

133  
2oj.



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

## ANALISIS ESTRUCTURAL Y QUIMICO DEL ESMALTE DENTAL HUMANO POR TECNICAS DE MICROSCOPIA ELECTRONICA.

### T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE CIRUJANO DENTISTA PRESENTAN:

ANA MARIA GONZALEZ TREJO  
ALFREDO MADRIGAL COLIN

DIRIGIDA Y ASESORADA POR:  
DR. JOSE REYES GASGA.

MEXICO, D. F.

FEBRERO 1984





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 está 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.

## A G R A D E C I M I E N T O S

Al Dr. José Reyes Gasga. Examinando la senda en que pusimos los pies sentimos la firmeza de nuestros pasos, guiados por tu paciencia, conocimientos, tiempo y espacio. Gracias por tu amistad y confianza.

Al Dr. Javier Portilla Robertson por su apoyo en el desarrollo de nuestro servicio social y al mismo tiempo la culminación de nuestra tesis.

A quienes nos brindaron su amistad, experiencia, tiempo y su valiosa ayuda técnica, base fundamental en nuestro trabajo especialmente a: Pedro Mexía, J. Antonio Ramírez, Lamberto Quinterio, Fis. Roberto Hernández.

Así también gracias por su amistad y ayuda al Ing. Samuel Tehuacanero, M.C. Jaqueline Cañetas, Ing. Cristina Zorrilla, Sr. Edilberto Hernández, Ing. Luis Beltrán del Río, Sr. Alfredo Sánchez, Sr. Luis Rendón y al Sr. Ricardo Guerrero.

El amor maduro significa unión a condición de preservar la propia integridad, la propia individualidad. El amor es un poder activo en el hombre; un poder que atraviesa las barreras que separan al hombre de sus semejantes y los une a los demás. El amor lo capacita para superar su sentimiento de aislamiento y separatidad, y no obstante le permite ser el mismo, mantener su integridad. En el amor se da la paradoja de dos seres que se convierten en uno y, no obstante, siguen siendo dos.

ERICK FROMM

La esencia de dos vidas presentes... es su amor.

ANA Y ALFREDO.

A Dios por haberme dado la capacidad de aprovechar oportunamente lo que la vida y mis padres me han ofrecido.

A mis padres: ( AURELIO Y TERE).

A ti papá por ser un hombre capaz, emprendedor e inteligente. Por estar pendiente de todos.

A ti mamá por ser el soporte de la familia, por la riqueza de alma, por ser una gran mujer.

Por el esfuerzo y dedicación con que han educado a sus hijos, haciendo de ellos personas responsables y dedicadas, quienes se encargaran de colmarlos de nuevas alegrías y satisfacciones. A ustedes por estar pendientes de cada uno de mis pasos, con la confianza y espera de este momento.

Los amo y admiro.

A mis hermanos:

Parte fundamental en mi vida. En quienes confío y sobre todo admiro.

Por despertar en mí el deseo de superación y honestidad alimentados por el esfuerzo y éxito con los que cada uno de ustedes han desempeñado su vida y facultades.

MONSERRAT

EDGAR

ALMA

EFRAIN

TERE

LUPITA

A GUILLERMO y ROBERTO:

Por brindarme su ayuda, amistad y confianza. Sinceramente gracias.

A mis sobrinos:

GUILLERMO

XIMENA

FERNANDA

ALEJANDRO

Por representar vida, ilusión y esperanza.

A todos ustedes dedico este logro, fruto del esfuerzo y comprensión de toda la familia.

A todos aquellos amigos que me dieron aliento para continuar. Mil gracias por sus consejos, amistad y compañía.

**Madre:**

Aquí deajo como muestra la herencia que me brindaste, dejando atras desvelos, trabajo y amor, ligados a la esperanza discreta con la cual seguiste mis pasos, sedriendome la tenacidad de tu espiritu y la honestidad de tu corazón.

**A mis hermanos:**

A los dos, ya que representan mi orgullo. Juan por todos aquellos momentos donde afanozamente con nuestras ilusiones arreglabamos el mundo. Vero, "la niña de la casa", que esto sea el camino para que a futuro te forjes una formación profesional.

**Mamá Meche:**

Por todo tu cariño, soportando las etapas más cunfusas de mi adolelescencia y la formación de mi niñez.

**A el compañero de mi madre:**

Clemente por la disposición incondisional que nos has brindado, por tu apoyo y sabiduría con la que interveniste en nuestras vidas.

**A la familia Colín:**

Por todas las esperanzas que me brindaron, por todos aquellos tiempos buenos y malos compartidos.

Tíos	Primos				
Lucía	Rafael	Ricardo	Alberto	Ernesto	
Alfonso	Armando	Gerardo	Adriana	Gabriela	
Lurdes	Alejandro	Patricia	Nancy	Yeneli	
Teresa	Jose Luis	Magdalena	Yesica	José Luis...	

Y a toda la nueva generación que con su inquietud e inocencia forman la esperanza del futuro.

En general a cada una de las personas que se han ido integrando a la familia, y que de una u otra manera estimularón mi formación.

Y en memoria de Papá Poncho y Gerardo que en muchas ocasiones me fortalecieron en los momentos más agobiantes..

# I N D I C E

	Pag.
<b>INTRODUCCION.</b>	1
<b>CAPITULO I.</b>	
I.1. Antecedentes.	3
I.2. Objetivos.	4
I.3. Justificación.	7
I.4. Hipótesis.	8
<b>CAPITULO II. ESMALTE DENTAL.</b>	
II.1. Propiedades.	10
II.2. Formación.	12
II.3. Estructura.	17
II.3.1. Prismas del esmalte	17
II.3.2. Area aprismática.	28
II.3.3. Estriás.	28
II.3.4. Bandas de Hunter-Schereger.	30
II.3.5. Esmalte Nodoso.	31
II.3.6. Líneas de Retzius.	32
II.3.7. Periquimáticas.	34
II.3.8. Penachos y Laminillas.	34
II.3.9. Unión amelodentinaria.	35
II.3.10. Material Orgánico.	39
II.4. Composición Química.	40
II.4.1. Apatita Biológica.	40
II.4.2. Estructura de la hidroxiapatita.	42
II.4.3. Estructura de las otras apatitas.	45
II.4.4. Sustituciones por átomos impureza.	50
<b>CAPITULO III. MICROSCOPIA ELECTRONICA.</b>	
III.1. Interacción haz electrónico-muestra.	52
III.2. Microscopio Electrónico de Transmisión.	54
III.3. Microscopía Electrónica de Barrido.	55
III.4. Difractómetro de Rx.	56
III.5. Rayos x característicos.	57

III.6. Análisis cuantitativo con rayos x característicos.	58
III.7. Microanálisis por pérdida de energía de los electrones (EELS).	60
III.8. Cristalografía.	62
III.9. Difracción de electrones.	64
III.10. Indexación de patrones.	66

#### CAPITULO IV. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

IV.1. Obtención de los dientes a estudiar.	68
IV.2. Muestras para Microscopía Electrónica de Barrido.	68
IV.3. Muestras para Microscopía Electrónica de Transmisión.	68
IV.4. Muestras para Rx.	70
IV.5. Equipo utilizado.	70

#### CAPITULO V. RESULTADOS.

V.1. Microscopía Electrónica de Barrido.	77
V.2. Microscopía Electrónica de Transmisión.	82
V.3. Microscopía Electrónica de Alta Resolución.	97
V.4. Análisis químico.	98
V.4.1. Análisis por EDX.	98
V.4.2. Análisis por Rayos X.	104
V.4.3. Análisis por EELS.	110

#### CAPITULO VI. DISCUSION.

VI.1. Microscopía Electrónica de Barrido.	113
VI.2. Microscopía Electrónica de Transmisión.	114
VI.3. Análisis químico.	115
VI.4. Línea oscura.	116

CONCLUSIONES.	118
---------------	-----

BIBLIOGRAFIA.	120
---------------	-----

## INTRODUCCION.

La caries dental es un problema de salud que afecta a millones de personas no sólo en México sino a nivel mundial y representa una lesión irreversible. Siendo el esmalte la primera estructura del diente afectado por la caries, las investigaciones con el objetivo de comprender no sólo su origen y desarrollo sino también su estructura ("normal" para reconocer lo "anormal") y sus propiedades, recobra gran importancia.

El esmalte difiere de entre tejidos calcificados en todos los aspectos excepto en la composición del mineral. Su matriz orgánica es derivada ectodérmicamente, su contenido mineral excede la de los otros tejidos mineralizados, sus cristales son mucho más grandes, y una vez formada es completamente inerte metabólicamente hablando. Por todo esto el esmalte dental podría representar un tejido casi ideal para el estudio de las propiedades de las apatitas biológicas y compararlas con las propiedades de las apatitas sintéticas.

Un gran número de métodos biofísicos han sido aplicados al estudio de tejidos calcificados. Como resultado se ha adquirido un conocimiento considerable sobre la naturaleza y estado del mineral y su distribución relativa dentro de matrices orgánicas, información que no podría ser obtenida por métodos más convencionales. De entre estos estudios aquellos sobre el esmalte dental ilustran más claramente este punto.

Varios estudios han tenido como objetivo el estudio de su forma, tamaño y composición. Entre estos los realizados por microscopía electrónica y técnicas relacionadas con ella, debido a su capacidad de mostrar el esmalte dental completamente mineralizado, a mejorado nuestra habilidad para estudiarlo histológicamente. En este trabajo se caracteriza estructuralmente el esmalte dental humano por medio de técnicas de microscopía electrónica, tanto de transmisión convencional como de alta resolución, así como también por difracción de electrones, campo claro y campo oscuro, difracción por rayos x, espectroscopía de electrones y simulación de imágenes. El objetivo que perseguimos es el estudio estructural

y análisis químico del esmalte dental humano y nuestra meta es obtener información experimental confiable que nos permita reconocer con más detalle la estructura y propiedades de éste, ya que conociendolo más podremos contribuir en un futuro a determinar donde da inicio el proceso de desmineralización provocado por el proceso carioso.

La presentación de este trabajo de tesis se ha dividido en seis capítulos. En el capítulo I se comentan los antecedentes, se definen los objetivos, se da la justificación y la hipótesis del trabajo. En el capítulo II se describen las propiedades estructurales y químicas de nuestro objeto de trabajo: el esmalte dental. El capítulo III presentamos nuestra técnica de trabajo y su equipo: el microscopio electrónico. El capítulo IV se menciona el material y método utilizado para la obtención de las muestras del esmalte. En el capítulo V se presentan los resultados obtenidos, todos excelentes y algunos de ellos inéditos. En el capítulo VI, y último, se aborda la discusión de los resultados de este trabajo de tesis. Para finalizar, se presentan las conclusiones.

Este trabajo es la continuidad del trabajo realizado durante nuestro servicio social, el cual realizamos en el Instituto de Física de la UNAM. El realizar nuestro servicio social en contacto directo con la investigación nos permitió conocer que el campo de investigación de la profesión en la cual acabamos de iniciarnos no se limita sólo a la labor de consultorio, muy importante dentro del papel que desempeñamos dentro de la sociedad, sino que es un mundo ilimitable de experimentos sobre factores que nos amplían el conocimiento de la ciencia odontológica, permitiéndonos desempeñar bastante mejor nuestra labor. Creando a la vez apoyo multidisciplinario con resultados más favorables para nuestra Universidad y a uno mismo como parte de ella.

Por último queremos realzar la relevancia de este trabajo en el área de la Odontología así como en el área de los Biomateriales. Se ha realizado en colaboración entre la Facultad de Odontología y el Instituto de Física, ambos de la UNAM.

## CAPITULO I

### ANTECEDENTES, OBJETIVOS, JUSTIFICACION E HIPOTESIS

Nuestro objeto de estudio y análisis es el esmalte dental humano y nuestra meta es obtener la información experimental confiable que nos permita reconocer en más detalle su estructura y propiedades así como alcanzar los objetivos propuestos, los cuales comentaremos en este capítulo.

#### I.1. Antecedentes

El esmalte dental humano es la primera estructura que afecta el proceso carioso. Sin embargo no se ha encontrado hasta el momento la forma de reforzar esta barrera natural para evitar el inicio y desarrollo de la caries. La caries dental afecta a un 90% de los habitantes<sup>1</sup> en México representando un gran problema de salud. Por lo tanto todo estudio que se realice sobre ella y las estructuras que afecta cobra una gran importancia.

El esmalte es un tejido que se deriva del ectodermo<sup>2</sup>, cubre la corona anatómica de los órganos dentales y es el tejido más mineralizado del cuerpo humano. Consta de un 96% de material inorgánico, y un 4% de material orgánico y agua. La parte mineral del esmalte está constituido por apatitas biológicas<sup>3</sup>.

Los estudios relacionados con la composición inorgánica del esmalte<sup>4</sup> indican que las apatitas pueden variar su forma estequiométrica y pueden contener una gran variedad de especies químicas. La proporción primaria relativa está constituida por tres grupos principales:  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  y  $\text{OH}^-$  formando, entre otras, las apatitas conocidas como hidroxiapatita y fluorapatita. Algunos elementos que ocurren en concentraciones de 0.01-7.0 wt.% (referidos como elementos minoritarios) son el  $\text{CO}_3$ , Cl, F, Mg y Na estan asociados no sólo con las apatitas biológicas del esmalte sino también de la dentina, cemento y hueso<sup>5</sup>.

El esmalte al ser observado en el microscopio electrónico de transmisión muestra un conjunto de pequeños cristales con una

línea oscura a lo largo de sus porciones centrales de aproximadamente 1nm de espesor (Fig. I.1). Ella aparece oscura cuando se encuentra la imagen fuera de foco y desaparece cuando la imagen está en foco (Fig. I.2). La geometría de este defecto es de tal magnitud que se puede extender completamente, abarcando los dos extremos del cristal, ó terminar en cualquier punto dentro de éste. Algunos autores<sup>6,7</sup> opinan que este defecto es especialmente susceptible a la caries puesto que al parecer sufre disolución preferencial durante los estadios tempranos del proceso carioso. Numerosos estudios se han realizado con el objetivo de conocer la estructura y las propiedades de esta línea y establecer el papel que ésta juega durante el proceso carioso<sup>8</sup>. Se han propuesto varias teorías para explicar el origen de esta línea oscura<sup>6,7</sup>. Específicamente se dice que puede ser el remanente de la matriz orgánica calcificada, una dislocación, una frontera de grano o un plano de defecto localizado de los iones carbonato coherente en la estructura de la hidroxiapatita. Sin embargo hasta la fecha muchas preguntas sobre su naturaleza y propiedades se encuentran sin respuesta.

