fueron siempre los mismos, pero la relación Ca/P fue menor de 0.4; hacia la zona media incisal la relación Ca/P fue de 0.85 a 1.16. Más aún se encontraron pequeñas cantidades de Na, Al, Mg y Cl.

Los elementos asociados con cristales de apatita son de interés debido a sus efectos en la formación y estabilidad. Se han clasificado algunas propiedades de algunos elementos, en el aluminio sin ningún efecto, Cl como cariogénico, Mg cariostático y cariogénico, el Na, no está clasificado. Estos elementos se conocen que interfieren en la formación de la mineralización de apatita in vitro (LeGeros, 1991). La incorporación de Mg en la apatita sintética es muy limitada (~0.4wt% Mg), pero

aumenta por la incorporación simultánea de F⁻ ó CO₃. Más aún, la incorporación simultánea de CO₃²⁻ y Mg²⁺ en la apatita causa efectos sinérgicos en la cristalinidad de la apatita. En la formación de la apatita se discrimina fuertemente la incorporación de Cl⁻ a favor de F⁻ cuando están simultáneamente presentes. Con el Na⁺, siendo similar en tamaño al Ca²⁺, no se espera que cause ningún efecto en los parámetros de red. La incorporación de Na es aumentada con la incorporación de CO₃.

Hay muchas referencias sobre la participación de estos iones en el esmalte maduro, **pero no durante la nucleación de los cristales de esmalte**, en el principio de su depósito durante el estadio secretorio.

Aún cuando se tratara de la formación de esmalte aprismático, la nucleación se lleva a cabo, a pesar de que en esta primer capa de 30µm de espesor (según Gómez de Ferraris, en los dientes primarios), su tipo de agrupación solo sea perpendicularmente a la superficie y paralelos entre sí. Se ha sugerido que este tipo de esmalte es el resultado de la ausencia o poco desarrollo de los procesos de Tomes.

La formación de los cristales de esmalte comienza en el estadio secretorio de la amelogenesis; y en este estadio postmitótico, los ameloblastos secretan la matriz orgánica. A una distancia dada de la membrana ameloblástica apical empieza el proceso de mineralización. Durante el siguiente proceso de desarrollo, y hasta la maduración del esmalte, las fases mineral y orgánica presentan considerables cambios los cuales son controlados por la actividad celular de los ameloblastos.

5.2. Nucleación y crecimiento del esmalte.

Ya desde 1955 Carlström comenzó a estudiar los cristales de esmalte, a través de difracción de rayos x, como estructuras calcificadas, dando como resultado algunas descripciones cristalográficas. Posteriormente se hicieron otros estudios para ver las mediciones sobre anchura y espesor de los cristales de esmalte pero tales mediciones se hacían solamente con técnicas radiográficas, lo cual daba como resultado un gran error en dichas mediciones. Posteriormente, Nylen estudia los cristales y continua trabajando sobre medidas en anchura y espesor, pero haciendo uso de técnicas como la microscopía electrónica; observa la nucleación de los

cristales que se lleva a cabo en la vecindad de los ameloblastos y menciona ya la presencia de una línea densa, la línea oscura, observada bisectando los hexágonos a lo largo de su diámetro más ancho, pero pensando en que esto fuese un patrón de interferencia debido a una fase discontinua del cristal. Describe los cristales en una etapa temprana como cristales muy pequeños y en gran cantidad, y conforme se van alejando de los ameloblastos y su estadio de maduración avanza ya presentan forma de listones. Encuentra que conforme va aumentando la mineralización de los cristales los patrones de difracción presentan anillos delgados. Esto quiere decir que los cristales de hidroxiapatita comienzan a crecer mientras que si es menos mineralizada los discos no se pueden resolver visualmente ya que los cristales presentan apenas dimensiones nanométricas. Esto último es el caso del presente trabajo.

Miake et al, analizando eventos tempranos durante del crecimiento del esmalte en la mineralización del esmalte porcino, el cual es semejante al del humano, encontró que este crecimiento fue caracterizado por un crecimiento epitaxial de pequeñas unidades de apatita en las superficies laterales de las delgadas agujas o listones planos precipitados previamente. Después del crecimiento del esmalte, este listón plano es retenido como una línea central oscura del cristal. De estos resultados ellos concluyen que la mineralización inicial del esmalte comprende dos pasos: primero, la precipitación de las delgadas agujas o listones planos y luego el crecimiento epitaxial de los cristales de hidroxiapatita en la superficie de ese listón.

Los cristales de esmalte fetal aparecen sin estar cercanamente unidos y su distribución fue irregular.

Los espacios entre ellos se cierran a medida que va creciendo el cristal. Así las mediciones observadas en experimentos sobre espesor y anchura, nos muestran las medidas de los cristales y como van creciendo. A través de esos datos podemos observar que se trata de un proceso lento que se inicia en la nucleación de los cristales y dura hasta que el diente erupciona.

Esta forma de ver el proceso de nucleación y crecimiento conlleva a otra hipótesis del origen de la línea oscura, la cual ya ha sido propuesta por Reyes-Gasga et al.: la línea oscura es remanente de material orgánico que funciona como templete para que crezca sobre él la hidroxiapatita del esmalte. Esto concuerda mucho mejor con los resultados experimentales que sobre el tema se han publicado:

los patrones de difracción de los cristales incipientes en forma de aguja son casi amorfos. Esta es una prueba de la existencia en ese momento de mucho material orgánico, compuesto en su mayoría de proteínas. Durante el proceso de maduración, y como lo demuestran los resultados experimentales, y tomando en cuenta el espesor de la línea (aproximadamente 1.5 nm, Reyes-Gasga et al.) el material orgánico queda atrapado y es “encerrado” por la hidroxiapatita (figura 5.1).

En este contexto, la línea oscura que se observó (figura 4.29) es la prueba de que los listones, o cristales incipientes en forma de aguja, más pequeños son los primeros que se “cubre” de hidroxiapatita. Se esperaría, por lo tanto, que se observaran cristales de diferentes tamaños, aunque el mayor número de éstos fuese alrededor de un promedio, dependiendo del proceso de maduración que se observe.

Guy Daculsi y B. Kerebel por primera vez hacen la determinación a través del conteo de los planos de red, con la finalidad de medir el desarrollo y maduración de los cristales de esmalte, su anchura y espesor, estableciendo que efectivamente se trata de un proceso lento. Con el conteo de los planos de red demuestran aumentos en el espesor reportado sin cambios en la anchura durante el proceso de maduración. Sin embargo reportan a la línea oscura central como un fenómeno focal no visible a altos aumentos.

Cuisinier observa de entre los cristales en forma de agujas recién nucleadas que no existen ni dominios de tamaño nanométrico locales, ni líneas oscuras centrales, ni defectos estructurales. La ausencia de un defecto central y el espesor correspondiente a dos o tres celdas unitarias saca la hipótesis de la existencia de una semilla mineral localizada fuera del cristal de HAP. Comparó también la imagen experimental del cristal de esmalte fetal con imágenes calculadas por computadora para dos celdas unitarias de HA estequiométrica, con una buena correspondencia. Observándose tres sitios iónicos en ambas imágenes (A, B, C), en la imagen simulada de una celda unidad de HA observada a lo largo del eje c, el sitio A aparecía constituido por una columna de calcio 1, el sitio B por la asociación de calcio 11, oxígeno y columnas de fósforo y el sitio C, de una columna de iones OH⁻. Sin embargo no fue posible correlacionar las intensidades de las imágenes y su composición cuantitativa. La buena correspondencia entre las imágenes indica que en

este estadio de desarrollo la estructura de los cristales de esmalte fetal describe a los cristales en forma de aguja como template para los cristales de HAP.

5.3. Microanálisis de la línea oscura.

En los resultados por microanálisis de rayos X característico de la CDL se encontró gran variabilidad en la proporción Ca/P y no solamente en el análisis de diferentes puntos dentro del mismo cristal sino también en diferentes cristales de la muestra de esmalte.

Hasta entonces había 4 modelos sugeridos para explicar esta línea oscura central. El primero proponía la existencia de vacancias de aproximadamente 41 nm. El segundo dice que son fallas como resultado del vector un $1/4,0,0$. El tercer modelo que se debía a la incorporación de fosfato octocalcico en la apatita formando esta línea central en dirección 010 y plano 100, consistente de capas de calcio deficientes derivadas del fosfato octocalcico (esto es fosfatos y agua). La cuarta que son capas de calcio deficientes carentes de vectores de desplazamientos pero con vacancias que pudieran colapsar la estructura.

Entre las ideas sobre el origen de la CDL y tomando en cuenta los resultados experimentales, la que tenía más posibilidades de ser cierta es la que sugiere que se trata de un remanente de un fosfato de calcio usado para la nucleación y crecimiento de los cristales de hidroxiapatita del esmalte. Este fosfato de calcio se supone que es OCP. Este fosfato presenta un valor de Ca/P de 1.33, mientras que la hidroxiapatita tiene 1.67.

Por supuesto, muchos parámetros tienen que ser tomados en cuenta cuando la concentración química quiere ser medida usando técnicas de TEM y EDS. Uno de ellos es el proceso de daño, el cual ocurre cuando el haz electrónico ataca la muestra (Nelson, 1982).

Sin embargo, una conclusión importante del presente trabajo de tesis consiste en que, la zona de la CDL presenta una composición química diferente al cristal mismo. Todo esto da la idea de que las CDL y los cristales de esmalte tienen diferente composición química. También los resultados sugieren que la técnica

utilizada en este experimento no fuese el más apropiado para observar tal diferencia, y que se requieren equipos más modernos para permitir este tipo de análisis en un rango de 1 o 2 nm como máximo.

5.4. Esmalte Hidroxiapatita y fosfato octocálcico.

Desde un punto de vista estructural, se ha sugerido que el OCP y la HAP forman una interfase altamente coherente (Brown, 1962, 1979; Nelson, 1986; Iijima, 1992), debido a que algunos precipitados apatíticos contienen al azar capas de OCP y HA, en las cuales las capas individuales son de unas pocas celdas unitarias de espesor.