La tesis titulada "Caracterización de esmalte dental humano por microscopía electrónica de transmisión"<sup>9</sup> fué el inicio de un proyecto de investigación que sobre el esmalte establecido entre la Facultad de Odontología y el Instituto de Física de la UNAM. Se observó por microscopía electrónica de transmisión el esmalte dental humano y se mostró que éste está formado por cristalitas (Fig. I.1) de la apatita biológica conocida como hidroxiapatita<sup>10</sup>. También se estudió el contraste y posibles estructuras de la línea oscura. Sin embargo, este trabajo representó sólo el inicio de la caracterización de éste defecto, para lo cual se requiere un estudio mas amplio sobre la estructura, propiedades y composición química del esmalte.

## 1.2. Objetivos

Como comentamos anteriormente, existe la necesidad de reconocer y analizar los rasgos estructurales del esmalte como un camino a seguir para la interpretación del defecto conocido como línea



Fig. I.1 Imagen del esmalte dental humano observado por microscopía electrónica de transmisión, en donde observamos los cristales de hidroxiapatita que lo componen. Obsérvese las líneas oscuras que pasan por el eje central de cada uno de ellos<sup>9</sup>.

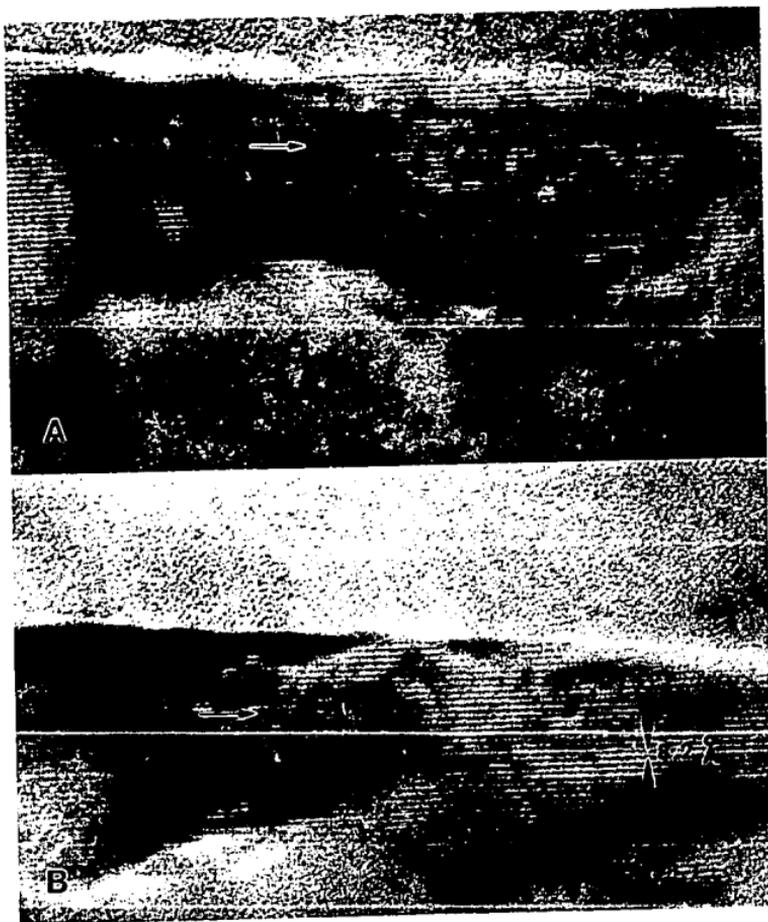


Fig. I.2 Cristal de esmalte observado por microscopía electrónica de alta resolución en donde la línea oscura señalada aparece cuando la imagen está fuera de foco (A) y desaparece cuando la imagen está en foco (B)<sup>9</sup>.

oscuro. Por lo tanto, uno de los objetivos de nuestro trabajo es la caracterización estructural de los cristales del esmalte por medio de técnicas de microscopía electrónica de barrido y microscopía electrónica de transmisión tanto convencional como de alta resolución, difracción de electrones y difracción de rayos X.

Los resultados que hasta ahora hemos obtenido sobre la línea oscura nos hacen pensar en la posibilidad de que este defecto se deba principalmente al remanente de un material distinto al de la hidroxiapatita y que el papel que juega es el ser el núcleo de crecimiento para los cristales del esmalte. El comportamiento del contraste de ésta línea, que aparece oscura, blanca o desaparece completamente dependiendo del foco, es típico, ópticamente hablando, de un contraste de Fourier para objetos de fase. Por lo tanto otro objetivo que se persigue dentro de nuestro trabajo es la obtención de las condiciones óptimas para la observación y análisis de la línea oscura en el microscopio electrónico de transmisión.

Este trabajo incluye el estudio comparativo de las estructuras anatómicas del esmalte humano, y la evolución de la línea oscura, con respecto a la edad. Por lo tanto analizaremos el esmalte en tres etapas de la vida: infancia (piezas temporales), adolescencia y senectud (piezas permanentes). Así también se pretende hacer el análisis químico del esmalte a nivel macroscópico y a nivel microscópico. Es bien sabido que el material inorgánico que forma el esmalte es principalmente hidroxiapatita, cuya fórmula química es  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$ . Sin embargo un conocimiento preciso de su composición es necesario para la interpretación del papel que desempeña la línea oscura en su estructura.

### 1.3. Justificación.

Como ya comentamos al inicio de este capítulo la caries es una enfermedad irreversible que afecta a un porcentaje elevado de la población mundial y por lo tanto cualquier trabajo que sobre este proceso, o procesos relacionados, se justifican por sí solos. La existencia de la línea oscura en los cristales del esmalte y su posible relación con el inicio del proceso carioso y teniendo

nuestro trabajo como objetivo su estudio también se justifica directamente.

Con respecto a la línea oscura, no se ha podido establecer que es, como y cuando se forma. En vista de que existen muchas preguntas que necesitan respuesta adecuada respecto a la evolución y comportamiento de esta línea decidimos realizar este trabajo.

#### I.4. Hipótesis.

El esmalte presenta una estructura y composición química variables con el tiempo y por lo tanto el defecto conocido como la línea oscura también tiende a variar.

## CAPITULO II

### ESMALTE DENTAL

En este capítulo comentaremos las propiedades tanto mecánicas, estructurales (a nivel macroscópico como microscópico) y químicas del esmalte.

#### INTRODUCCION.

El esmalte es un tejido duro altamente mineralizado que cubre la corona del diente. Es el primer lugar que ataca la caries dental y es, por lo tanto, de especial interés en la Odontología. En sí es un tejido acelular, es decir una vez formado no presenta ninguna actividad biológica. Esto quiere decir, ya que los ameloblastos desaparecen después de la formación del esmalte, este tejido es incapaz de repararse. Al madurar, pierde tanto material orgánico como agua por lo que resulta un producto que está compuesto de un 96% en peso de material inorgánico, 3% de agua y un 1% de material orgánico. Por lo tanto el esmalte es extremadamente duro pero frágil.

La unidad estructural básica del esmalte es un prisma formado como producto de secreción de los ameloblastos<sup>11</sup>. Este tiene la forma de un "ojo de cerradura" en sección transversal y está compuesto en su mayor parte de cristales de hidroxiapatita, cuyo eje mayor es básicamente paralelo al eje del prisma excepto en "la cola" en donde los cristales cambian de orientación. El espacio entre los cristales está lleno de material orgánico (generalmente proteico). Las características estructurales del esmalte incluyen regiones de alto contenido orgánico como son las laminillas, los penachos y husos adamantinos. También muestra estructuras relacionadas con el crecimiento como son las líneas de Retzius, la línea neonatal y las periquimatias, así como estructuras que son resultado de variaciones en la orientación de los prismas los cuales se conocen como bandas de Hunter-Schreger y el conocido esmalte nodoso. El conocimiento de la estructura del esmalte es muy importante para el entendimiento de los cambios que ocurren durante la

mineralización, la prevención y reducción de las cavidades. En este capítulo haremos una descripción breve de los componentes estructurales y químicos del esmalte con lo cual pretendemos hacer la descripción de nuestra área de estudio.

## II.1. PROPIEDADES.

El tejido adamantino es de gran dureza recubre la corona anatómica de las piezas dentarias (Fig.II.1). La relación en su superficie exterior es con el medio bucal y en la superficie interna con la dentina. En cuello su relación inmediata es con el cemento que recubre la raíz del diente, siendo delgado a este nivel. Su espesor aumenta en dirección cuspidea y llega a ser de 2 a 2.5 mm en molares, premolares y caninos superiores; en donde se localizan zonas de grandes impactos masticatorios.

El esmalte es desafiado continuamente en el medio ambiente tan agresivo en que se encuentra. Es sometido a considerables influencias mecánicas y químicas. Por ejemplo tiene que resistir las fuerzas de masticación (que son de aproximadamente 100 kg/cm<sup>2</sup>); cambios de pH que van de 4 a 8 (valores de pH de 6 o menores lo afectan apreciablemente); cambios de temperatura de entre 10 a 60°C; ataques bacteriológicos y enzimáticos; la influencia de varios líquidos y sustancias alimenticias; etc. La combinación esmalte-dentina hace al esmalte altamente duro, elástico y resistente al frotamiento.

Con respecto a sus propiedades físicas <sup>12</sup>, la dureza del esmalte en la escala KHN (Koop Hardness Number) es de 200-500 kg/m<sup>2</sup>, en la escala de Mohs ocupa el quinto lugar, debido a su composición. Su peso absoluto depende del tamaño de la pieza dentaria pero su peso específico es de 2.95 dinas/cm<sup>3</sup>. La densidad decrece de la superficie libre al límite amelodentinario entre 2.8 y 3 gr/cm<sup>3</sup>. La alta densidad mineral del esmalte es reflejado en el hecho de que la hidroxiapatita pura tiene una densidad de 3.15 gr/cm<sup>3</sup>. Su elasticidad es casi nula como resultado de su alto contenido en sales minerales y escasa sustancia orgánica, comportandose por tanto como un tejido frágil. Es incoloro, pero el color aparente que presenta depende de la dentina y grosor del esmalte (entre más

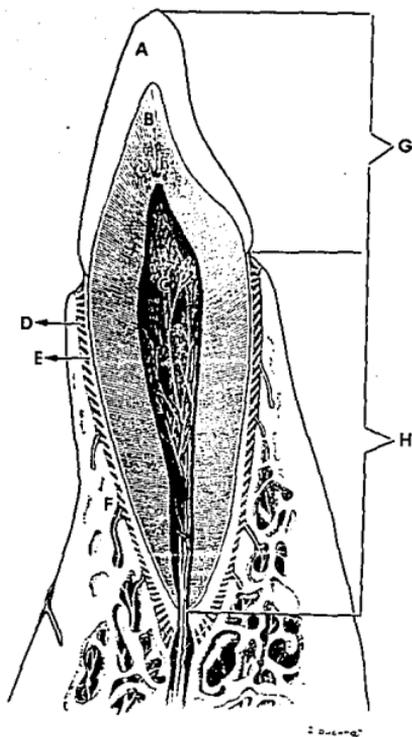


Fig. II.1 Esquema del diente humano donde se señalan sus estructuras principales. (A) ESMALTE, (B) DENTINA, (C) PAQUETE VASCULO NERVIOSO, (D) FIBRAS DE LA MEMBRANA PERIODONTAL, (E) CEMENTO, (F) HUESO, (G) CORONA Y (H) RAIZ.

mineralizado más translúcido). Es soluble en medio ácido y semipermeable. Radiográficamente es radio-opaco, entendiéndose como la oposición al paso de los rayos x, por lo que su radiopacidad es muy alta debido a su contenido mineral. De acuerdo a su estructura cristalina, el esmalte es un tejido birrefringente, es decir presenta dos índices de refracción con distintas orientaciones, con una ligera negatividad motivada por las distintas inclinaciones de los cristales de apatita, las cuales se describirán más adelante.

## II.2. FORMACION.

El esmalte es de origen ectodérmico. Las células que lo forman son los ameloblastos los cuales se desarrollan dentro del epitelio dental interno como parte del órgano dental. El diámetro promedio de un ameloblasto es de 4  $\mu\text{m}$  que es comparable con el espesor de un prisma del esmalte. Se producen tantos ameloblastos como prismas existen en el esmalte.

Para la formación del esmalte se requiere la previa formación de dentina. Los ameloblastos emigran en dirección periférica hacia la superficie dentaria y en seguida de cada célula se forma una proyección cónica, llamada proceso de Tomes que desaparecen al término de la formación de la matriz orgánica del esmalte e intervienen en su maduración. Los ameloblastos secretores son células hexagonales en sección transversal muy polarizadas y están en contacto directo con el esmalte en desarrollo. En el polo apical de la célula hay una prolongación llamada el proceso de Tomes que está rodeado por la matriz del esmalte. El proceso de Tomes es la punta de la célula y tiene forma de pala, cóncava en una de sus superficies, con una base hexagonal ancha y una punta en forma de herradura (Figs.II.2 y II.3). Este tipo de ameloblastos se encarga de sintetizar la matriz orgánica proteica por actividad del retículo endoplásmico rugoso (RER) y el aparato de Golgi (Fig.II.2a) hasta alcanzar el espesor completo del esmalte maduro.

A la altura de sus polos basales, los ameloblastos secretores son adyacentes a un estrato de células del órgano del esmalte llamado

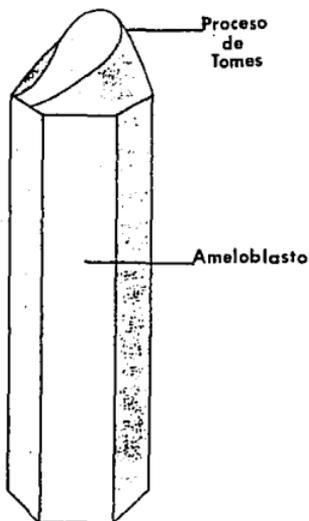


Fig. II.2 Representación geométrica del ameloblasto, ubicando al proceso de Tomes en la punta de este como una concavidad.

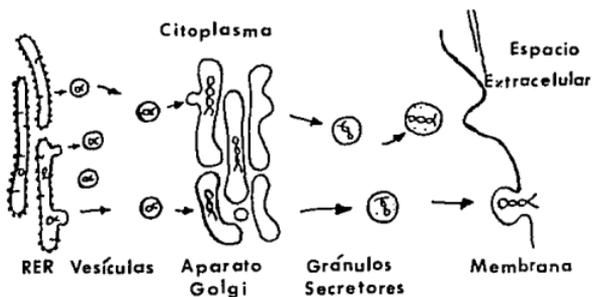


Fig. II.2a Diagrama que muestra las interrelaciones funcionales entre el retículo endoplásmico rugoso (RER), el aparato de Golgi y el producto secretado.