Al continuar los experimentos, Iijima sintetiza una mezcla de fosfato octocalcico y apatita en un sistema de formación de esmalte, en presencia de flúor, observando que cuando se forma inicialmente fosfato octocalcico a cierto espesor, hay un subsecuente crecimiento epitaxial de apatita en la formación de esmalte. Así propone un modelo donde la lámina de fosfato octocalcico y la de HA son paralelas al plano 100 de la apatita. Donde el eje c del fosfato octocalcico es paralelo al eje c de la apatita, el crecimiento de los cristales de la mezcla lamelar o laminar es principalmente en dirección del eje c, apoyando así la idea de que crecen en forma de listón dichos cristales.

Vale la pena notar que en el caso de que un cristal de HA contenga solamente una lámina de OCP, el espesor de esta línea en la imagen del TEM fue menor que una celda unidad de OCP (1.86 nm). Este resultado ha sido descrito (Iijima, 1992) con base en que una celda unidad de OCP puede ser análoga a una capa de HAP y a una capa de agua (Brown, 1962) y entonces, esto produce que una capa de OCP no pueda ser distinguida de la matriz de HAP. Más aún en el caso, de que el tamaño de la región de OCP es muy pequeño para dar signos claros de difracción. Esto podría hacer difícil detectar OCP en la CDL por métodos de difracción.

El crecimiento epitaxial de HA en el OCP representa un desajuste dimensional de 0.036 nm y esto podría inducir algunos doblamientos. Otros desórdenes cristalinos podrían ser concomitantemente inducidos como, dislocaciones por desajuste, esfuerzos por desajuste, fallas de apilamiento o maclas. Los defectos tales como las

dislocaciones favorecerían el crecimiento de los cristales creando más sitios de nucleación reactiva para las especies iónicas presentes en el volumen y así disminuir la supersaturación necesaria para el desarrollo del cristal.

Todo lo anterior sugiere que la hipótesis de la CDL es una capa de fosfato octocálcico no es del todo correcta. Sin embargo se acepta que para descalificarla completamente se requiere de observaciones experimentales adicionales. Lo que sí es un hecho, es el resultado de que la composición de la CDL y del cristal del esmalte dental no es igual.

Tenemos, por lo tanto, como resultado que todo parece indicar que la CDL es material orgánico remanente de la nucleación y crecimiento de los cristales del esmalte. Nuestros resultados fortifican esta hipótesis.

Epílogo.

A través de las micrografías por MET se puede observar que los cristales están distribuidos de manera irregular, aunque con una posible dirección preferencial (figuras 4.17, 4.18, 4.21 y 4.23). Dichas imágenes podrían hacernos pensar que los cristales parecen ser sometidos a grandes esfuerzos mecánicos, induciendo inclinaciones en las posiciones de éstos, o que las señales mandadas por las proteínas causaran este efecto al modificar el microambiente, produciendo la reducción, fraccionamiento o disolución de algunos, mismos que no sobreviven a dichos cambios. O tal vez sea ello lo que ocasiona mayor número de nucleaciones creándose una gran cantidad de cristales. Por otro lado, la literatura se menciona que entre los esfuerzos a que pueden ser sometidos los cristales y los cuales pudieran modificar la dirección de crecimiento de los cristales, fuesen en parte debido al tipo de presión en los cortes. Sin embargo, aunque la idea no se descarta, también se observan diferentes direcciones en los cristales de esmalte maduro, aún sin hacer el tipo de corte mencionado con ultramicrotomo.

El crecimiento de los cristales seguramente ocurre en tres etapas como ya Simmer et al lo proponen. Sin embargo, la formación de la semilla que él menciona como primer estadio posiblemente sea aún más compleja de lo que lo menciona. Luego de analizar los resultados aquí presentados, suponemos que la semilla o grupo

de iones que participan en la nucleación y crecimiento de los cristales posiblemente se agrupen en nanocristales de diferente composición debido a las condiciones de temperatura y pH del medio. Además de la presencia de las diferentes proteínas que pueden ser determinantes en la formación, detención o supresión del crecimiento de estos cristallitos. O bien puede ser que se lleve a cabo el agrupamiento en nanocristales con diferentes cantidades de estos iones, dando como consecuencia que estas uniones se den en diferentes conformaciones morfológicas (como aquellas que observamos en las figuras 4.26, 4.27, 4.28) para luego ir tomando dirección preferencial gracias a las señales que reciben de las proteínas.

Analizando los resultados, la precipitación de los elementos de nucleación, muestran en las micrografías experimentales mallas o redes cristalinas diferentes con distintas formas dando la impresión de que dos redes muy cercanas establecieran puentes o bandas entre ellas, para posteriormente unirse y configurar los cristales definitivos. Las formas observadas fueron triangulares, ovoideas como gotas, listones curvados o simplemente siguiendo una línea. En una de ellas (figura 4.27-B) se pudo distinguir claramente la línea oscura central.

CONCLUSIONES.

La nucleación de los cristales de esmalte de ratón se lleva a cabo, durante el período secretorio hacia el final del día 19 de gestación, iniciando el depósito de iones minerales, para después irse agregando otros iones en los extremos y crecer. Este crecimiento se dá en forma “piramidal”, colocándose los átomos sobre los ya depositados.

Se observaron concentraciones de Ca, P, O, C, Al, Mg, y en especial la presencia del Na y el Cl. La concentración de estos últimos posiblemente se deba al tipo de preparación de la muestra, pues el amortiguador en donde se diluye el fijador, contiene compuestos como el cloruro de sodio y el cloruro de magnesio. También pudiera ser que formaran parte de la estructura, o bien que fuese un requerimiento metabólico de canales de membrana específicos, dependientes de Cl, ya que también se le encuentra en esmalte maduro.

Al tratar de correlacionar las imágenes experimentales de MET de alta resolución y el modelo de la línea obscura generado a partir de los datos de Brown, el OCP no empata con la HAP y no reproduce completamente los resultados experimentales que se tienen de la CDL.

La presencia de los cristales incipientes en formas de agujas, y la observación de patrones de difracción electrónica casi amorfos, indican que la nucleación de los nanocristales de HAP del esmalte se dá, usando las agujas como templetas para que se depositen los cristales de HAP.

El hecho de haber encontrado un más alto valor en la relación Ca/P alrededor de la CDL, que en el resto del cristal, sugiere la posibilidad de que se trate de algún fosfato de calcio. Sin embargo otro tipo de experimentos tendrá que llevarse a cabo para dilucidar de mejor manera esta hipótesis.

De esta manera, se propone que la estructura de la línea obscura es un remanente del material orgánico que formaba a las agujas.

PROPUESTAS A FUTURO.

En realidad son muchas las propuestas para realizar experimentos con las técnicas con que nos hemos apoyado, pero son aún más aquellas que se podrían realizar usando técnicas adicionales. En este caso sólo mencionaré algunas propuestas relacionadas con el tema que ocupó el estudio de esta tesis.

Por ejemplo, además de continuar con el estudio teórico de estos cristales, analizando las imágenes de alta resolución o utilizando simulación de imágenes; podría llevarse a cabo algunos experimentos, para demostrar la validez de la hipótesis que ahora se propone sobre la estructura y composición de la línea oscura. Existe la necesidad de preparar otro tipo de muestras, como por ejemplo con técnicas de inmunohistoquímica y se requerirían anticuerpos específicos.

Se podrían tratar algunos otros aspectos como calcular los potenciales de amarre, o bien, poner un potencial determinado y un número de partículas determinado y dejar que evolucionen y que se genere una estructura. Eligiendo estructuras más estables en esas condiciones, correr un programa para que se clasifique y saber de cual estructura se trata ya que pueden dar diferentes estructuras con la misma energía. Una vez definida la estructura, llevar a cabo algún experimento para simular la estructura definida lo más parecido al esmalte dental.

BIBLIOGRAFIA.

Alcántara Rodríguez C. M.: *Caracterización del esmalte dental por Microscopía electrónica de transmisión*. Tesis de licenciatura Facultad de Odontología. UNAM. 1993.

Aoba T.: *The enamel fluid in the early secretory stage of porcine Amelogenesis: chemical composition and saturation with respect to enamel mineral*. *Calcif Tissue Int.* 1987; 41: 86-94.

Arsenault AL., Robinson BW. *The dentin enamel junction: a structural and microanalytical study of early mineralization*. *Calcif Tissue Int.* 1989; 45: 111-121.

Berkovitz, B.K.B., Holland, G.R., Moxham. B.J.: *Colour Atlas & Textbook of Oral Anatomy, Histology and Embryology*. Ed. Mosby Year Book. 1992.

Bertin EP. *Principles and practice of X-Ray Spectrometric Analysis*. Plenum Press New York. 1975.

Brés E. F.: *Theoretical detection of a dark contrast line in twinned apatite biocrystals and its possible correlation with the chemical properties of human and enamel crystals*. *J. Biophys.* 1986; 50: 1185-1193.

Brés E.F., Barry J.C., and Huchison, J.L.: *A structural basis for the carious dissolution of the apatite crystals of human tooth enamel*. *Ultramicroscopy*. 1984; 12: 367-372.

Brés E.F., J.C., Voegel and Frank M.: *High-resolution electron microscopy of human enamel crystals*. *J. of Microscopy*. 1989; 160 (2): 183-201.

Brookes S.J., Robinson, C., Kirkham J. and Bonass W.A.: *Biochemistry and Molecular Biology of Amelogenin Proteins of Developing Dental Enamel*. *Archs. Oral Biol.* 1995; 40: 1-14.

Brown W.E., Schroeder L. W., Ferris J.S.: Interlayering of crystalline octacalcium phosphate and hydroxylapatite. *The Journal of Physical Chemistry*. 1979; 83: 1385-1388.

Brown W. E., Smith J. P., Lehr J. R., Frazier A. W.: *Octacalcium Phosphate and hydroxyapatite*. *Nature*. 1962;196: 1048-1055.

Bucio G. L. Instituto de Física UNAM. Comunicación personal.

Burdairon G.: *Manual de Biomateriales Dentarios*. 1^{era}. Ed. Masson S. A., Barcelona. 1991. P. 7-18.

Catalanos, J. A., Palmon, Y., Burteinand D., and Deutsch G.: *Amino acid sequence of mayor human amelogenin protein*. *J. Dent. Res*. 1993; 72: 1566-1572.