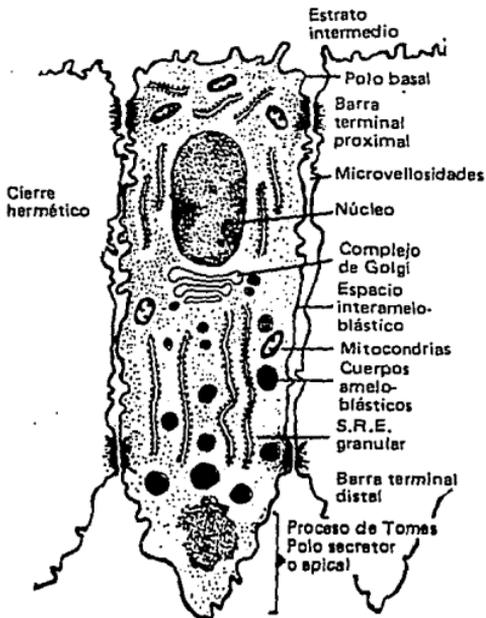


Fig. II.3 Representación esquemática de la composición interna de un ameloblasto. Compararse con su apariencia externa mostrada en la figura II.2.

capa intermedia. La membrana plasmática de estas células y la del polo basal de los ameloblastos da una reacción positiva para la fosfatasa alcalina, una enzima que al parecer interviene en la calcificación. La maduración de la matriz parcialmente mineralizada comprende la eliminación del material orgánico y el agregado constante de calcio y fosfato. El calcio entra en el esmalte en maduración por ciclos y los ameloblastos madurativos sufren alteraciones cíclicas en su morfología que concuerdan con la entrada cíclica de calcio en el esmalte. Esta segunda etapa de formación del esmalte es tarea de los ameloblastos madurativos, los cuales se forman por una reorganización de los ameloblastos

secretores. Estos también son células hexagonales muy polarizadas y se encuentran en contacto directo con el esmalte en desarrollo. Su función principal es la de transporte de sustancias. La característica principal de los ameloblastos madurativos y de las células papilares vecinas es la presencia de abundantes mitocondrias, siendo un índice de una actividad celular que requiere gran cantidad de energía y refleja el hecho de que estos ameloblastos funcionan como un epitelio especializado en el transporte de sustancias (Fig.II.4).

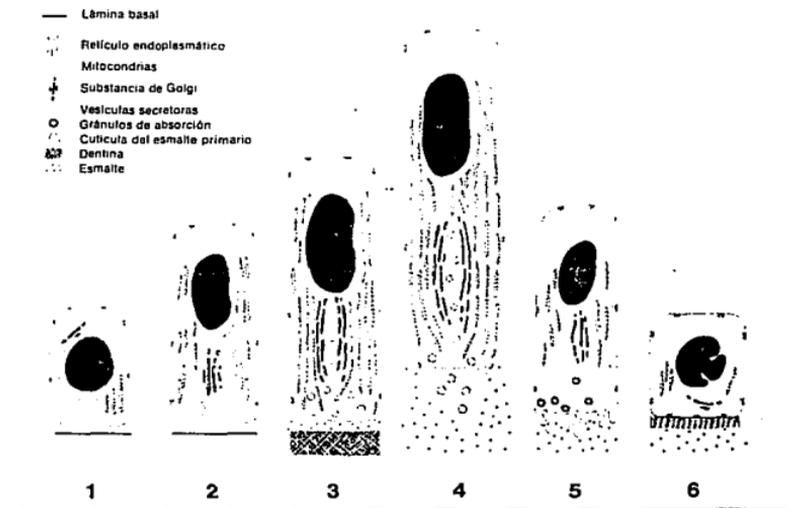


Fig. II.4 Cambios citológicos y morfológicos que ocurren en el ameloblasto durante su ciclo vital.

1. Célula epitelial del esmalte interno. 2. Ameloblasto recién diferenciado antes de la secreción del esmalte. 3. Ameloblasto secretor primario antes de aparecer la prolongación de Tomes. 4. Ameloblasto secretor con prolongación de Tomes. 5. Ameloblasto en maduración primitiva con borde estriado. 6. Célula epitelial del esmalte reducido con hemidesmosomas. Una cutícula de esmalte primario separa la célula de la superficie del esmalte.

Los tres estadios de la amelogénesis principales son el informativo, el madurativo y el agregado mineral.

a) INFORMATIVO, se refiere al período en el que las células diferenciadas a partir del epitelio interno se encargan de secretar matriz orgánica a 0.023 mm por día en promedio, esta se mineraliza casi instantáneamente constando en ese momento de un 65% de agua, 20% de material orgánico (proteína) y un 15% de inorgánico (apatita). La secreción de este esmalte parcialmente mineralizado continúa hasta alcanzar el espesor del esmalte. Al segregarse por primera vez la matriz consta de tres proteínas; la amelogenina hidrofóbica rica en prolina con un peso molecular de 25.000 daltons, la enamulina que es una fosfoproteína ácida glucosada con un peso molecular de 55.000 daltons cuyas proporciones son 19:1 respectivamente (ambas segregadas por la porción cóncava del proceso de Tomes) y las proteínas de los penachos, que se encuentran en el límite amelodentinario. La segregación de matriz produce una disminución del peso molecular de las proteínas, probablemente ocasionada por proteólisis extracelular, aumentando los cristales de ancho. Mineralizándose la matriz hasta un 30%.

b) MADURACION, se produce el crecimiento ulterior de los cristales del mineral y la pérdida de agua y proteínas, comienza cuando el esmalte ha alcanzado su total grosor a nivel cuspideo. La mineralización sigue el mismo orden que la secreción de matriz, comenzando por la unión amelodentinaria, irradiando hacia la superficie externa con mayor velocidad que la secreción de matriz. El material proteico desaparece selectivamente durante la maduración, eliminándose todas las amelogeninas quedando sólo las enamulinas de alto peso molecular fuertemente unidas al cristal de hidroxiapatita y proteínas de los penachos, perdiendo más cantidad de agua, resultando un esmalte altamente mineralizado pero muy poroso.

c) el tercer estadio comprende más AGREGADO MINERAL dado por un mayor transporte de iones a través del órgano del esmalte, se cree que el pasaje del calcio desde el medio extracelular al esmalte es controlado por el órgano del esmalte a diferencia del fosfato que no es controlado por las células puesto que pasa por difusión. La

actividad de la enzima fosfatasa alcalina está asociada a la mineralización (la cual esta dentro de la matriz orgánica), se cree que, cuando se asocia a la membrana celular, la fosfatasa alcalina tiene algún papel en el transporte de iones<sup>2</sup>.

El hecho de que los cristales cambian de tamaño durante la mineralización fué demostrado en 1954 por medio de la microscopía electrónica. Rönnholm (1962)<sup>13</sup> demostró que después de la nucleación los cristales de hidroxiapatita del esmalte crecen rapidamente en largas pero delgadas placas las cuales obtienen su tamaño normal hasta la maduración y que la calcificación del esmalte resulta del ensanchamiento gradual que presentan estos cristales después de la nucleación<sup>6</sup>. Cuando la nucleación ocurre los cristales asumen rapidamente una forma de tablas alargadas cuyas dimensiones son de aproximadamente 1 nm de espesor por 20 a 30 nm de largo inmediatamente comienzan a crecer y a ocupar el espacio disponible. Cuando los cristales se llegan a unir toman una forma hexagonal y crecen preferencialmente a lo largo del eje c en este momento tienen un tamaño de 3 nm por 20 a 30 nm de longitud. El crecimiento continua hasta que presenta espesores de 25 a 30 nm y longitudes de 50 a 60 nm formando de esta manera los prismas<sup>13</sup>.

### II.3. ESTRUCTURA.

Cuando se observa el esmalte con el microscopio electrónico de barrido notamos que esta compuesto por lo que parece ser unas pequeñas fibras (Fig.II.5). Actualmente se conoce que estas son las unidades estructurales del tejido del esmalte y que estan altamente calcificadas, separadas una de otra por una pequeña capa de material orgánico llamada vaina. En esta sección describiremos las estructuras anatómicas que se observan en el esmalte.

#### II.3.1 Los prismas del esmalte.

Histologicamente la estructura del esmalte esta formado por varillas o prismas que son su unidad estructural básica macroscopicamente hablando (Fig.II.6). En el esmalte maduro, la dirección de los prismas es un registro de la trayectoria seguida

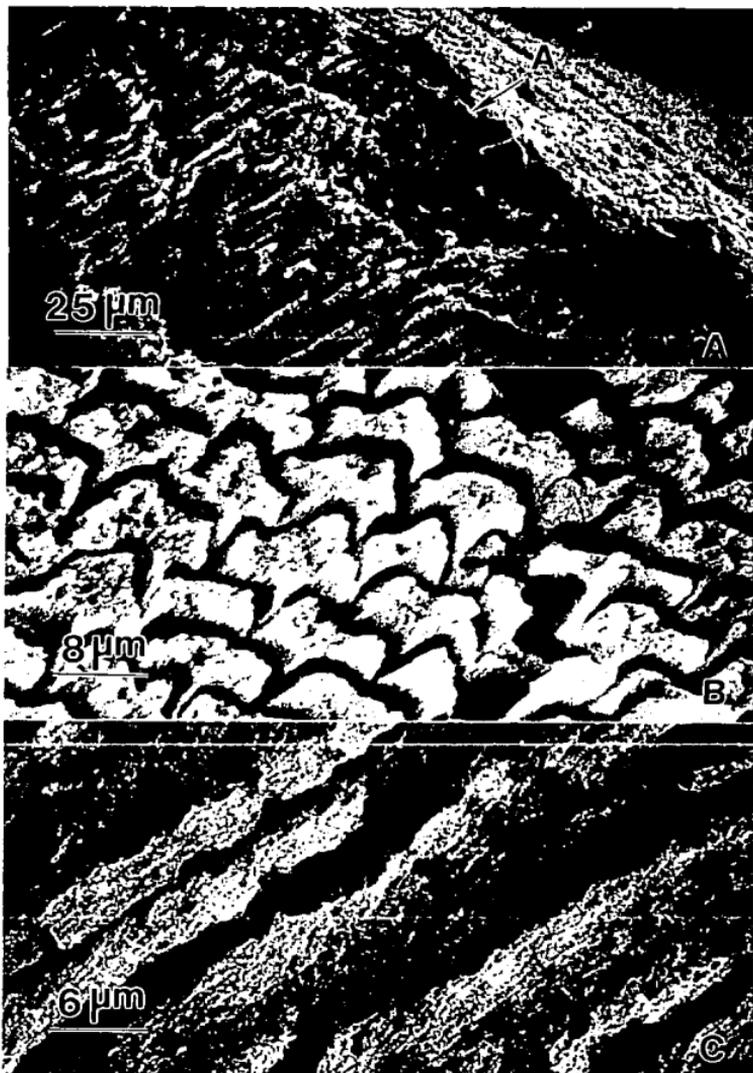


Fig. II.5 Vista superficial del esmalte obtenida por microscopía electrónica de barrido. (A) Vista general. Prismas del esmalte en (B) sección transversal y en (C) sección longitudinal.

previamente por los ameloblastos. Se extienden a través de todo el espesor del esmalte desde la unión amelodentinaria hasta la superficie libre del diente. La mayoría de estos prismas presentan una trayectoria ondulante cerca de la unión amelodentinaria y son relativamente rectos cerca de la superficie exterior del esmalte (Fig.II.7). En las orillas oclusales o incisales los prismas tienen una longitud de 3 a 4  $\mu\text{m}$  y cerca de la porción cervical, donde el esmalte presenta una forma de navaja, los prismas tienen una longitud más pequeña. El espesor de un prisma es de aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  pero este valor varía ligeramente ya que en la superficie exterior del esmalte es cerca de 1.3 veces mayor que el que presenta cerca de la unión amelodentinaria.

Los prismas, observandolos transversalmente, han sido divididos en "cabeza" y "cola". La cabeza de los prismas está en dirección de la superficie oclusal e incisal, mientras que las colas se encuentran en dirección cervical (Fig.II.8). En la figura II.9

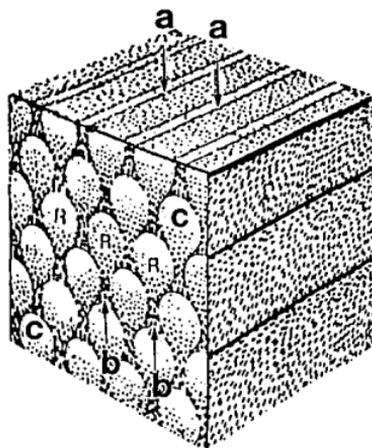


Fig. II.6 El diagrama presenta la orientación de los prismas en el esmalte dental, las flechas, (a) señalan las vainas que rodean a estos prismas, las flechas (b) el espacio interprismático y la letra (c) los prismas. (R) señala la cabeza de los prismas.

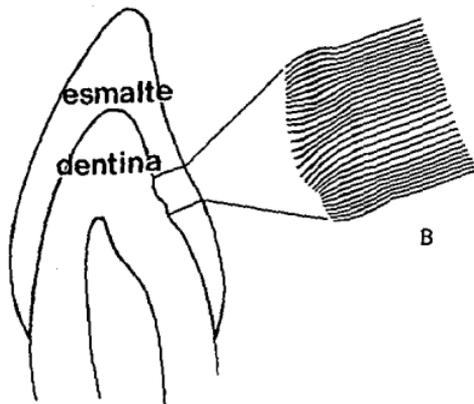


Fig. II.7 (B) Ondulaciones a nivel amelodentinario característico de esta zona por la ausencia de proceso de Tomes al inicio de la formación del esmalte.

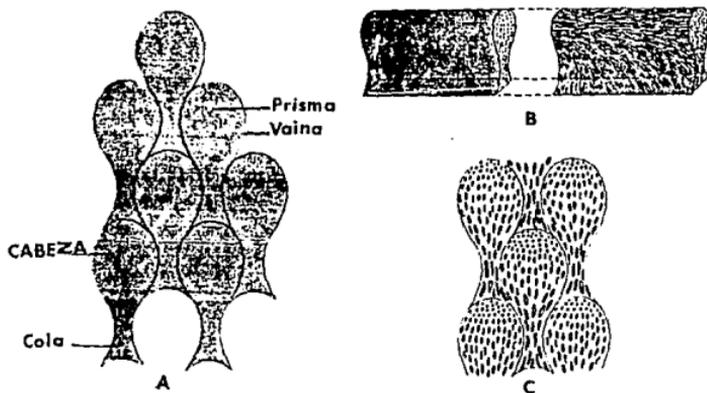


Fig. II.8 (A) Los prismas, su agrupación y su forma. (B) Dirección de los cristales dentro del prisma en sección longitudinal. (C) Dirección de los cristales en el prisma en sección transversal.

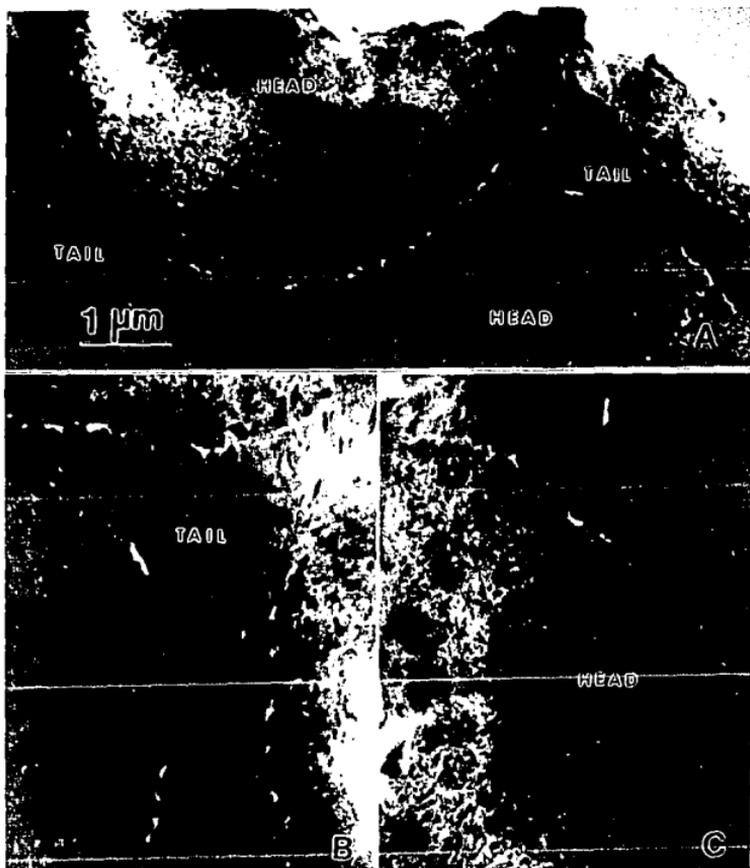


Fig. II.9 Corte transversal de los prismas logranos donde se comprueba su descripción anatómica por microscopía electrónica de transmisión (TEM). A) Cabeza y cola de diferentes prismas. B) Cola del prisma donde se observa diferente agrupación de los cristales en esta zona. C) Cabeza del prisma donde la orientación de los cristales es diferente a la mostrada en (B).

muestran las partes del prisma, por microscopía electrónica de transmisión. La mayor parte de sus características estructurales son el resultado de un patrón altamente organizado de orientación cristalina ya que el prisma se encuentra empaquetado de cristalitos de hidroxiapatita de manera muy compacta (Fig.II.8C)<sup>14</sup>.

La figura I.1 muestra la superficie exterior del esmalte cuando se observa por microscopía electrónica de transmisión en donde los cristales del prisma son notorios. Estos cristales presentan sus ejes mayores paralelos al eje longitudinal del prisma, principalmente los que están ubicados en la cabeza del prisma. Sin embargo hay cristales que se inclinan lateralmente a medida que se aproximan al límite del prisma, en la región intervarillar asociada (Fig.II.10).

Los prismas están separados unos de otros por vainas de 0.1 a 0.2  $\mu\text{m}$  de espesor. Las vainas se forman a lo largo de la interface existente entre grupos de cristales que se encuentran con ángulos diferentes.

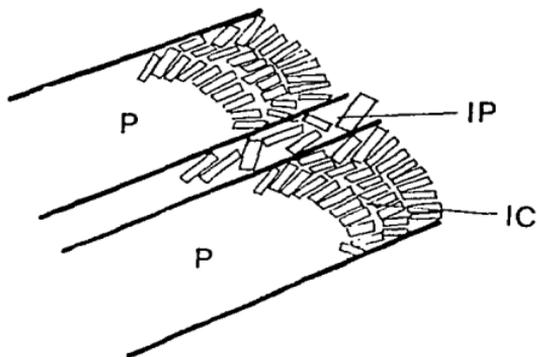


Fig. II.10 Representación esquemática de los cristales de apatita en los prismas del esmalte. (P)prisma, (IP)interprismático e (IC)intercristalina.

La figura II.11 muestra el prisma visto en sección transversal tanto por microscopía electrónica de barrido (Fig.II.11A) y por microscopía electrónica de transmisión. En la figura II.11B el contorno de la vaina y los cristalitas de hidroxapatita contenidos en el prisma son fácilmente observados. La figura II.12 muestra estos prismas pero ahora vistos en sección longitudinal.

La distinción entre los prismas y las vainas de los prismas está basada principalmente en la cantidad relativa de material orgánico y calcificación que presentan. En los prismas los cristales de apatita ocupan casi todo el espacio disponible (Fig.II.13B). Por el contrario, las vainas de los prismas consisten exclusivamente de material orgánico y presentan poco o nada de cristales de apatita.

Los prismas se encuentran apilados en forma compacta, lo que asemeja al patrón hexagonal del panal de abejas. En esta forma la cola de uno de los prismas en la primera hilera interseca la cabeza de dos prismas de la segunda hilera de prismas y toca la cabeza de un tercer prisma de la tercera hilera (Fig.II.14). Las vainas de los prismas se distinguen fácilmente alrededor de la cabeza de éstos pero son borrosas o ausentes en la cola (Fig.II.6). Se piensa<sup>11</sup> que la cabeza del prisma fue formada por ameloblastos individuales mientras que la cola fue producto de 3 ameloblastos, como se muestra en la figura II.14.

Cada prisma tiene un trayecto ondulante. Tienden a mantenerse en hileras dispuestas circunferencialmente alrededor del eje mayor del diente. Los prismas de cada hilera se dirigen perpendicular a la superficie del diente. Aunque los prismas de una hilera corren en direcciones similares, hay un cambio de dirección alrededor de 2 grados entre las hileras sucesivas de varillas, con una ligera inclinación hacia la cúspide a medida que llegan a la superficie externa (Fig.II.15).

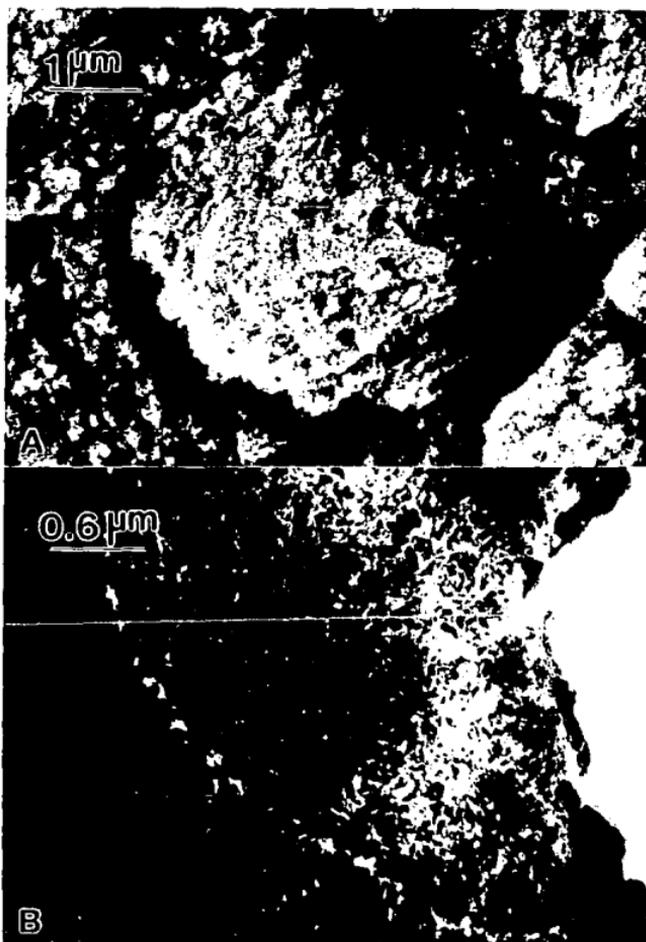


Fig. II.11 Prismas observados tanto por SEM (A) como por TEB (B) en donde en ambas figuras es facilmente observable la vaina del prisma como los cristales dentro de él en ambas figuras. (Corte Transversal).

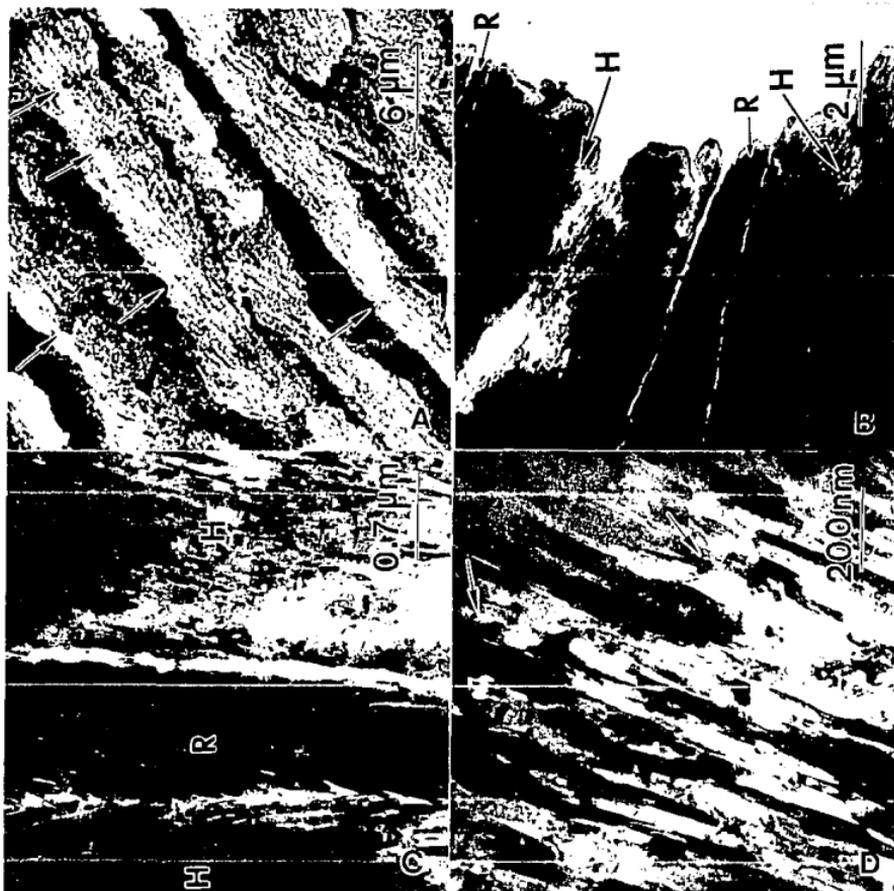


Fig. II.12 (A)Corte longitudinal donde se observan los prismas y sus vainas por MEB. (B)Mismo corte donde se observan la cabeza y cola de los prismas así como sus vainas por MET. (C)Mayor amplificación de la zona mostrada en (B). (D)Dirección de los cristales de apatita en este corte por MET.

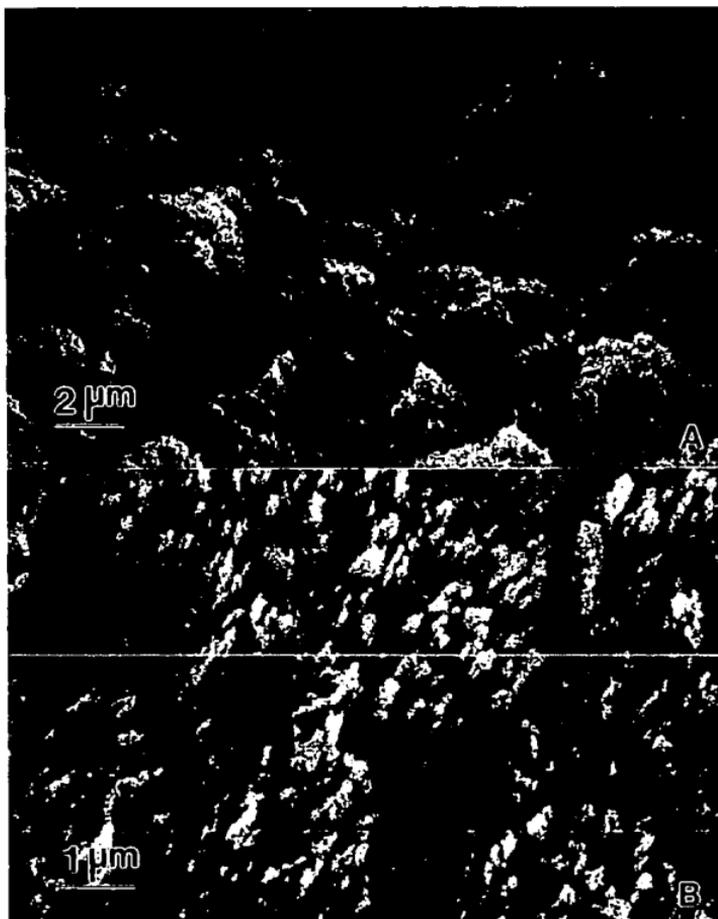


Fig. II.13 En un corte transversal de los prismas por MEB. (A) agrupación de los prismas dentro del esmalte y (B) a mayor amplificación.

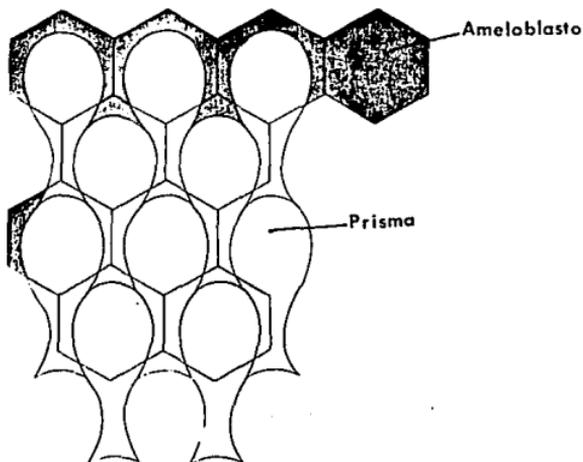


Fig. II.14 Relación entre los ameloblasto y los prismas que producen.