Cev G., Cevc P., Schara M., Skaleric U.: *The caries resistance of human teeth is determined by the spatial arrangement of hydroxyapatite microcrystals in the enamel*. *Nature*. 1980; 286: 425-426.

Chickerur NS, Tung MS, Brown W E: *A mechanism for incorporation of carbonate into apatite*. *Calcif. Tissue Int*. 1980; 32: 55-62.

Cowley J.M. *The electron optical imaging of crystal lattices*. *Acta Crystallogr*. 1959; 12: 367-375.

Cuisinier F. J. G., I. *Human Amelogenesis 1. High resolution electron microscopy study of ribbon like crystal*. *Calcif. Tissue Int*. 1991; 51: 259-268.

Cuisinier F. J. G., Steuer P., Senger B., Voegel J. C., and Frank R. M.: *Human Amelogenesis 1: High Resolution Electron Microscopy Study of Ribbon-Like Crystals*. *Calcif Tissue Int* (1992) 51: 259-268.

- Cuisinier F. J. G., Voegel J. C., Yacamán J., Frank R. M.: *Structure of initial crystals formed during human amelogenesis*. Journal of Crystal Growth. North-Holland. 1992, 116: 314-318.
- Daculsi G. and Kerebel B.: *High-Resolution Electron Microscope Study of Human Enamel Crystallites: Size, Shape and Growth*. J. Ultrastructure Res. 1978; 65. 163-172.
- Daculsi G., Menanteau J., kerebel L.M., and Mitre D.: *Length and shape of Enamel Crystals*. Calcif. Tissue Int.1984; 36: 550-555.
- Davis Walter L.: *Histología y embriología bucal*. 2da. ed. México. Interamericana.1990
- Deakins M., Volker JF.: *Amount of organic matter in enamel from several types of human teeth*. J Dent Res. 1941; 20: 117-121.
- De Groot, K., Klein C.P.A.T., Wolke J.G.C. y Blicck J.M.A., Hogervorst.: *Chemistry of calcium phosphate ceramics. Handbook of bioactive ceramics*. CRC Press. Boca Raton. 1990; 11.
- Díaz Estrada J. R.: *Preparación y Caracterización de Prótesis de Hidroxiapatita para globo ocular*. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM, 1998.
- Eanes, F. D.: *Enamel Apatite: Chemistry, structure and properties*. J. Dent. Res. 1979; 58 (B): 829-834.
- Eberhart J. P.: *Structural and chemical analysis of materials*. Edit John Wiley & Sons, England. 1991.
- Fincham A. G., Moradian-Oldak, J., Simmer, J. P., Sarte, P. E., Lau,E. C., Diekwisch, T. and Slavkin, H. C.: *Self-assembly of a recombinant amelogenin protein generates supramolecular aggregates*. J. Struct. Biol. 1994; 112: 103-109.

Fincham A. G., Moradian-Oldak J., Diekwisch T. G. H., Lyaruu D. M., Wright J. T., Bringas P. Jr., Slavkin H. C.: *Evidence for amelogenin "nanospheres" as functional components of secretory-stage enamel matrix*. Journal of Structural Biology. 1995; 115: 50-59.

Fowler Bo, Moreno EC, Brown WE: *Infrared spectra of hydroxyapatite octacalcium and pyrolyzed octacalcium phosphates*. Arch. Oral. Biol. 1966; 2: 447-492.

Frazier P. D.: *Adult Human Enamel: An Electron Microscopic Study of Crystallite Size and Morphology*. J. Ultrastructure Research. 1968; 22:1-11.

Fulmer M., Martín R. I. y Brown P. W.: *Formation of calcium deficient hydroxyapatite at near – physiological temperature*. J. Mater. Sci.; Materials in Medicine. 1992; 3: 299-305.

Glimcher M.J., Brickey-Parsons D., and Levine P.T.: *Studies of enamel proteins during maturation*. Calcif. Tissue Res. 1977; 24:259-270.

Gómez de Ferraris M. E., Campos Muñoz A.: *Histología y Embriología Bucodental*. Ed. Panamericana, Madrid España. 1999. P.229-260.

Grove, C.A.; Judd, G.; and Ansell, G. S.: *Determination of hydroxyapatite crystalline size in human dental enamel by dark field electron microscopy*. J. Dent. Res. 1972; 51: 22-29.

Hearle JWS., Sparrow JT., Cross PM: *The use of the Scanning Electron Microscope*. Pergamon. Press LTD Great Britain. 1973.

Heinrich KFJ.: *Electron Beam X-Ray Microanalysis*. Van Nostrand Reinhold Company USA. 1981.

Hernández Gloria MJ.: *Proceso de disolución in vitro del esmalte dental humano por MET*. Tesis de Licenciatura. Fac. de Odont. UNAM. 1994.

Hirth J.P. and Lothe J. *Theory of dislocations*. 2nd. Ed. New York. 1982.

Holcomb DW., Young, R.A.: *Thermal decomposition of human tooth enamel*. Calif. Tissue Res. 1980; 31: 189-194.

Iijima M., Thoda H., Moriwaki Y.: *Growth and structure of lamellar mixed crystals of octacalcium phosphate and apatite in a model system of enamel formation*. Journal of Crystal Growth. 1992; 116: 319-326.

Iijima M., Tohda H., Suzuki H., Yanagisawa T., Moriwaki Y.: *Effects of F on apatite octacalcium phosphate intergrowth and crystal morphology in a model system of tooth enamel formation*. Calcif. Tissue Int. 1992; 50: 357-361.

Josephsen K., Fejerskov O.: *Ameloblast modulation in the maturation zone of the rat incisor enamel organ. A light and electron microscopy study*. J Anat. 1977; 124: 45-70.

Kay, M.I., Young, R.A., Posner, A. S.: *Crystal structure of hydroxyapatite*. Nature. 1964; 204: 1050-1052.

Kerebel B., Daculsi G., Kerebel L.M.: *Ultrastructural Studies of Enamel Crystallites*. J. Dent. Res. March 1979; 58 (B): 844-850.

Keve Instruments, Inc.: *Energy Dispersive X-Ray Microanalysis...: An Introduction*. San Carlos, California, 1989.

Lacout J. L.: *"Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine" in Biomaterials. Hard tissue Repair and Replacement*. (3) D. Muster, Editor, Elsevier, Amsterdam. 1992.

Lazzari Eugene P.: *Bioquímica Dental*. 2da. Ed. México, Interamericana. 1978.

LeFevre M. L., Manly R. S.: *Moisture, inorganic and organic contents of enamel and dentin from carious teeth*. J. Am. Dent. Assoc. 1932; 24:233-242.

- Le Geros R. Z, Kijkowska R, Le Geros J. P.: *Formation of octacalcium phosphates, OCP. A preliminary report.* Scan Microsc. 1984 (IV): 1771-1777.
- Le Geros, R. Z.: *Calcium phosphates in oral biology and medicine.* Howard M. Myers, Ed., San Francisco California. 1991.
- Lenhinger A. L.: *Bioquímica, las bases moleculares de la estructura y función celular.* 2da. Ed. Barcelona. Omega S. A. 1982.
- Lumsden A.G. S.: *Spatial organization of the epithelium and the role of neural crest cells in the initiation of the mammalian tooth germ.* Development. 1988; 103: 155-169.
- Marshall A. F. Lawless K. R.: *TEM Study of the Central Dark Line in Enamel Crystallites.* J. Dent. Res. 1981; 60: 1773-1782.
- Asociación Mexicana de Microscopía. *Memorias del Curso Básico de Microscopía Electrónica en el Área de las Ciencias Biológicas.* Fac. de Ciencias de la UNAM. 1997.
- Miake Y., Aoba T., Moreno E. C., Shimoda S., Prostack K., Suga S.: *Ultrastructural studies on crystal growth of enameloid minerals in elasmobranch and teleost fishes.* Calcif. Tissue Int. 1990; 48: 204-217.
- Miake Y., Shimoda S., Fukae M., Aoba T.: *Epitaxial overgrowth of apatite crystals on the thin ribbon precursor at early stages of porcine enamel mineralization.* Calcif Tissue Int. 1993; 53: 249-256.
- Miake Y., Yanagisawa T., Yajima Y., Noma H., Yasui N., Nonami T.: *High-resolution and Analytical Electron Microscopic Studies of New Crystals Induced by a Bioactive Ceramic (Diopside).* J. Dent. Res. 1995; 74: 1756-1763.

Moe J.: *Morphological changes in the infranuclear portion of the enamel -producing cells during their life cycle.* J. Anat. 1971; 108: 43-54.

Narasaraju T. S. B., Phebe D. E.: *Some Physico-Chemical Aspects of Hidroxilapatite.* Journal of Materials Science. 1996; 31: 1-21.

Nelson, D.G.A., McLean, J. D. Sanders J.V.: *High-resolution electron microscopy of electron irradiation damage in apatite.* Radiation Effects Letters. 1982; 68: 1-56.

Nelson D. G. A., Wood G. J., Barry J. C.: *The structure of (100) defects in carbonated apatite crystallites: A high-resolution electron microscope study.* Ultramicroscopy. 1986; 19: 253-266.

Nelson D. G. A., Salimi H., Nancollas G. H.: *Octacalcium Phosphate and Apatite Overgrowths: A Crystallographic and Kinetic study.* Journal of Colloid and Interface Science. 1986; 110: 32-39.

Neuman, W.F., Neuman M. W.: *The chemical dynamics of bone mineral.* The University of Chicago Press. Chicago. 1958.

Nylen M. V., Eanes E. D., Omnell K. A.: *Crystal growth in rat enamel.* The Journal of Cell Biology. 1963; 18: 109-123.

Pindborg J. J., Weinmann J. P.: *Morphologic and functional correlations in the enamel organ of the rat incisor during amelogenesis.* Acta Anat. 1959; 36: 367-381.

Posner A. S., Perloff A., Diorio A. F.: *Refinement of the hydroxyapatite structure.* Acta Cryst. 1958; 11: 308.