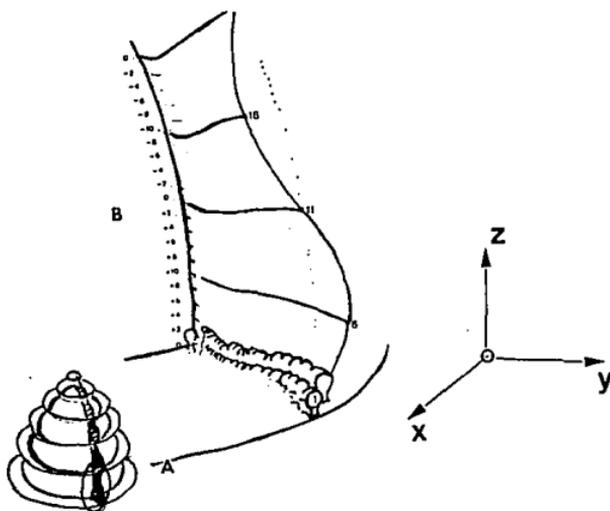


Fig. II.15 Orientación de los prismas. (A)disposición circunferencial de las varillas a lo largo del eje mayor del diente. (B)Cada fila de prismas se inclina ligeramente a medida que las hileras se aproximan a la cúspide. Notese la ondulación que presentan tanto en el plano XZ como en el XY.

Cerca de el extremo cuspídeo las hileras tienen un radio pequeño y su dirección se torna vertical, mientras que en la región cervical principalmente es en dirección horizontal (Fig.11.14). Así también los prismas situados en las cúspides, son más largos que los de las áreas cervicales de los dientes. Se dice que el diámetro de los prismas aumenta desde el límite amelodentinario hacia la superficie al doble de su tamaño<sup>2</sup>.

### II.3.2 Area aprismática.

El esmalte adyacente a la superficie de la dentina y de la superficie exterior se forma antes y después del proceso de Tomes respectivamente y por lo tanto carece de prismas. A esta área se le conoce como esmalte aprismático<sup>15</sup>. El esmalte carente de prismas se ubica en las 30 micras por debajo de la superficie externa del esmalte en los dientes primarios y en el tercio gingival del esmalte de los dientes permanentes. En la figura II.5 la ubicación de la área aprismática esta señalada con la letra A. La formación de esta área está relacionada con el cambio de la forma de los ameloblastos cuando terminan su fase secretoria y cuando empiezan su fase de maduración. Los estudios realizados por microscopía electrónica en esta área indican que todos los cristalitos de hidroxiapatita presentan su eje c perpendicular a la superficie del esmalte<sup>16</sup>.

### II.3.3 Estrías

Cada prisma está compuesto por segmentos separados por líneas oscuras que le dan aspecto estriado. Estas estrías se presentan en ángulos rectos con respecto a los prismas y son visibles en cortes longitudinales. En la figura II.16 y en la figura II:12A las estrías corren en la dirección marcada por la flecha. Estas son estructuras que marcan el diario crecimiento del esmalte y estan separadas una de otra por aproximadamente 4  $\mu\text{m}$ . Este estriado le da una apariencia de escalera al esmalte. Son más pronunciadas en esmalte poco calcificado<sup>16</sup>.

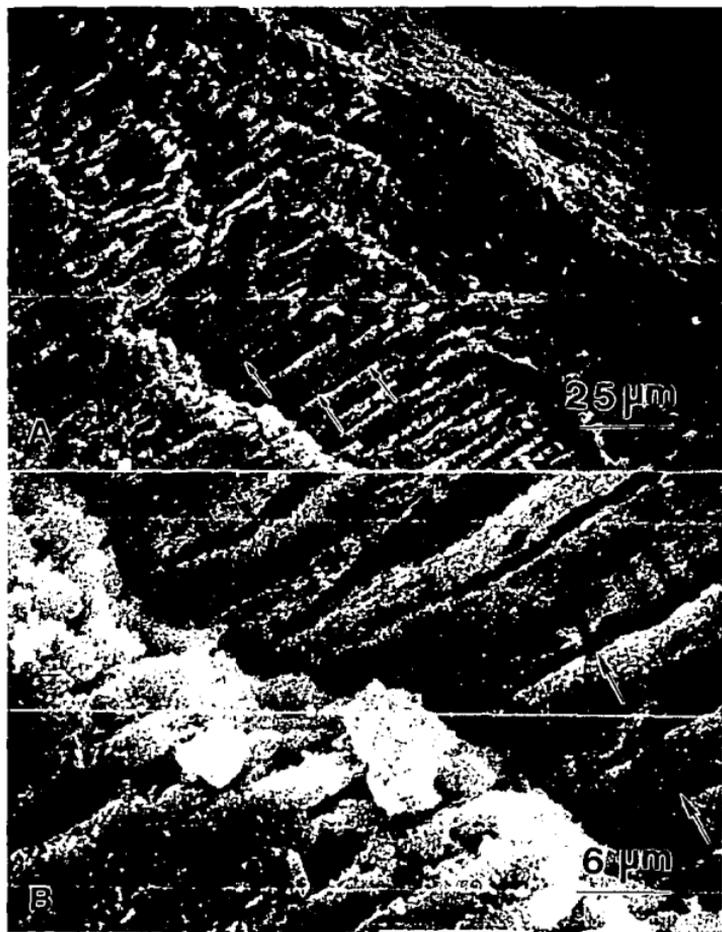


Fig. II.16 Corte longitudinal del esmalte visto por MEB. En (A) se marcan los flechas las estrias que se presentan en los prismas y en (B) se denotan las mismas estructuras pero a mayor amplificación.

### II.3.4 Bandas de Hunter-Schreger

Como ya se comento anteriormente, los prismas presentan una trayectoria ondulante. Los prismas presentan ondulación principalmente en el tercio del espesor del esmalte cercano a la unión amelodentinaria puesto que estas ondulaciones son visibles casi a simple vista, éstas deben de coincidir de grupos de prismas y no debido solamente a un prisma. Estas ondas se presentan alternadas en dirección: unas arriba de un determinado plano se curvean en una dirección tal que se alejan del observador y debajo del plano la dirección es tal que se acercan al observador. Es decir el primer grupo forma convexidades y el segundo grupo concavidades. El plano mencionado es el plano de transición entre ambos grupos y la dirección de los prismas es aparentemente recto. Existe un fenómeno óptico ocasionado por este cambio de dirección de los prismas. Aparecen como bandas alternadamente claras y oscuras de ancho variable (Fig.II.17). Se originan en el borde amelodentinario, dirigiendose hacia afuera. A estas bandas se les conoce como Bandas de Hunter-Schreger y que son rapidamente visibles en cortes longitudinales.

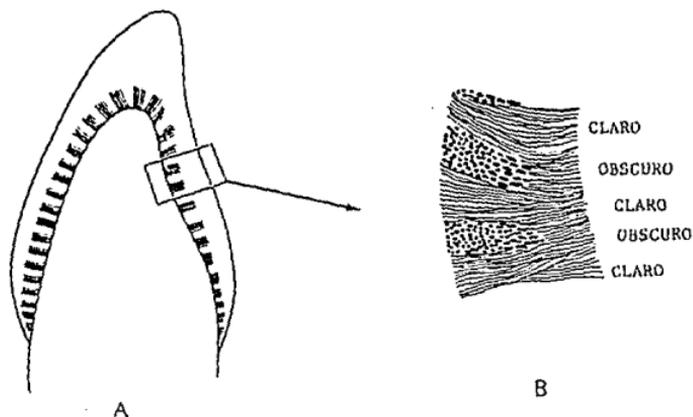


Fig. II.17 Representación esquemática de las bandas de Hunter-Schreger. (B)amplificación del recuadro en A. Los puntos en (B) representan también prismas pero en sección transversal.

La figura II.18 muestra las bandas de Hunter-Schreger en una imagen de microscopía electrónica de barrido. Algunos investigadores sostienen que existen variaciones en la calcificación del esmalte y que coinciden con la distribución de estas bandas<sup>3</sup> sin embargo se han proporcinado pruebas nuevas de que estas estructuras podrían no ser únicamente consecuencia de un fenómeno óptico sino que están compuestas por zonas alternadas que tienen una permeabilidad ligeramente diferente y diferente contenido de material orgánico<sup>17</sup>.



Fig. II.18 Bandas de Hunter-Schreger observadas por MEB (marcadas por flechas).

### II.3.5 Esmalte nudoso

En la región amelodentinaria la dirección de las bandas de Hunter son un poco irregulares y entrelazadas. A esta región el esmalte

se le conoce como anudado. A diferencia de las bandas de Hunter-Schreger, el esmalte anudado se puede observar a lo largo de todo el espesor del del esmalte.

### II.3.6 Líneas de Retzius

Durante la formación del esmalte si el organismo es sometido a strees, enfermedad o nacimiento, el esmalte formado durante ese tiempo muestra algunas irregularidades, principalmente en su calcificación y en el cambio de dirección de los prismas. Esto resulta en líneas de incrementación o de Retzius como comunmente se les conoce<sup>18</sup>. En cortes longitudinales estas líneas se observan en forma concéntrica hacia la cúspide mientras que en corte transversal se observan como anillos concéntricos. Las porciones cervicales de la corona las muestras en un recorrido oblicuo. Desde el límite amelodentinario hacia la superficie se desvian en sentido oclusal. La figura II.19A muestra las líneas de Retzius cuando se les observa por microscopia electronica de barrido a baja amplificación mientras que la figura foto II.19B las muestra a mayor amplificación (las líneas de Retzius han sido marcadas por medio de flechas en estas figuras). Los prismas se doblan cuando cruzan una línea de Retzius. Esto puede ser facilmente observado si se ven las figuras II.19A y II.19B en forma razante en direcciones perpendiculares a las líneas de Retzius.

Las líneas de Retzius en sí marcan la posición de los ameloblastos al momento del strees. El espesor de la línea esta relacionado con el tiempo que duro esta alteración del organismo. Por ejemplo, durante el nacimiento, si este se presenta dificil y prolongado el espesor sera relativamente grande en comparación con un nacimiento normal. A esta línea se le conoce como línea neonatal y se encuentra en todos los dientes de la primera dentición y en los primeros molares de la segunda dentición. ocasionalmente esta línea diferencia el esmalte formado prenatalmente y postnatalmente. Usualmente no existen líneas de Retzius en el esmalte formado en el útero. Por lo tanto la línea neonatal podría ser también el resultado de un cambio brusco en las condiciones ambientales y nutricionales del recién nacido. Es común que el esmalte prenatal este mejor desarrollado que el posnatal<sup>11</sup>.



Fig. II.19 A Y B Imágenes de microscopía electrónica de barrido del esmalte mostrando las líneas de Retzius. (A) En sección transversal. (B) A mayor amplificación.

### II.3.7 Periquimatías.

Microscopicamente se han observado otras estructuras en la superficie externa del esmalte que le dan una apariencia corrugada. A estas estrias se les conoce como periquimatías. Son particularmente prominentes en la porción cervical a la porción media de la corona. Son rodetes, ondulados y se cree son la manifestación externa de las estrias de Retzius<sup>19</sup> (Fig. II.20). Se encuentran alrededor del diente siendo paralelas entre sí. Existen alrededor de 30 periquimatías por milímetro en el límite cementoadamantino, disminuyendo cerca del borde oclusal o incisal. Por lo general su curso es muy irregular.

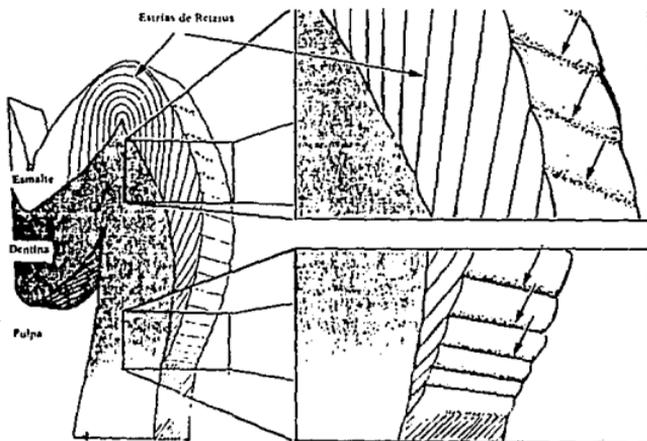


Fig. II.20 Relación que guardan las líneas de Retzius con las periquimatías.

### II.3.8 Penachos y Laminillas.

Los penachos del esmalte, o de Linderer se proyectan en el esmalte en el primer tercio apartir de la unión amelodentinaria, la misma porción en la cual la dirección de los prismas se curva. Se encuentran hipomineralizados y con sustancia interprismática, tienen la apariencia de ramificaciones angostas y acintadas, como

"manojos de pasto". Contienen mayores concentraciones de proteínas del esmalte que el resto de éste<sup>16</sup>.

El número de penachos en la unión amelodentinaria es tan grande que contiene casi de 3 a 4 veces más material orgánico que el resto del esmalte. No se conoce con precisión la causa de la formación de los penachos, pero se sugiere que son producidos por el esfuerzo interno entre los prismas que se presentan durante la formación del esmalte y que es provocado por la calcificación<sup>15</sup>. Sin embargo la razón por la cual se produce este esfuerzo es también desconocido. Quizás los mismos ameloblastos producen estos esfuerzos durante su movimiento en diferentes direcciones, mismos que producen las bandas de Hunter-Schreger.

Las laminillas se originan también en la unión amelodentinaria pero, a diferencia de los penachos, atraviezan todo el espesor del esmalte hasta salir a la superficie de éste. Corresponden a defectos lineales de orientación longitudinal llenos de proteínas del esmalte o de desechos orgánicos de la cavidad bucal y representan esmalte mineralizado impropriamente lo cual es una falla en la remoción del material orgánico durante el desarrollo del esmalte. El origen de las laminillas puede ser, al igual que en el caso de los penachos, los esfuerzos que ocurren durante la madurez del esmalte. Se diferencian tres tipos de lamillas: a) las formadas por segmentos de prismas poco calcificados, b) las formadas por células degeneradas y c) las originadas en dientes erupcionados donde las resquebrajaduras han sido ocupadas por material orgánico.

Queremos resaltar aquí el hecho de que cuando el esmalte se fractura, ya sea en el diente completo o cuando se le retira el soporte proporcionado por la dentina, la fisura pasa por lugares interprismáticos y no prismáticos. Esto se muestra claramente en la figura II.21. Podríamos decir que los espacios interprismáticos forman de cierta manera un plano irregular de clivaje.