- Pouchou J. L., Pichoir F.: *Un nouveau modèle de calcul pour la microanalyse quantitative par spectrométrie de Rayons X*. La Recherche Aérospatiale. 1984; 3: 167-192.
- Reith E. J.: *The ultrastructure of ameloblasts during matrix formation and the maturation of enamel*. J. Biophys Biochem Cytol. 1961; 9: 825-839.
- Reith E. J.: *The early stage of amelogenesis as observed in molar teeth of young rats*. J. Ultrastruct. Res. 1967; 17: 503-514.
- Reith E.J.: *The stages of amelogenesis as observed in molar teeth of young rats*. J. Ultrastruct. Res. 1970; 30: 111-151.
- Reyes-Gasga J.: *Manual para los usuarios del laboratorio de Microscopía Electrónica*. Instituto de Física UNAM. Publicación interna, 1987.
- Reyes-Gasga J. Alcántara-Rodríguez C. M.: *Structural analysis of the human tooth enamel by transmission electron microscopy*. In *Hydroxyapatite and related Materials*. CRC Press. 1994. p. 295-304.
- Reyes-Gasga J, Gloria M. J, Gonzáles A. M. Madrigal A.: *La microscopía electrónica y el esmalte dental humano*. Ciencia y Desarrollo. 1995; 21: 30-43.
- Reyes-Gasga J., García G. R., Vargas-Ulloa L.: *In-situ observation of fractal structures and electrical conductivity in human tooth enamel*. Philosophical Magazine A. 1997; 5: 1023-1040.
- Reyes-Gasga J., Alcántara R.C.M., González T. A. M., Madrigal C. A.: *Child, Adult and Aged Human Tooth Enamel Characterized by Electron Microscopy*. Acta Microscópica. 1997; 6: 24-38.
- Robin C. J.A.: *Loss of carbonate during the first stages of enamel caries*. Caries Res. 1973; 7: 345-356.

- Rooji J. F., Nancollas G. H.: *The formation and remineralization of artificial white spot lesions: A constant composition approach*. J. Dental Res. 1984; 63: 864-867.
- Roos M. H., Reith E. J., Romrell L. J.: *Histología texto y atlas a color*. 2da. Ed. México, Editorial Médica Panamericana. 1992.
- Salido E. C., Yen P. H., Koprivnikar K., Yu L. C., Shapiro L. J.: *The human enamel protein gene amelogenin is expressed from both the X and Y chromosomes*. Am. J. Hum. Genet. 1991; 50: 303-316.
- Sasaki S.: *Endocytotic pathways at the ruffled borders of rat maturation ameloblasts*. Histochemistry. 1984; 80: 263-268.
- Simmelink J. W., Abrigo S. C.: *Crystal Morphology and Decalcification Patterns Compared in Rat and Human Enamel and Synthetic Hydroxyapatite*. Adv. Dent. Res. 1989; 3: 241-248.
- Simmer J. P., Fincham A. G.: *Molecular Mechanisms of Dental Enamel Formation*. Crit. Rev. Oral Biol. Med. 1995; 6: 84-108.
- Singer B., Bres E. F., Hutchison J. L., Voegel J.C., Frank R. M.: *Ballistic damages induced by electrons in hydroxyapatite (OHAP)*. Phil. Mag. 1992; A65: 665-682.
- Smith C. E., McKee M. D, Nanci A.: *Cyclic induction and rapid movement of sequential waves of new smooth ended ameloblast modulation bands in rat incisors as visualized by polychrome fluorescent labelling and GBHA staining of maturing enamel*. Adv. Dent. Res. 1987; 1: 162-175.
- Stadelmann P.: *A software package for electron diffraction analysis and HREM image simulation in material science*. Ultramicroscopy. 1987; 21:131-146.
- Ten Cate A. R.: *Histologia Oral*. Ed. Panamericana 2a. Ed.1986.

- Thomas M. B., Doremus R. H., Jarcho M., Salsbury R. L.: *Dense hydroxyapatite: fatigue and fracture strength after various treatments from diametrical tests*. J. Mater. Sci. 1980; 15: 891-894.
- Van Dick D., Van Tendeloo G., Amelinckx S.: *Diffraction effects due to a single translation interface in small crystal*. Ultramicroscopy. 1984; 15: 357-370.
- Vargas Ulloa L.: *Análisis estructural y químico de la línea oscura de los granos del esmalte dental humano*. Tesis de Maestría. Fac. de Odont. UNAM. 1997.
- Verhoeven J. D.: *Fundamentals of Physical Metallurgy*. New York: Wiley. 1975.
- Warshasky H., Josephsen K., Thylstrup A., Fejerskov.: *The development of enamel structure in rat incisors as compared to the teeth of monkey and man*. The Anatomical Record. 1981; 200: 371-399.
- Warshasky H., Nanci A.: *Stereo electron microscopy of enamel crystallites*. J. Dent. Res. 1982; 61: 1504-1514.
- Warshasky H.: *Shape of enamel crystals*. Scan. Micros. 1987; 1: 1913-1923.
- Weiss M.P., Voegel J.C., Frank R.M.: *Enamel Crystallite Growth: Width and Thickness Study Related to the Possible Presence of Octocalcium Phosphate during Amelogenesis*. Journal of Ultrastructure Research. 1981; 76: 286-292.
- Yacamán M. J., Reyes-Gasga J.: *Microscopía electrónica. Una visión del microcosmos*. Ed. Fondo de Cultura Económica. CONACYT. 1995.
- Young R. A.: *Implications of atomic substitutions and other structural details in apatites*. J. Dent. Res. 1974; 53: 193-197.
- Zeichner-David M., Diekwisch T., Fincham A., Lau E. MacDougall M., Moradian-Oldak J., Simmer J., Snead M., Slavkin H. C.: *Control of Ameloblast Differentiation*. Int. J. Dev. Biol. 1995; 39: 69-92.

CURRICULUM VITAE

Irma Araceli Belío Reyes

1. DATOS GENERALES

Lugar y fecha de nacimiento: México D.F. 56/04/18
Nacionalidad: Mexicana
RFC: BERI 560418 QW0
Nombramiento actual: Profesor e Investigador de Tiempo Completo Titular A. Universidad Autónoma de Sinaloa
e-mail: irma@fenix.ifisicacu.unam.mx
irmaraceli@hotmail.com
Área de investigación: Esmalte Dental por Microscopía
Electrónica de Transmisión y Barrido.
Área docente: Embriología y Prótesis Fija.

2. FORMACIÓN ACADÉMICA

Licenciatura: Cirujano Dentista, Facultad de Odontología UNAM, México 1978.
Promedio: 9.4
Licenciatura: Contador Público, Facultad de Contaduría y Administración, Universidad Autónoma de Sinaloa, 1983. Promedio: 8.6
Especialidad: Docencia de la Oclusión, Facultad de Odontología UNAM, México, 1985.
Promedio: 10
Especialidad: Ortodoncia, Escuela de Odontología Universidad Latinoamericana, México 1994. Promedio: 8.5
Maestría: Odontología, División de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Odontología UNAM, México, 1997.

Promedio 9.64

Doctorado:

Por presentar examen de grado,
División de Estudios de Posgrado e
Investigación, Facultad de Odontología.
UNAM, México agosto 2000.

3. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Trabajos presentados en Congresos Nacionales e Internacionales: 15

Ponencias publicadas en memorias de eventos académicos por selección: 1

Artículos publicados:

Belío-Reyes I. A., Vargas-Ulloa L., Jiménez-García L. F., Reyes-Gasga J.: *Chemical analysis around the crystal dark line of the human tooth enamel crystallites*. Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales. 1999; 19: 52-56.

Belío-Reyes I. A., Jiménez-García L. F., Reyes-Gasga J.: *Structural and chemical analysis of crystal enamel nucleation*. *Materials Research Society*. 2000; 599. Aceptado.

4. TESIS DIRIGIDAS: 3 (licenciatura).

5. DISTINCIONES

Mención Honorífica en la Licenciatura.

Nivel III en el programa de estímulos al Desempeño Académico y Docente desde 1994.

Apoyo financiero al Proyecto de Maestría: Por parte de la SEP.

Apoyo financiero al Proyecto de Doctorado: Por parte de Intercambio Académico.



CHEMICAL ANALYSIS AROUND THE CRYSTAL DARK LINE OF THE HUMAN TOOTH ENAMEL CRYSTALLITES

^{a,b}A. Belío-Reyes, ^bL. Vargas-Ulloa, ^cL. F. Jiménez-García and ^dJ. Reyes-Gasga

^aEscuela de Odontología Universidad Autónoma de Sinaloa. MEXICO.

^bFacultad de Odontología, UNAM.Division de Estudios de Posgrado. Circuito Interior, Ciudad Universitaria. Coyoacán, 04510 México D.F., MEXICO.

^cFacultad de Ciencias, UNAM. Circuito Exterior. Ciudad Universitaria. Coyoacán, 04510 México D.F., MEXICO.

^dInstituto de Física UNAM. Circuito de la Investigación Científica. Ciudad Universitaria. Coyoacán, 04510 México D.F. Apartado Postal 20-364 México, DF 01000. MEXICO.

Abstract

The aim of the present study was to obtain information about dental enamel crystallites and their chemical elements as a function of the interrelation between octacalcium phosphate (OCP) and hydroxyapatite (HA) function, mainly around the central dark line (CDL) which is localized in human-dental-tooth-enamel crystallites. For enamel crystal ultra-structural changes examination, high-resolution electron microscopy (HREM) and X-ray diffraction techniques were done, with special interest in the presence of CDL. The analyzed zone around the CDL, showed no significant difference in atomic positions in comparison with the rest of the grain, but does have more calcium, which suggests the possibility of values compatible with the presence of OCP. HA and OCP can form an epitaxial interface with a minimum of interfacial energy, producing a HA-OCP interface very smooth. The OCP-HA interface is of great biological interest in the context of mineralized tissue formation.

Keywords: Crystal dark line, crystal enamel growth, calcium phosphates, Electron Microscopy.

Resumen

El propósito del presente estudio fue obtener información acerca de los cristales del esmalte dental y sus elementos químicos como función del fosfato octocalcico (OCP) y la hidroxiapatita (HA), principalmente alrededor de la línea oscura central (CDL) que se observa frecuentemente en los cristales del esmalte dental humano. Para examinar los cambios ultraestructurales en los cristales del esmalte se usó microscopía electrónica de alta resolución (HREM) y difracción de rayos X. El análisis químico se llevó a cabo por espectroscopía de dispersión de la energía rayos X característicos (EDS), a los lados de la CDL y en varios planos del cristal. La zona analizada en la CDL no mostró diferencias significativas en las posiciones atómicas en comparación con el resto del grano, pero tiene una mayor cantidad de calcio, lo que sugiere la posibilidad de valores compatibles con la presencia de OCP. Algunos resultados experimentales indican que la HA y el OCP pueden formar una interfase epitaxial con un mínimo de energía interfacial, produciendo una interfase HA-OCP muy suave. La interfase entre OCP-HA es de gran interés biológico en el contexto de la formación de tejido de mineralización.

Palabras clave: Línea oscura central, crecimiento de los cristales del esmalte, fosfatos de calcio, Microscopía Electrónica

1. Introduction

Dental enamel proceeds from ecto-mesenchymal tissue and covers the anatomic crown of teeth. Ameloblasts are the secretory cells producing 90% amelogenins, 10% enamelin and other enamel proteases [1,2]. Dental enamel is formed by crystals of hydroxyapatite (HA), whose chemical formula in its purest state is $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$, (97% wt), organic material (1.5%), and water (1.5%) [3].

Enamel is organized into rods (4-5 μ m) or prisms separated by organic material. These prisms run at acute angles from the inner layer near enamel dentin junction to the surface of the tooth [4]. Enamel prisms are formed of several HA crystallites embedded in an organic matrix (figure 1). Spectra of the energy dispersive x-ray spectroscopy analysis (EDS) showed the main components of the HA, excepting hydrogen. From these studies other elements in small quantities, such as Na, Cl, and Mg, were detected showing an impure HYDROXYAPATITE [5]. The crystallite dimensions are in most mature enamel of 68nm in width and 26nm in thickness [6, 7]. Transmission electron microscopy (TEM) views of these crystallites displayed in their center a line whose contrast is focus dependent: it is dark underfocus, white overfocus and disappears in the exact focus value. It has been named Crystal Dark Line (CDL) and has ~ 1.5 nm width [8-10]. TEM lattice images showed that it is a single 1000 plane of the HYDROXYAPATITE structure and that its appearance depends on specific diffraction conditions. Experimentally, the dark line is sometimes not easy to observe because of its dimensions and its focus dependency. Sometimes only after the development and analysis of TEM photographs is released the existence of the CDL.

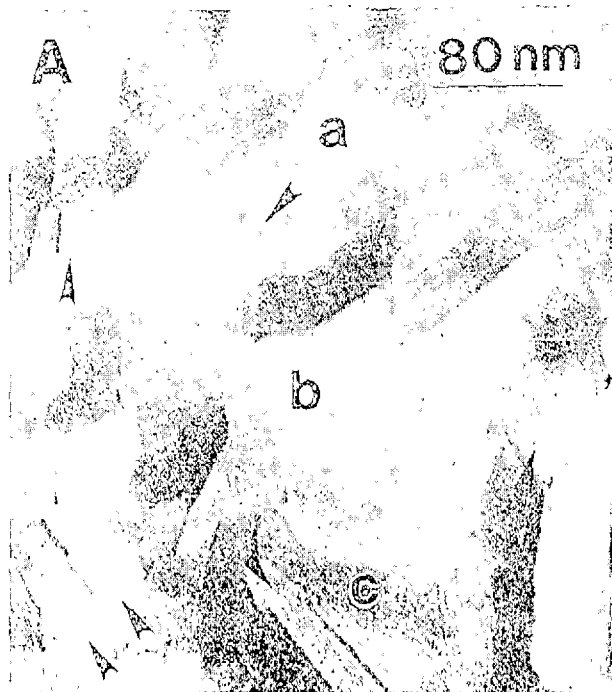
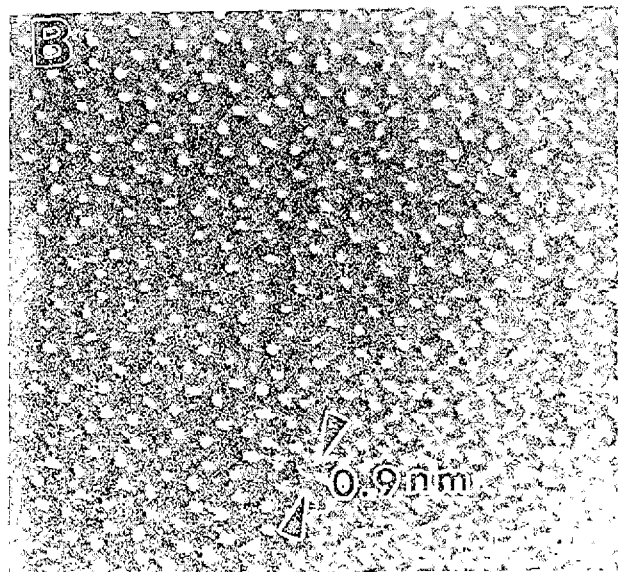


Fig. 1. A) FEM image of the human tooth enamel crystallites. Note the presence of the CDL in most of them. B) HRTEM of one of these crystallites.

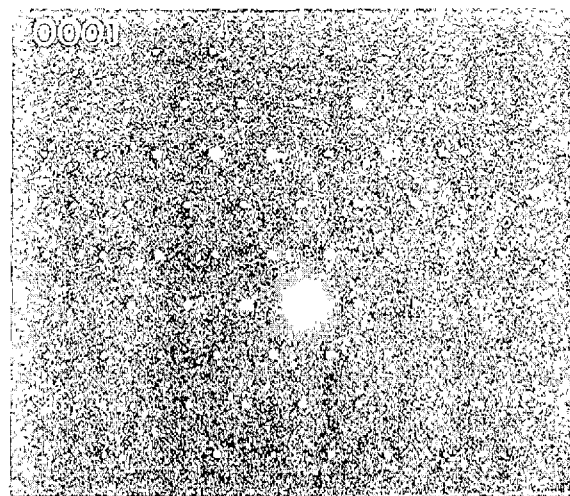


Fig. 2. SAEDP of one of the crystallites showed in figure 1A. This diffraction pattern corresponds to the direction along which figure 1B was taken.

Crystal dark line could be seen in transversal and longitudinal samples showing it is a planar defect. The origin of this CDL has been thought as, small coherent precipitate particles containing anti-phase boundaries [11], structural defects [8] linked to the initial growth process, lattice distortions, screw dislocations [12], grains boundaries, among others. It has been also indicated that the origin of this CDL a initial precipitation of thin ribbons and the subsequent epitaxial growth of apatite crystals on

the two dimensional octacalcium phosphate like precursor [13,14].

In this work we are interested in study the chemical composition of the crystallites of the human tooth enamel, and, more specifically, the zones around the CDL.

For this study techniques of transmission electron microscopy (TEM) and X-ray energy dispersive spectroscopy (EDS) will be used. The chemical analysis will be obtained from areas with transversal section of only 5nm.

2. Experimental Procedure

Samples of human tooth enamel from healthy teeth were prepared for TEM and HREM using the well-known sample preparative method for ceramics. The teeth were sectioned with a diamond wheel producing 0.3 x 0.3 cm slices with 250 to 500 μm thick. These slices were polished to the thickness of approximately 100 μm with a No. 1000 silicon carbide paper and water. With a Fishione 2000 grinder, samples were mechanically ground to 10 μm thick with periodical reversals to make the grinding as homogeneous as possible on both sides. Afterwards, the specimens were ion thinned in a Gatan ion-milling machine until a small hole was obtained in their center. The edges around the hole are thin enough for TEM observations. Finally, the enamel is covered with a carbon film of 20-nm thickness in order to minimize the electron beam damage and neutralize the electrical charge resulting from the ion bombardment. The analytical electron microscopy was carried out with a Jeol 2110 electron microscope that has attached a Noran EDS. This microscope allows getting a diameter probe of 5 nm, therefore the EDS analysis around the CDL is easier. A Jeol 4000EX electron microscope was used for high-resolution observations.

3. Results

When the enamel is observed with TEM, it is released that many small crystals form the prisms (fig. 1). These crystals are elongated along the longitudinal section and completely irregular, not hexagonal, along the transversal section. The enamel crystals are so small that concentric rings instead of spots form the selected area diffraction pattern (SADP). However, mono-crystalline diffraction patterns are easily obtained by nano-diffraction technique (fig. 2). In the transmission microscope, the smallest selected area aperture for SADPs has a diameter of 600nm whereas the nano-diffraction pattern comes from a circular area with a diameter of approximately 10nm. Samples were tilted in the three most important directions of the hexagonal unit cell agreeing very well with the hydroxyapatite unit cell parameters [15, 16]. EDS analysis were obtained from several enamel crystallites (fig. 3). This is a probe of the nanometric size of the cross section of the electron beam. The EDS analysis around the CDL was, therefore, carried out (fig. 4).

Here it was found differences in Ca/P ratio from 0.73 to 1.78 in atomic percentage from their centers to abroad, as shows in figure 4.