### II.3.9 Unión amelodentinaria.

La unión amelodentinaria es la límite que existe entre el esmalte (E) y la dentina (D). Esta se muestra en la figura II.22. que es

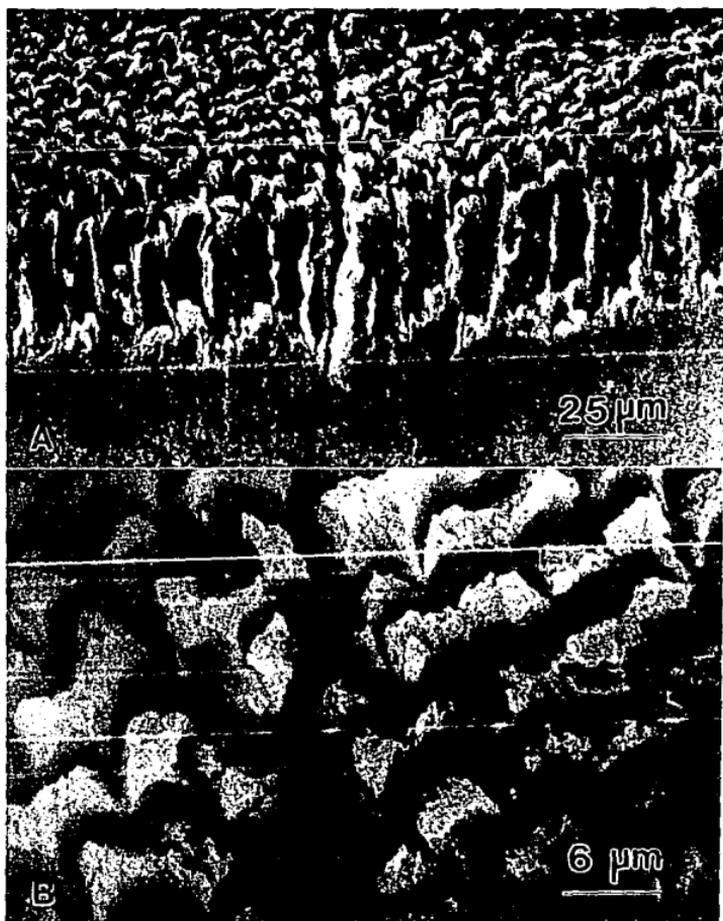


Fig. II.21 (A) Imagen de una fractura del esmalte observada por microscopía electrónica de barrido. (B) Una mayor ampliación. Observe que la fractura pasa por regiones interprismáticas.

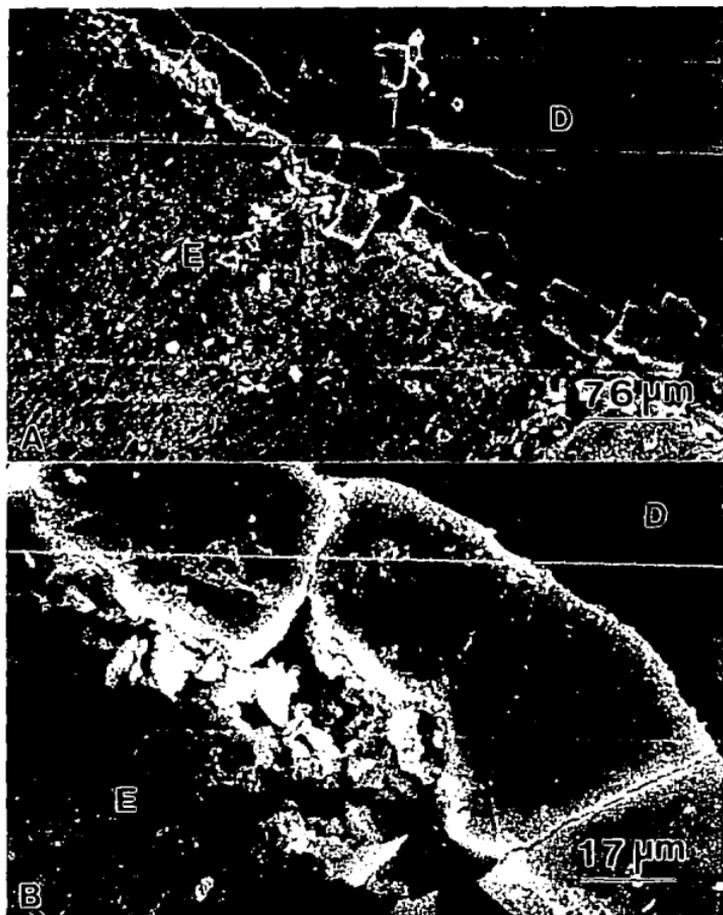


Fig. II.22 (A) Imágenes por MEB de la unión amelodentinaria. (B) Una mayor amplificación. Notese la existencia de una franja en el límite esmalte-dentina. (E) denota esmalte y (D) dentina.

una imagen de microscopía electrónica de barrido. En el límite amelodentinario la superficie de la dentina no es una línea sino que está constituida por concavidades o fositas que se rellenan por material orgánico asegurando la retención del esmalte sobre la dentina. Por lo tanto esta unión se observa con un ondulado. Las convexidades de la línea se encuentran hacia la dentina (Fig.II.23). El proceso de Tomes no es responsable de esta ondulación ya que las onditas corresponden a un número grande de prismas y por lo tanto a un número grande de ameloblastos. Seguramente durante el período de campana avanzado el límite entre el epitelio interno del esmalte y los odontoblastos marcó el futuro límite amelodentinario.



Fig. II.23 Imagen de microscopía electrónica de barrido de la unión amelodentinaria. (E)denota esmalte y (D)dentina.

Existen ocasiones en las que las prolongaciones de los odontoblastos o fibrillas de Tomes pasan a través del límite amelodentinario hacia el esmalte formando conductos de conexión. Debido a que muchas están engrosadas en sus extremos se les denomina husos adamantinos<sup>20</sup>. Parecen originarse en prolongaciones de los odontoblastos que se han extendido hacia el epitelio del

esmalte antes de la aparición de las sustancias minerales. Su dirección corresponde a la trayectoria original de los odontoblastos, es decir, en ángulo recto con respecto a la superficie dentinaria. Dado que los prismas se forman en ángulo con el eje de los ameloblastos, la dirección de los husos y los prismas es divergente. Los husos, a diferencia de los penachos y las laminillas, no están alineados sino distribuidos aleatoriamente a lo largo de la unión amelodentinaria.

#### II.3.10 Material orgánico.

El material orgánico es el componente del esmalte en menor proporción (menos del 1%). Este material está distribuido entre los cristales de apatita y podría observarse por microscopía electrónica de transmisión (MET) si se prepara la muestra especialmente para hacerlo. También se encuentra rodeando los prismas en la llamada vaina.

El material orgánico consiste principalmente de proteínas. Durante el desarrollo del esmalte éste controla la nucleación y orientación de los cristales de apatita. En el esmalte maduro forma la matriz que embebe a estos cristales, dándole la resistencia a la fractura a este tejido.

Las proteínas del material orgánico del esmalte son únicas entre los tejidos mineralizados ya que no son proteínas de colágena<sup>15</sup> como las que se encuentran en el hueso, dentina y cemento. Una descripción de estas proteínas es altamente complicado ya que además ocurren cambios en la razón de aminoácidos durante la eliminación del material orgánico. Generalmente una proteína larga se rompe en pequeñas proteínas y polipeptidos. La terminología corriente se refiere a las proteínas del esmalte en desarrollo como amelogeninas y a las proteínas en el esmalte maduro como enamelinas.

Al menos 2 tipos de enamelinas han sido aisladas<sup>21</sup>. Son muy similares a la familia de proteínas de las queratinas pero no ajustan completamente la composición de los aminoácidos. Un tipo es soluble en ácido fosfórico con un pH neutral y puede ser morfológicamente relacionada a una red fina del material orgánico

que rodea los cristalitas de hidroxiapatita. El segundo tipo de enamulina es extremadamente insoluble aún después de largos tiempos de ataque químico. Histológicamente puede ser asociada a partes estructurales específicas del esmalte como son los penachos y las laminillas.

#### II.4 COMPOSICION QUIMICA.

El contenido inorgánico mayoritario del esmalte es un fosfato de calcio cristalino conocido como hidroxiapatita, que también se encuentra en los huesos, el cartilago calcificado, la dentina y el cemento. La susceptibilidad de estos a ser disueltos por ácidos, provee la base química de la lesión que constituye la caries. En esta sección comentaremos la composición química del esmalte y como su hidroxiapatita no es completamente pura, sino que acepta varios elementos impureza.

##### II.4.1 Apatita del Esmalte.

La química cristalina de la apatita del esmalte es probablemente la más conocida y entendida de las apatitas biológicas. Esta es una apatita imperfecta, baja en calcio e iones de hidroxilo, pero rica en impurezas sustitucionales. Pocas impurezas, como lo es el flúor, son beneficiosas al esmalte pero la mayoría parece romper su estructura. Apesar de la calidad cristalina de la apatita del esmalte, muchos aspectos de su composición y estructura no an sido completamente entendidos por lo cual hay mucho por hacer en este campo para el mejor entendimiento de este biomaterial.

La composición observada del esmalte maduro indica que su apatita se desvía de la composición de la hidroxiapatita en su proporción de sus tres principales elementos  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ , y  $\text{OH}^-$ , además que presenta una variedad de elementos químicos que no presenta la hidroxiapatita. También debe notarse que la razón Ca/P de la apatita del esmalte es generalmente reportado por abajo del valor de  $10/6 = 1.667$  de la hidroxiapatita  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . El valor generalmente aceptado para la superficie del esmalte es de Ca/P = 1.45 y de 1.55 para su volumen del esmalte<sup>7</sup>.

La composición del esmalte dental humano se muestra en la Tabla I

se reportan los componentes mayoritarios de este tejido duro<sup>4</sup>. Podríamos incluir otros elementos a esta lista que se presentan en concentraciones de mil partes por millón como son el Zn y el Si, aunque también otros cuarenta elementos están presentes en pequeñas cantidades<sup>7</sup>. Varios iones tales como  $F^-$ ,  $Cl^-$ , Si (como  $SiO_4^{4-}$ ) y  $Zn^{2+}$  se encuentran cerca de la superficie en altas concentraciones mientras que otros iones tales como  $CO_3^{2-}$ ,  $Na^+$  y  $Mg^{2+}$  aumentan su concentración a partir de la superficie hacia el volumen del esmalte<sup>7</sup>. Muchos otros elementos presentan también gradientes químicos, es decir diferencias en concentraciones que van de alta en la superficie del esmalte y baja en su volumen. Además pocos iones tales como  $K^+$  se encuentran distribuidos aleatoriamente en todo el esmalte. Hasta el momento es difícil establecer la regla que siguen estos elementos en su distribución.

CONSTITUYENTES	ANALISIS
	Porcentaje en peso
Ca	33.6 - 39.4
P	16.1 - 18.0
$CO_3^{2+}$	1.95 - 3.66
Na	0.25 - 0.90
Mg	0.25 - 0.56
Cl	0.19 - 0.30
K	0.05 - 0.30
F	Partes por millón
	Mayor de 50
	5,000 en la superficie
Fe	8 - 218
Zn	152 - 227
Sr	50 - 400
Cu	10 - 100
Mn	0 - 18
Ag	0 - 100
Relación (en peso)	1.92 - 2.17
Relación (molar)	1.5 - 1.68

Tabla No. I Elementos que conforman el esmalte dental humano y sus porcentajes relativos.

En contraste con la mayoría de los elementos mayoritarios de la hidroxiapatita, considerables dudas existen en la cantidad de  $H_2O$ ,  $HPO_4^{2-}$  y  $OH^-$  presente en el esmalte. Sin embargo algunas aproximaciones se han reportado. Por ejemplo, el agua aparece en 1.0 a 2% en peso del total del esmalte fresco. Cerca del 5% del total de fósforo del esmalte está en la forma de  $HPO_4^{2-}$  y su contenido de  $OH^-$  es al menos de 20 a 30% por abajo del contenido máximo de la hidroxiapatita<sup>7</sup>.

Apesar de todo lo anteriormente expuesto, la mayoría de los estudios estructurales y químicos han demostrado que los resultados pueden ser confiablemente interpretados en términos del cristal de la hidroxiapatita. La figura II.24 muestra los patrones de difracción electrónica de la apatita del esmalte tomados en la dirección [0001] (a), [1100] (b) y [1210].

#### II.4.2 La Estructura de la Hidroxiapatita

Las estructuras cristalinas de la hidroxiapatita y la fluorapatita fueron establecidas por Naray-Szabo y col. en 1930<sup>22</sup> y refinada posteriormente por Beevers y Mc Intyre<sup>23</sup>, Kay y col. en 1964<sup>24</sup>. Posteriormente la estructura de la hidroxiapatita, fluorapatita y clorapatita fueron re-refinadas por Young y Elliott en 1966<sup>25</sup>. hidroxiapatita es una definición de la estructura y no de la composición. Pertenece al sistema hexagonal, grupo espacial  $P6_3/m$  caracterizado por un eje de simetría 6 a lo largo del eje "c" y tres ejes equivalentes en el eje "a" con ángulos de  $120^\circ$  entre ellos. Su celda unitaria contiene 10 Ca, 6  $PO_4$ , y dos grupos de OH.  $PO_4$  forma tetraedros. Los 10 átomos de Ca son descritos como CaI y CaII de acuerdo al medio que los rodea: 4 CaI ocupan las posiciones de los niveles  $z = 0$  y  $z = 1/2$ ; 6 CaII ocupan los niveles  $z = 1/4$  y  $z = 3/4$  en conjunto de 3. Los iones OH localizados en las esquinas de la celda están rodeados por dos conjuntos de átomos de calcio (CaII) arreglados en un patrón triangular en los niveles  $z = 1/4$  y  $3/4$ ; por dos conjuntos de tetraedros  $PO_4$  también arreglados en forma triangular en los niveles  $z = 1/4$  y  $3/4$ , y por arreglo hexagonal de átomos de calcio.