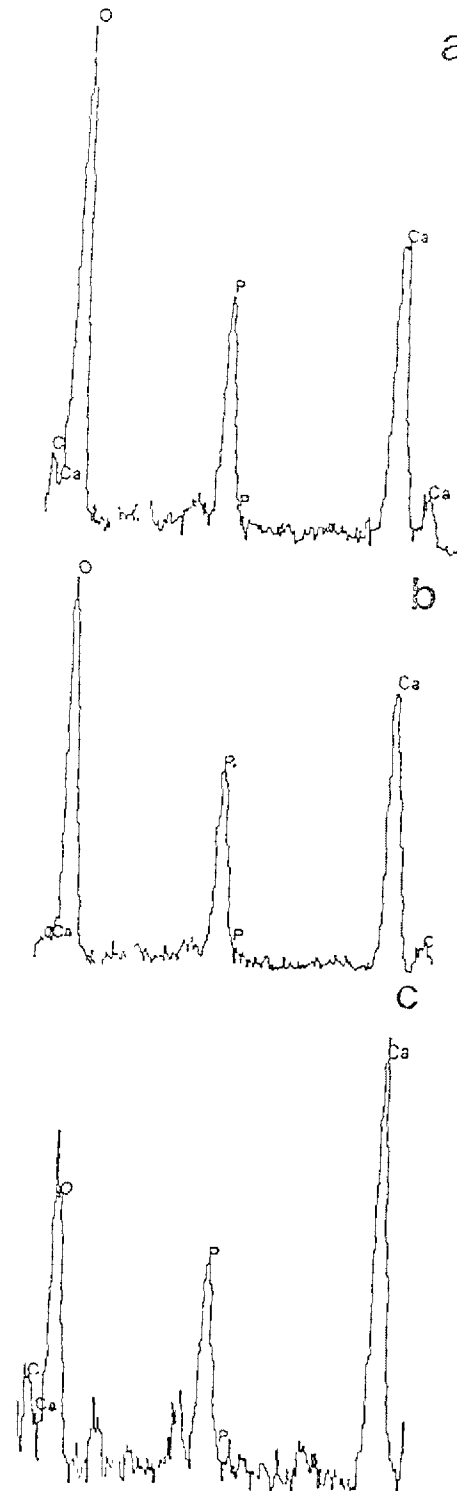


Fig. 3. EDS spectra from different enamel grains. These grains are shown in figure 1 where they were indicated with the same letter. The Ca/P ratios in atomic percentage were of A) 0.73, B) 1.44, and C) 1.74 respectively. The carbon peak comes from the layer deposited into the enamel surface for make the TEM observation possible.

In figure 4a, that is, over the CDL but in the left side, the Ca/P ratio was of 1.78 whereas in the right side of the CDL, it is of 1.36. In the other hand, in the crystallite itself this Ca/P ratio was of 0.7 (fig. 4c) and 1.0 (fig. 4d). All these percentages are complete different from that one in pure hydroxyapatite, which is 1.67.

4. Discussion

The results show a great variability in the Ca/P not only for the analysis from different points inside the same crystallite, but also for different crystallites of the enamel sample. Among the ideas on the origin of the CDL, the one that has more possibility to be true is the one that suggests that it is a remnant of a calcium phosphate used for the nucleation and growth of hydroxyapatite enamel crystallites [14]. This calcium phosphate was supposed to

be OCP. However, this phosphate presents a Ca/P ratio of 1.33 whereas hydroxyapatite is 1.67. Of course, many parameters has to be taken in account when a chemical concentration wants to be measure using TEM plus EDS techniques. One of them is the damage process, which occurs when the electron beam strikes the enamel sample [17]. However, one thing is clear from figure 4, the CDL zone presents more Ca than the crystallite itself. All this gives the idea that the CDL and enamel crystallites have different chemical composition, but might be that an experiment as the one reported in this work do not be the most appropriate for observing such difference. However, another type of experiments has to be carried out to elucidate in a better way this hypothesis.

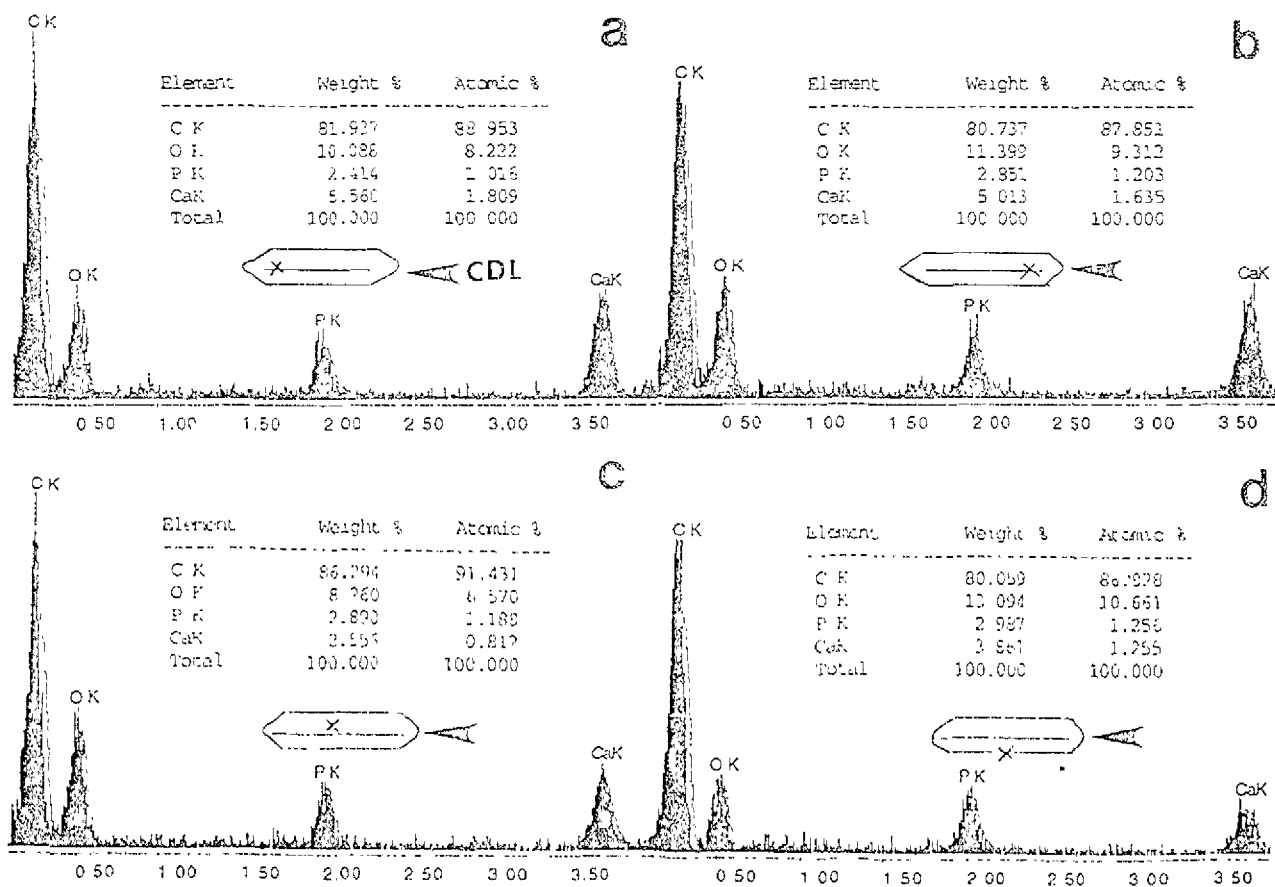


Fig. 4 EDS spectra from different points in the human tooth enamel crystallite, around the CDL, and the crystallite itself. The arrows indicate the schematic representation for each case.

5. Conclusions

It is probably that during enamel nucleation it has been created a phase rich in calcium. The fact of had found higher value for the Ca/P ratio around the CDL, but higher than in the rest of crystal, suggests the possibility of peak values compatible with the presence of OCP.

6. Acknowledgements

We would like to thank R. Hernández, L. Rendón, C. Zorrilla, S. Tehuacanero, P. Mexía, J. Cañetas, C. Flores, F. Solorio, A. Reyes, H. Esparza, E. Martínez, M. García and A. Sánchez for technical help. We also want to thank CIMAV-Chihuahua and CCMCUNAM-Ensenada for the experimental facilities offered for this research. CONACYT and DGAPAUNAM supported this work.

7. References

1. M.J. Glimcher, D. Brickey-Parsons, and P.T. Levine, *Calcif. Tissue Res.* **24**, (1977) 259-270
2. D.M. Zeichner et al.: *Int J Dev Biol*, **39** (1995) 69-92
3. R. Z. Le Geros, *Calcium phosphates in oral biology and medicine*, Howard M. Myers, Ed., San Francisco California 1991.
4. A.R. Ten Cate, *Histologia Oral*, Ed. Panamericana 2a Ed., 1986.
5. F.D. Eanes, *J Dent. Res.* **58** (1979) 829-834.
6. D. Guy and B. Kerebel. *J. Ultrastructure Res.*, **65** (1978) 163-172
7. C.A. Grove, G. Judd, and G.S. Ansell, *J. Dent Res* **51** (1972) 22-29
8. D.G.A. Nelson, G. J. Wood., and J.C. Barry, *Ultramicroscopy*, **19** (1986) 253-266.
9. A. F. Marshall and K. R. Lawless. *J Dent Res*, **60** (1981) 1773-1782.
10. J. Reyes-Gasca et al., *Rev. Ciencia y Desarrollo*. 1995, p. 31-43.
11. D. Van Dick, G. Van Tendeloo and S. Amelinckx, *Ultramicroscopy* **15** (1984) 357-370.
12. F.J.G. Cuisinier, P. Steuer, B. Senger, J.C. Voegel, and R.M. Frank. *Calcif Tissue Int*, **51** (1992) 259-268
13. I. Mayumi, H. Toada, and Y. Moriwaki, *J Crystal Growth* **116** (1992) 319-326.
14. Y. Miake, S. Shimoda, M. Fukae and T. Aoba, *Calcif Tissue Int.* **53** (1993) 249-256
15. M.I. Kay, R.A. Young, and A.S. Posner, *Nature* **204** (1964) 1050-1052.
16. R.A. Young, *J Dent. Res* **53** (1974) 193
17. D.G.A. Nelson, J.D. McLean, and J.V. Sanders, *Radiation Effect. Lett.* **63** (1982) 1-56.



Materials
Research
Society

506 Keystone Drive
Warrencale, PA 15066-7573
<http://www.mrs.org/>

724-779-3003
FAX 724-779-6313

Jose Reyes-Gasga
Materia Codensada
UNAM
Apartado postal 20-364
Mexico City, 01000
MEXICO

Dear Mr. Reyes-Gasga:

Thank you for attending the 1999 MRS 1999 Fall Meeting and participating in the Mineralization in Natural and Synthetic Biomaterials Symposium DD.

It is my pleasure to inform you that your paper has been reviewed by the symposium committee and has been accepted for publication. It will appear in the MRS Proceedings volume 599.

The 1999 meeting was a great success in which you played no small part. On behalf of all the symposium organizers I would again like to thank you for your hard work. I look forward to seeing you at future MRS events.

Sincerely,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Panjian Li', is written over a horizontal line.

Panjian Li
Chairman, Symposium DD

I. A. BELÍO-REYES*, L. F. JIMÉNEZ-GARCÍA** AND J. REYES-GASGA***

*Escuela de Odontología Universidad Autónoma de Sinaloa. MEXICO.

*Facultad de Odontología, UNAM. Division de Estudios de Posgrado. Circuito Interior, Ciudad Universitaria. Coyoacán, 04510 México D.F., MEXICO.
01000. MEXICO.

**Facultad de Ciencias, UNAM. Circuito Exterior, Ciudad Universitaria. Coyoacán, 04510 México D.F., MEXICO.

***Instituto de Física UNAM. Circuito de la Investigación Científica, Ciudad Universitaria. Coyoacán, 04510 México D.F. Apartado Postal 20-364 México, DF

ABSTRACT

The aim of the present study is to obtain structural and chemical information about nucleation and growth of dental enamel as a function of location in secretory mouse foetus enamel. Then enamel tissues were obtained from 19-days-mouse foetus. TEM images show that enamel crystallites had the well-documented thin ribbons, or needles. They were found in the outermost zone in the vicinity of ameloblasts. Chemical analysis by EDS showed that, besides the elements of hydroxyapatite. Na, Cl, Al and Mg are presents from the beginning of enamel mineralization. All of these elements will play an important role on the physics and chemical properties in mature enamel.

INTRODUCTION

Dental enamel proceeds from ecto-mesenchymal tissue and covers the anatomic crown of teeth. Ameloblasts are the secretory cells; their products are amelogenins, enamelin, tuftelins, proteoglycans, and enamel proteases. Mature dental enamel is formed by crystallites of hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) (in 97%), organic material (1.5%), and water (1.5%) [1]. However, enamel hydroxyapatite is higher impure because of its readiness to accommodate foreign atoms in its unit cell [2]. Spectra of characteristic x-ray energy dispersive spectroscopy (EDS) of enamel crystallites showed the main components of the hydroxyapatite, excepting hydrogen. From these studies other elements, such as Na, Cl, and Mg, and some element substitutions, such as CO_3^{2-} , Mg^{2+} and F⁻ have been found in small quantities [1]. The crystallites are organized inside rods, or prisms, which are separated by organic materials. These prisms run at acute angles from the inner layer near enamel dentin junction to the surface of the tooth

Transmission electron microscopy (TEM) images of enamel crystallites show a dark line of approximately 1.5 nm width along their centers whose contrast is focus dependent: it is dark underfocus, white overfocus and disappears in the exact focus value. This line has been named Crystal Dark Line (CDL) [3, 4]. The CDL has been experimentally observed in transversal and longitudinal human tooth enamel samples showing that it represent in reality a planar defect.

The origin of this CDL has had many interpretations, such as: anti-phase boundaries [5], structural defects linked to the initial growth process [4], lattice distortions, screw dislocations [6], grains boundaries, among others. It has been also indicated that it could be an initial precipitation of calcium phosphate thin ribbons and the subsequent epitaxial growth of hydroxyapatite. [7, 8]. This calcium phosphate is thought to be octacalcium phosphate (OCP). That is, that CDL is a remnant of a OCP layer for the nucleation and growth of hydroxyapatite enamel crystallites [8].

Hydroxyapatite has a Ca/P ratio of 1.33 whereas for hydroxyapatite it is 1.67. EDS analysis, together with electron microscopy, showed that the CDL zone presents more Ca than the crystallite itself [9]. However, these techniques proved not to be the most appropriate to elucidate whether the CDL composition is or not OCP, and another type of experiment have to be done.

Therefore, it is probably that during enamel nucleation a phase rich in calcium has been created. In this work we are interested in obtain structural and chemical information about nucleation and growth of dental enamel to study the chemical composition of enamel crystallites at this stage and, more specifically, of the zones around the CDL. Therefore, to find the origin of the dark line, the key is in the analysis of the early stages of enamel mineralization during the amelogenesis. Therefore, after some observations, enamel tissues of 19-days-mouse foetus were processed in this work. For this study techniques of scanning and transmission electron microscopy (SEM and TEM) and X-ray energy dispersive spectroscopy (EDS) were used.

EXPERIMENT

Tooth germs of lower incisors were obtained from 19 days old mouse foetuses. The enamel organ was dissected out from the bones and the covering soft tissues were removed. Two samples were fixed with 2.5 % glutaraldehyde in PBS buffer, pH 7.4, rinsed 3 times in PBS 3 during 5 minutes each. Then they were postfixed in cold buffered of 1 per cent OsO_4 at pH 7.4 for 2 hours; dehydrated in a graded ethanol series and propylene oxide once again 3 times during 5 minutes each allowing to stand overnight in equal parts of propylene oxide and Epon. The samples were oriented and then embedded in Epon. Two blocks were cut and covered with a gold layer for EDS analysis; two more blocks were cut with an ultramicrotome with glass knives to generate 60-90 nm thin section. For TEM observations, sections were placed into copper grids, which were previously coated with a formvar film, stained with 5% uranyl acetate during 20 minutes, and 0.5 % lead citrate for 10 min. For SEM, four samples were prepared at critical point. For HREM observation four more blocks were prepared: two with ethanol and two more in glutaraldehyde, but the crystallites section were observed without staining. SEM images were taken in a Phillips electron microscope, which has attached a Noran EDS equipment. For TEM images a Jeol 100CX and a 2010 electron microscopes, the latter with a Noran EDS equipment were used. High-resolution images were obtained Jeol 4000EX electron microscope. To minimize electron-beam-damage in the secretory enamel, all TEM and HREM samples were cover with a carbon layer of 20-nm in thickness.

RESULTS

Figure 1 shows a backscattering SEM image of the foetus mouse enamel. Figure 1a shows the zone were various sites analyzed, from the surface organic region toward the inner secretory enamel. Figure 1b shows the incisal zone (site 7). The indicated 7 sites are the points where EDS analysis was carried out. These sites were named as. (1) Blisters in ameloblast zone, (2) Organic material (Chinito), (3) A narrow zone adjacent the secretory ameloblasts named as Dark Interface, (4) "Peine" clear zone, (5) White zone (main ions deposit), (6) Dentin interface, and (7) Incisal zone. The results are shown in table 1. Figure 2 shows the EDS mapping of the zone where the crystals were found. As it is observed, the white zone is where the density of enamel crystals is higher.

Fig. 3 shows the secretory enamel zone images taken with TEM. In this figure the zone with high density of enamel crystals is the darkest one, and corresponds to the white zone in figure 2a. The enamel crystals are observed with its typical needle morphology. Observing with HREM the site

where the crystals are just nucleating (a zone between the sites 3 and 4 in figure 1), it was able to observe these crystals at the moment that they are formed by the cells (fig. 4). In this figure there is small contrast that resembles that of the CDL in mature crystals.

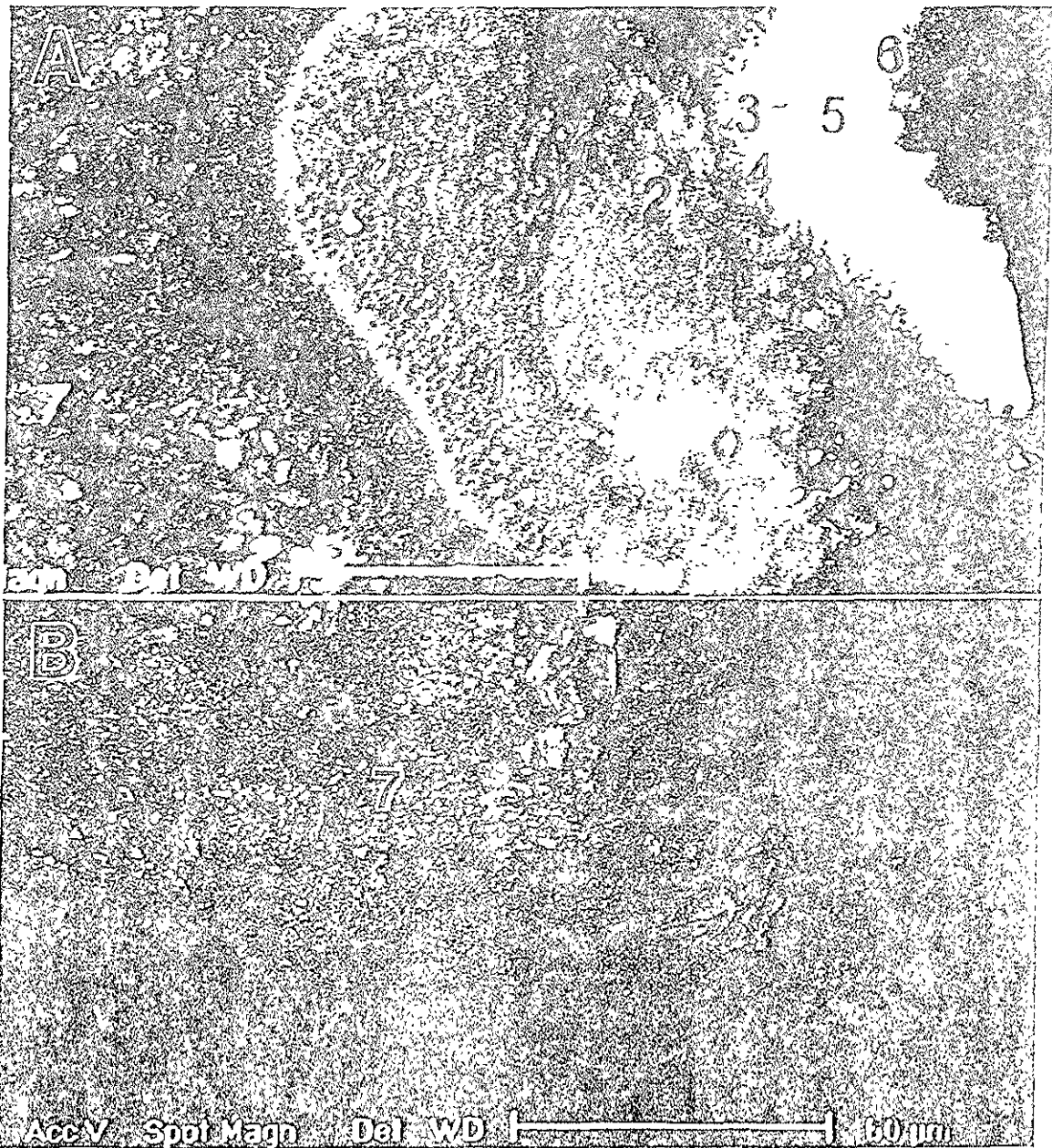


Fig.1. SEM images of the incisal zone showing the sites from where the EDS analysis were carried out. A) Epon sample. B) Critical point sample

DISCUSSION

Enamel crystal formations begin in the secretory stage of amelogenesis, and during this stage postmitotic ameloblasts produce the organic matrix. At a given distance from the apical ameloblast membrane the mineralization process starts. During the following developmental process, and until enamel is mature, mineral and organic phases undergo considerable changes which are controlled by the cellular activity of ameloblasts. Miake et al. [8], analyzing the early events of enamel growth of porcine enamel mineralization, which is close to that of human

TABLE I. EDS analysis for the sites shown in figure 1. Only site 7 showed Al and Mg elements.