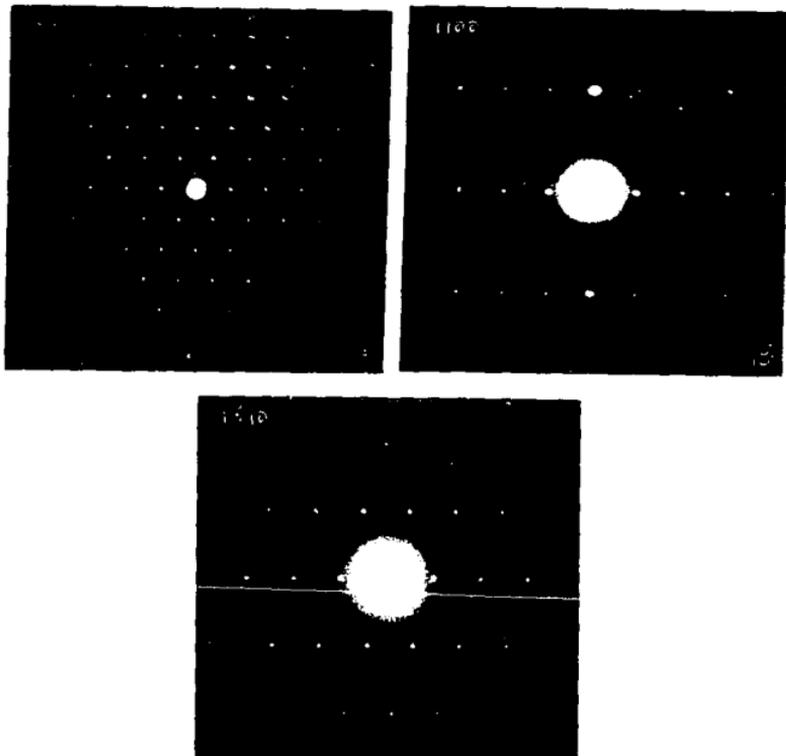


Fig. II.24 Patrones de microdifracción electrónica de los cristales del esmalte los cuales pueden ser indexados tomando como base la celda unitaria de la hidroxiapatita. El número superior izquierdo indica la dirección del haz electrónico con respecto a la celda unitaria de los cristales.

Las posiciones respectivas de los grupos OH son:

O en las posiciones  $z = 0.2$  o  $0.3$  y  $0.7$  o  $0.8$ .

H en las posiciones  $z = 0.06$  o  $0.44$  y  $0.56$  o  $0.94$ .

En la fluorapatita el flúor se encuentra en  $z = 0.25$  y  $0.75$ .

En la clorapatita el cloro se encuentra en  $z = 0$  y  $0.44$ .

La figura II.25 muestra la estructura por capas de la celda unitaria de la hidroxapatita a lo largo del eje c. La tabla II muestra las distancias interplanares, sus correspondientes índices de Miller y sus intensidades relativas de la hidroxapatita. También muestra su celda unitaria y el grupo cristalográfico a que pertenece.

ESTRUCTURA DE LA HIDROXIAPATITA POR CAPAS		
Eje C	Posición a lo largo del eje C	Átomos
6.8 Å°	1	Ca
	0.93	O,H
	0.93	Ca,O,P
	3/4	O
	0.70	O
	0.57	H,O
	1/2	Ca
	0.43	H,O
	0.30	O
	1/4	Ca,O,P
	0.20	O
	0.70	H,O
	0	Ca

Fig. II.25

d	2.81	2.78	2.72	8.17	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$		$\sqrt{I}[\text{Ca}(\text{OH})_2, \text{Ca}_2(\text{PO}_4)_2]$ ★		
1/λ	100	60	60	21	CALCIUM HYDROXIDE ORTHOPHOSPHATE		(HYDROXAPATITE)		
Rad. CuKα	1.5405	Filter	Da 114.5mm	8.17	12	100	1.060	2	400
Camera	171	Photometer	(GUMMIE camera)	5.26	6	101	1.000	6	203
Rad. Diffract.	Techn.	Phys. Dienst, Delft, HOLLAND		4.72	4	110	1.943	30	222
Sys. Hexagonal		S.G. P6 <sub>3</sub> /m (176)		4.07	10	200	1.680	16	312
a = 9.428 Å	b = 6.894 Å	c = 6.894 Å	C.D. 7203	3.88	10	111	1.871	6	320
Ref. 1810.			2.2	3.51	2	221	1.861	40	213
				3.44	40	002	1.806	20	321
				3.17	12	102	1.780	12	410
				2.08	18	210	1.754	16	400, 303
				2.814	100	211	1.722	20	004, 411
θ				2.778	60	112	1.684	4	104
2θ	D 3.08 mp	ly	Color	2.720	60	300	1.544	16	322, 223
				2.631	25	202	1.611	8	313
				2.528	6	201	1.587	4	503, 204
				1.295	8	212	1.682	6	420
				2.212	20	210	1.510	6	320
				2.220	2	221	1.523	16	214, 421
				2.168	10	311	1.474	12	502
				2.134	4	222	1.462	4	510
				2.061	8	312			

Tabla No. II Tabla de rayos x para la hidroxiapatita.

La figura II.26 muestra la celda unitaria de la hidroxiapatita a lo largo de las direcciones [0001] (fig II.26A) y a lo largo de la dirección [1100] (fig. II.26B). En esta figura las posiciones de Ca, P, O y H son mostradas.

Una vez que se cuenta con las posiciones de los átomos en la celda unitaria de cualquier elemento, o compuesto, es muy fácil obtener sus patrones de difracción en diferentes orientaciones por medio de las técnicas de simulación computacional de imágenes<sup>26</sup>. En la figura II.27 se muestran los patrones de difracción simulados de la celda unitaria de la hidroxiapatita en las direcciones [0001] (a), [1100] (b) y [1210]. Comparando estos con los obtenidos experimentalmente de la apatita del esmalte (Fig. II.24) se observa una gran similitud a excepción de las intensidades de algunos puntos.

#### II.4.3 La Estructura de las otras Apatitas

La parte de la estructura de la hidroxiapatita que tiene gran interés para el esmalte desde el punto de vista de las posiciones que pueden ocupar los elementos de impureza es la región alrededor de los sitios  $\text{OH}^-$ . Esencialmente la que forman los iones  $\text{Ca}^{2+}$  y

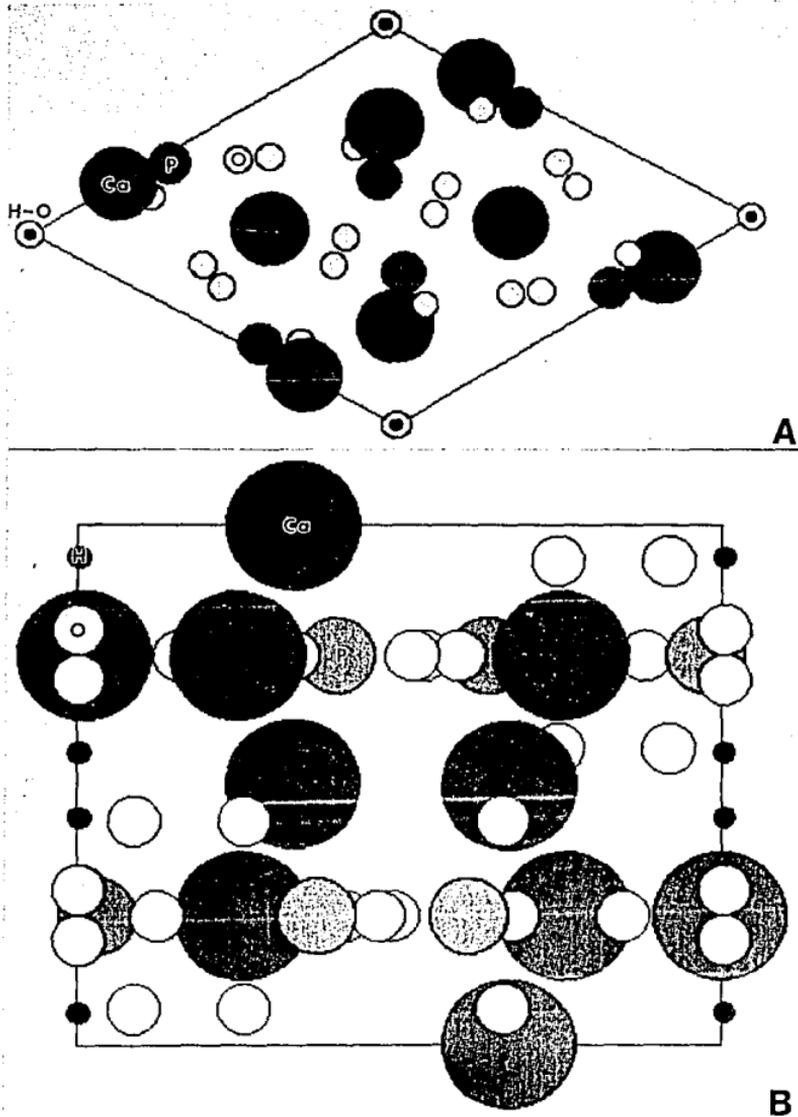
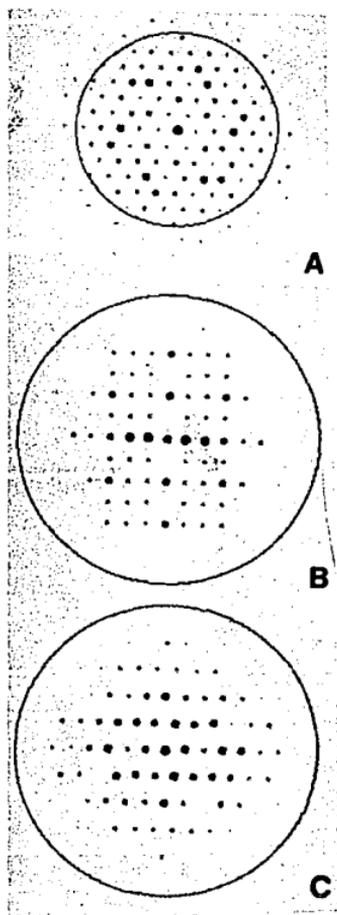


Fig. II. 26 Celda unitaria de la hidroxiapatita obtenida apartir de los datos de Young. (A) vista a lo largo de la direcci3n  $[0001]$ . (B) a lo largo de  $[1\bar{1}00]$ .



**Fig. II. 27** Patrones de difracción simulados apartir de la celda unitaria de la hidroxiapatita mostrada en la figura anterior. (A)[0001], (B)[0001] y (C)[ $\bar{1}\bar{2}10$ ]. Comparece con los patrones experimentales mostrados en la figura II.24.

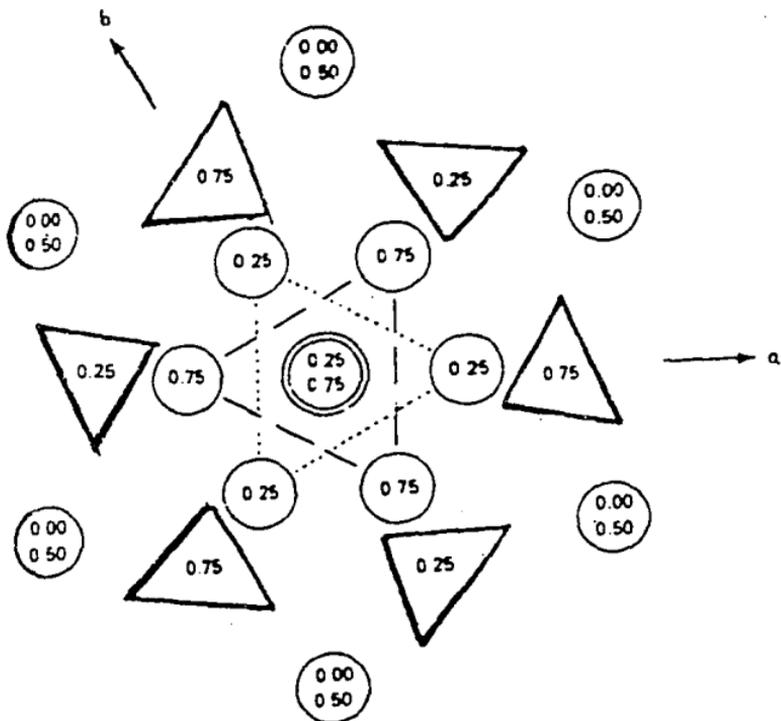


Fig. II.28 Posiciones fundamentales en las estructuras de las apatitas. Los números representan la altura apartir del plano del papel.

$\text{PO}_4^{3-}$  que rodean a la columna de los aniones monovalentes (Fig.II.28).

Las principales diferencias entre las apatitas ocurren en las columnas mostradas con doble círculo en la figura II.28. Los iones de Cl en la cloroapatita ocupan los sitios 0.44 y 0.94. En la hidroxiapatita los grupos polares  $\text{OH}^-$  están orientados con el H ya sea apuntando hacia arriba o hacia abajo en el eje c. Los oxígenos

Los grupos  $\text{OH}^-$  se encuentran ligeramente desplazados de los sitios  $\text{F}^-$  por 0.05 a lo largo del eje c. Así que los aniones  $\text{OH}^-$  están ligeramente arriba o abajo de estos sitios pero no les favorecen puesto que un  $\text{OH}^-$  está ocupando la posición de  $\text{F}^-$  en  $z = 0.25$  el cual tendría su O y su H tanto en 0.20 y 0.06 respectivamente, o en 0.30 y 0.44 respectivamente. En la hidroxiapatita todos los iones  $\text{OH}^-$  están orientados. Sin embargo en la apatita del esmalte ocurren numerosas sustituciones que producen un desorden estadístico con simetría 2 en las posiciones  $\text{OH}^-$  a lo largo del eje c. Por lo tanto la apatita del esmalte presenta propiedades que son muy afines a la simetría hexagonal.

Los círculos sencillos en la figura II.28 representan las posiciones de los iones de  $\text{Ca}^{2+}$ . Tres de cada cinco calcio forman un triángulo equilátero centrado sobre, y perpendicular a, el eje c. Triángulos sucesivos están espaciados por  $3.45 \text{ \AA}$  [en  $z = 0.25$  (línea punteada) y  $z = 0.75$  (línea segmentada)] y están cortados  $60^\circ$  uno con respecto al otro. Los calcio faltantes ocupan sitios en  $z = 0$  y  $0.5$  en columnas paralelas al eje c pero separadas lateralmente por los grupos fosfato. Los triángulos sólidos de la figura II.28 representan los grupos tetraédricos  $\text{PO}_4^{3-}$ . Dos de los oxígenos de cada grupo se superponen en proyección. Los centros están directamente arriba y abajo del ápice más cercano a las posiciones de los iones de Ca. Los otros ápices del triángulo  $\text{PO}_4$  representan los dos oxígenos faltantes. Estos, junto con P, están a la altura dada por el parámetro indicado. Los oxígenos superpuestos están desplazados por 0.18 del plano que forma el triángulo<sup>7</sup>.

Debemos comentar aquí que los patrones de difracción de estas apatitas han sido simulados computacionalmente, de la misma manera en que se obtuvieron los de la hidroxiapatita (Fig.II.27), sin embargo la similitud con los patrones de difracción electrónico de la apatita del esmalte (Figura II.24) no es muy buena como en el caso de los obtenidos a partir de la celda unitaria de la hidroxiapatita. Los patrones de difracción de la fluorapatita es el que más se aproxima, pero las intensidades de sus puntos se desvía bastante de los observados experimentalmente.