No.	SITE	Ca	P	O	C	Cl	Na	K	Ca/P
1.	Blister		4.92	16.23	74.32	4.53			
2.	Chinito		5.53	13.78	76.14	4.55			
3.	Dark interface		5.23	12.73	78.03	4.01			
4.	Peine	1.67	6.90	17.58	69.35	4.49			0.24
5.	White zone	18.42	16.35	32.87	30.54	0.52	1.29		1.13
6.	Dentin interface	4.79	7.79	16.00	67.98	3.23		0.21	0.61
7.	Incisal zone*	18.34	19.62	47.55		1.37	6.89		

SITE	Al	Mg
*Incisal zone	3.25	2.97

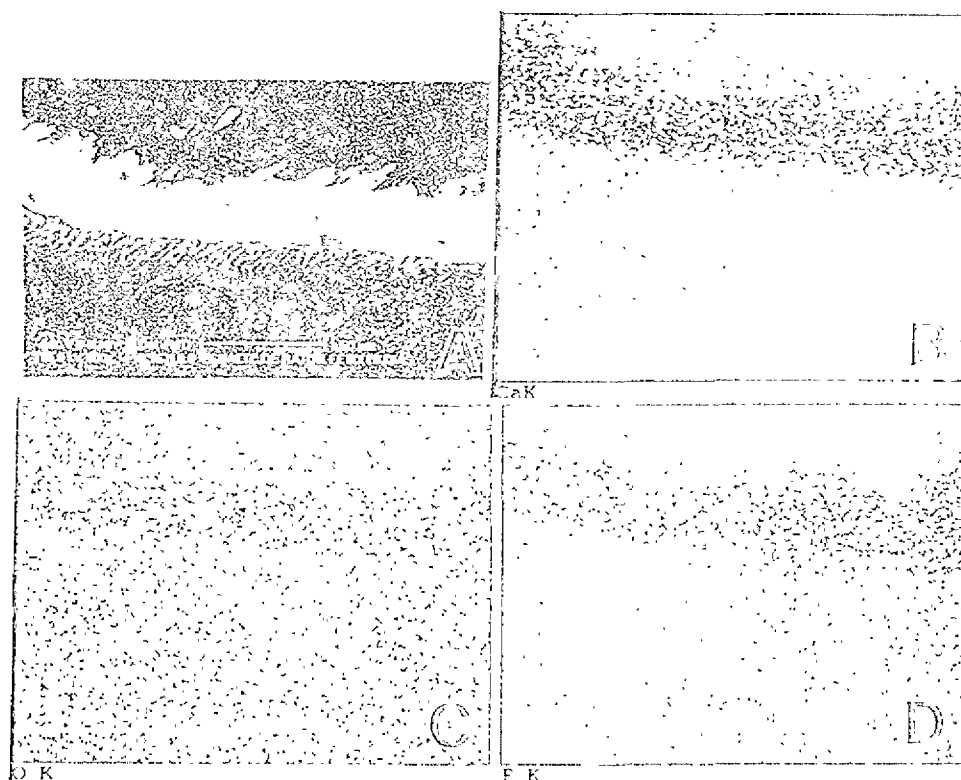


Fig 2. EDS chemical mapping of the main zone where the enamel crystals were deposited. A) SEM-backscattering-electron: original image. B) Map of calcium. C) Map of oxygen. D) Map of phosphorus.

enamel, found that this growth was characterized by an epitaxial growth of small apatite units on the lateral surfaces of a previously precipitated thin plate ribbon. After the enamel growth, this ribbon plate is retained as the central dark line of the crystallite. From these results they concluded that the initial enamel mineralization comprises two steps: first, the precipitation of the



Fig 3. TEM images of the main zone where the enamel crystals where deposited. A) Tomes fiber and dentin interface B) Cellular residue and enamel crystals. C) Enamel crystal arrangement.

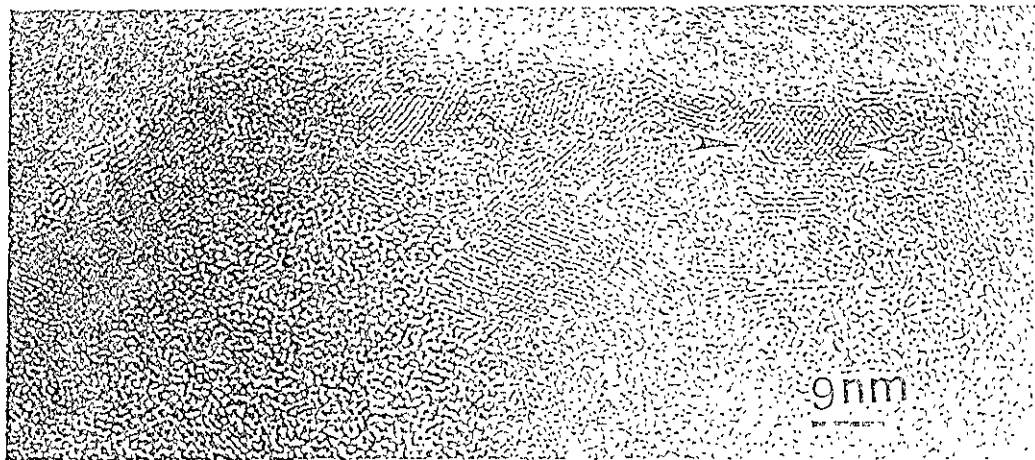


Fig 4. HRTEM image of just-nucleated enamel crystals. CDI-like contrast is observed in some of them

thin plate ribbon, and then the epitaxial ribbon.

In whole cell zone the present elements C, O, P, and Cl were appropriate to the studied region because of the reactions of cell processing. The area that corresponds to first ions deposit was observed as an interface. Dark and clear zones presented Ca ions, with a Ca/P ratio of 0.24 indicating the beginning of first deposits. The main Ca ions deposits were identified as White zone where the Ca/P ratio was of 1.126. This zone suggests a maturation development. The dentin region showed a smaller Ca/P ratio: 0.615, maybe as a result of the minor density of crystal in this tissue. The ions found in the outer incisal zone were always the same, but the Ca/P ratio was lower than 0.4, raising to the middle incisal zone from 0.85 to 1.16. Moreover, it was found small quantities of Na, Al, Mg and Cl.

The elements associated with apatite crystallites are of interest because of their effects on the formation and stability. Element properties based like Al is classified with no effect, Cl like cariogenic, Mg cariostatic and cariogenic, Na is not classified. These elements are known to interfere with in vitro apatite formation of mineralization [1]. The incorporation of Mg in synthetic apatites is very limited (~ 0.4 wt% Mg) but increased by the simultaneous incorporation of F or CO₃. Moreover, simultaneous incorporation of CO₃²⁻ and Mg²⁺ in apatite causes synergistic effects on the crystallinity of apatites. Forming apatite discriminates strongly the incorporation of Cl⁻ in favor of F⁻ when they are simultaneously present. Na⁺, being similar in size to Ca²⁺, is not expected to cause any effect on lattice parameters. Na incorporation is increased with the incorporation of CO₃.

There are many references on the participation of these ions in mature enamel. But not at the nucleation of enamel crystals (at the beginning of the deposits in secretory stages). This might suppose that they are part of the structure, probably as a metabolic requirement of specific cell membranes channels, which depends on Cl existence.

All this suggests an important role of these ions in the physics and chemical properties of mature enamel, in agreement with the reports.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank for technical support to: R. Hernández, P. Mexia, L. Rendón, C. Zorrilla, S. Tehuacanero, J. Cañetas, A. Sánchez and C. Flores. (IFUNAM); E. Ubaldo Facultad de Ciencias UNAM; J. Trejo (FOUNAM); Leticia Carapia and C. Angeles (ININ); J. Sepúlveda and H. Malagón (IICUNAM). CONACYT and DGAPAUNAM supported this work.

REFERENCES

1. R. Z. Le Geros, *Calcium phosphates in oral biology and medicine*, Howard M. Myers, Ed., San Francisco California 1991.
2. F.D. Eanes, *J. Dent Res* 58 (1979) 829-834.
3. W.E. Brown, L.R. W. Schroeder, and J.S. Ferris, *J. Phys. Chem.* 1979, 1385.
4. D.G.A. Nelson, G. J. Wood, and J.C. Barry, *Ultramicroscopy*, 19 (1986) 253-266.
5. D. Van Dick, G. Van Tendeloo and S. Amelinckx, *Ultramicroscopy* 15 (1984) 357-370.
6. F.J.G. Cuisinier, P. Steuer, B. Senger, J.C. Voegel, and R.M. Frank *Calcif Tissue Int.* 51 (1992) 259-268.
7. I. Mayumi, H. Toada, and Y. Moriwaki, *J. Crystal Growth* 116 (1992) 319-326.
8. Y. Miake, S. Shimoda, M. Fukae and T. Aoba, *Calcif Tissue Int.* 53 (1993) 249-256.
9. A. Belío-Reyes, L. Vargas Ulloa, L.J. Jiménez-García and J. Reyes-Gasga Submitted to *LatAm. J. Met Mat* (1999)