#### II.4.4 Sustituciones por Átomos Impureza

Debido a su tamaño los aniones  $\text{PO}_4^{3-}$ , si se dibuja a escala da la apariencia de formar una estructura hexagonalmente compacta, un arreglo intrínsecamente muy estable que probablemente es una de las razones de la habilidad que tiene la red de apatita para aceptar las sustituciones reportadas<sup>27</sup>. Por el contrario el eje OH es probablemente el contribuidor menos importante en la integridad de la red. Consecuentemente los sitios localizados a lo largo de este eje parecen ser los más sensitivos a las sustituciones en la red. Un hecho importante desde el punto de vista estructural resulta de que la mayoría de las sustituciones en la apatita del esmalte se realizan a lo largo del eje c, sin embargo los cambios en dimensiones en este eje son casi despreciables. Por otro lado la expansión del eje a en la apatita del esmalte es significativamente más grande (por cerca de  $0.03 \text{ \AA}^0$ ) que en el caso de la hidroxiapatita. Se conoce que  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ , y  $\text{Cl}^-$  incrementan el tamaño del eje a en las apatitas<sup>28</sup>. Fluor por el otro lado encoge este eje y el anión carbonato puede tanto expandir como contraer la red en esta dirección dependiendo en que lugar se sitúe. Por lo tanto, el efecto de las impurezas pueden ser enmascarados por la presencia de otras impurezas. Todo esto hace difícil determinar cuanto y como una impureza en particular entra en la estructura de la apatita del esmalte solamente tomando en cuenta los cambios de las dimensiones estructurales.

Los elementos minoritarios asociados a las apatitas biológicas del esmalte, éstos son:  $\text{CO}_3$ , Cl, F, Mg y Na. Otros elementos cuya aparición en concentración, se da en partes por millón y son llamadas elementos traza. Asociados con el mineral dentario y presentes en el agua y comida, éstos son descritos con cualidades promotoras o inhibitoras de caries y clasificados tentativamente como:

1. Cariostáticos: B, Ca, Cu, F, Li, Mg, Mo, Sr, Va.
2. Cariogénicos:  $\text{CO}_3$ , Cd, Cl, Cu, Fe, Pb, Mg, Mn, K, Se, Si.
3. Efecto ambigüo: Be, Br, Co, Mn, Zn.
4. Sin efecto: Ba, Al, Ni, Fe, Ti.

Las apatitas sintéticas han sido clasificadas en A o B dependiendo de la sustitución:  $\text{CO}_3$  por  $\text{OH}$  (tipo A) ó  $\text{CO}_3$  por  $\text{PO}_4$  (tipo B). El tipo A es caracterizado por que los ejes a y c son más grandes que en el caso de la celda unitaria de la hidroxiapatita pura. Pequeñas cantidades de  $\text{CO}_3$  en apatitas biológicas se presentan por la sustitución de  $\text{OH}$ , tipo A. Las apatitas biológicas normales son principalmente de tipo B.

Los parámetros de la red de la apatita del esmalte dentario en comparación con el de la hidroxiapatita (0.9441 y 0.9422 nm respectivamente) fué atribuida a la sustitución de  $\text{CO}_3$  por  $\text{OH}$  lo cual causaría una expansión en el eje a mientras que una sustitución tipo B ( $\text{CO}_3$  por  $\text{PO}_4$  acompañado de Na por Ca) causó una concentración. La expansión observada en las dimensiones del eje a de la apatita del esmalte puede ser atribuida por la sustitución parcial de  $\text{Ca}^{2+}$  por  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$  y efectos combinados de cationes más grandes (ejemplo:  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ )

Las regiones cariosas del esmalte fueron reportados presentando alto contenido de  $\text{HPO}_4^{2-}$  y bajo  $\text{CO}_3^{2-}$  con respecto a las regiones normales.

Los parámetros de la red de las apatitas biológicas durante el calentamiento debido principalmente a la pérdida de algunos iones ( $\text{CO}_3$  es liberado como  $\text{CO}_2$ ) y el reacomodo de los iones para formar una apatita más estable.

## MICROSCOPIA ELECTRONICA

Actualmente la microscopía electrónica es una herramienta mundialmente reconocida para la investigación a pesar de su corta aparición (Fig.III.1). Razón de su utilidad en Odontología y sus especialidades. En este capítulo comentaremos brevemente las partes que lo componen, los tipos de microscopios que existen y la herramienta analítica que utiliza.

## Cronología del desarrollo de la microscopía electrónica.

- |   |  |
|---|--|
| <p>1932 Se construyen dos prototipos de microscopios electrónicos, uno con lentes electrostáticas (E Brüche y H Johanson) y otro con lentes electromagnéticas (M Konll y E Ruska). Dos años después Ruska mejora su diseño agregando una lente condensadora y obtiene, por primera vez, mayor resolución que el microscopio de luz.</p> | <p>1940-43 J Hillier y V K Zworykin, A W Vance y L Marton desarrollan y mejoran para la firma RCA de los EUA, el diseño experimental canadiense de A Prebus y J Hillier, y finalmente se comercializa.</p>   |
| <p>1935 H Mahl y E Hall de la Universidad de Toronto, Canadá, construyen otro prototipo de microscopio electrónico.</p>   | <p>1944 M von Ardenne logra fotografías demostrando un poder de resolución de 1.2 y 1.5 nm.</p>  |
| <p>1938 B von Borries y E Ruska construyen un microscopio electrónico mucho más perfecto que resuelve 10 nanómetros (1nm = 10<sup>-9</sup>m).</p>   | <p>1946 J Hillier obtiene 1nm de resolución, es decir, 10 veces más poder que el instrumento de B von Borries y E Ruska. Estos resultados son producto de prolongados esfuerzos por corregir los defectos de óptica electrónica y no podrían ser obtenidos en los microscopios electrónicos comerciales.</p> |
| <p>1939 La firma alemana Siemens y Halske comienza a producir industrialmente el microscopio antes mencionado. La AEG, otra firma alemana, produce industrialmente a pequeña escala el prototipo de H Mahl y C E Hall que es seguido de un modelo más avanzado diseñado por A Prebus y J Hillier.</p>                                   | <p>1947 J Hillier y E G Ramberg diseñan un corrector para una de las principales aberraciones de las lentes electromagnéticas que da posibilidad de que el usuario mantenga la buena calidad del lente objetivo durante la utilización del instrumento.</p>  |

Fig. III.1

## III.1 Interacción haz electrónico-muestra.

Existen varios diseños para un microscopio electrónico dependiendo de la información que se desee extraer de la muestra. La interacción entre los electrones y el sólido determinan diferentes modos de análisis. Las señales que se obtienen al interaccionar el haz electrónico con la muestra son: electrones retrodispersados, electrones secundarios, electrones absorbidos, electrones Auger,

electrones transmitidos, electrones difractados y rayos X característicos (Fig.III.2).

Los electrones retrodispersados y secundarios nos dan información sobre la superficie de la muestra permitiéndonos, de este modo, obtener imágenes topológicas. Los electrones transmitidos y difractados dependen de la estructura interna de la muestra dándonos de esta forma, información de la estructura atómica. Los electrones Auger y los rayos X característicos dependen de la composición química de la muestra, permitiendonos hacer un análisis químico de ella.

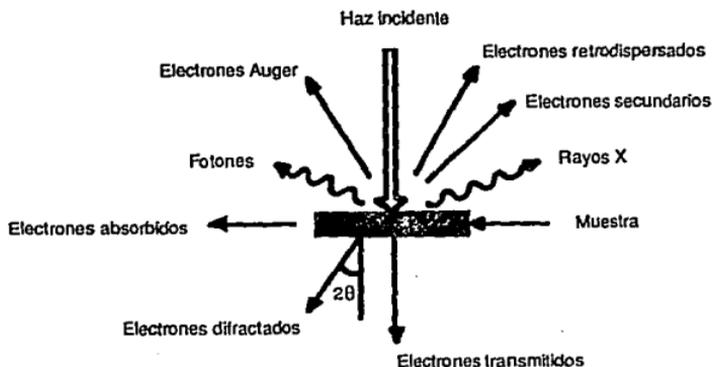


Fig. III.2 Representación esquemática de la interacción haz electrónico-muestra.

Por lo tanto, tenemos dos posibles maneras de formar una imagen: la primera consiste en enfocar el haz sobre una área muy reducida de la muestra y barrer la superficie de la misma, moviendo el haz y detectando en cada zona una intensidad promedio de los electrones retrodispersados, o de electrones secundarios. Esto es principio fundamental lo que se conoce como microscopía electrónica de barrido (MEB).

La segunda forma consiste en iluminar una área relativamente grande (10  $\mu\text{m}$ ) con un haz fijo y adaptar un sistema electro-óptico para la amplificación de la imagen realizada con electrones transmitidos y difractados; esto es lo que se conoce como microscopía electrónica de transmisión (MET).

El instrumento que consiste de microscopía electrónica de barrido y transmisión y que cuente con un detector de rayos X característicos se le llama microscopio electrónico analítico (MEA).

### III.2. Microscopio Electrónico de Transmisión.

El diseño de un microscopio electrónico es semejante al de un microscopio óptico, con la diferencia de que en vez de lentes de vidrio se utilizan lentes electromagnéticas, es decir, bobinas que producen un campo magnético en su centro. Los electrones al pasar por este campo se difractan en la misma forma que un rayo de luz lo hace al pasar por una lente de vidrio (Fig.III.3).

El lugar de la fuente luminosa lo toma el llamado cañón electrónico, que consiste en un filamento de tungsteno o  $\text{LaB}_6$ , el cual emite electrones al ser calentado cuando se aplica una corriente. Estos electrones son atraídos por una placa con un orificio en el centro y con un potencial positivo. Los electrones atraídos hacia esta placa pasan por el orificio central y son enviados a los diversos lentes que componen al microscopio, es decir, una lente condensadora que enfoca el haz electrónico e ilumina la muestra. La lente objetiva es la que se encarga de formar la primera imagen de la muestra y enfocar, Por último una lente intermedia y proyectora en donde se amplifica y se proyecta la imagen en la pantalla.

En Microscopía Electrónica de Transmisión se puede operar: a) para formar imágenes de campo claro y campo oscuro. b) para formar patrones de difracción usando aperturas de área selecta y enfocando las lentes intermedias sobre el patrón de difracción formado detrás del plano focal de las lentes objetivas.

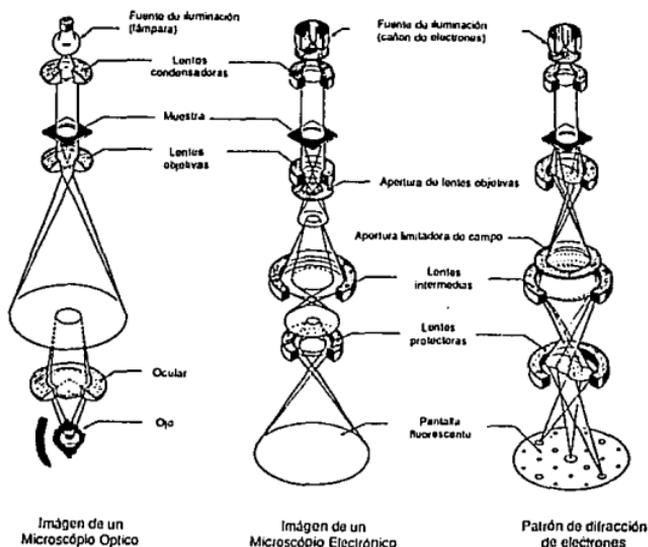


Fig. III.3 Comparación de los componentes de los microscopios óptico y electrónico de transmisión.

### III.3. Microscopio Electrónico de Barrido.

En Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) se enfoca el haz electrónico sobre una pequeña área de la muestra y se barre su superficie moviendo el haz y detectando en cada zona una intensidad promedio de los electrones secundarios. Como se comentó anteriormente, estos electrones son los que nos dan información topológica de la muestra. (Figura III.4).

En este tipo de microscopios el haz de electrones es producido y enfocado sobre un punto de la muestra por 2 lentes condensadoras. La sección transversal del haz es del orden de 10 a 20 nm de diámetro y barre la muestra por una serie de bobinas. Detectando los electrones secundarios y amplificando las señales, por medio de un tubo de rayos catódicos se muestra la imagen, existiendo una

correspondencia uno a uno de los electrones detectados con la intensidad del punto en la pantalla del tubo catódico. El microscopio electrónico de barrido utilizado trabaja con voltajes de aceleración de 10 Kv, 15 Kv, 20 Kv y 25 Kv.

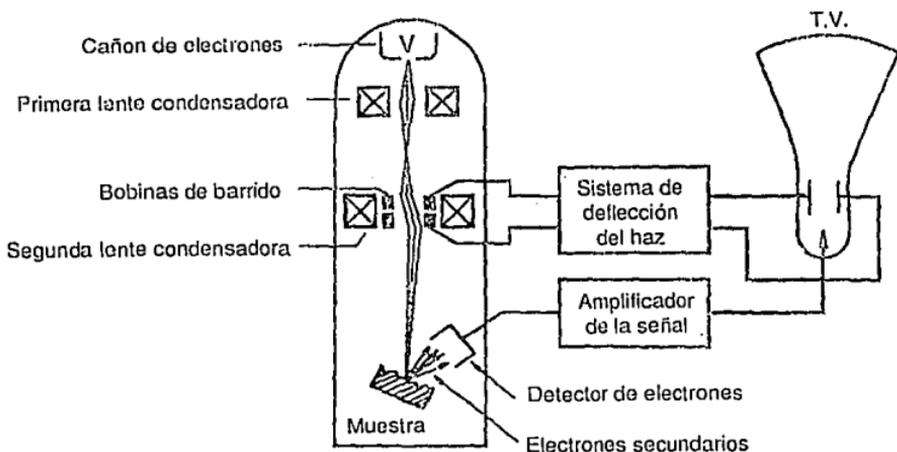


Fig. III.4 Esquema del Microscopio Electrónico de Barrido.  
 III.4. Difractómetro de rayos X.

Los rayos X son ondas electromagnéticas e inicialmente fueron utilizados extensamente en Medicina. No fue hasta 1912 que Von Laue sugirió que un haz monocromático de rayos X que incide sobre un cristal se dispersará en todas direcciones dentro de él.

Debido a la distribución regular de los átomos, en ciertas dirección las ondas dispersadas, de acuerdo con la Ley de Bragg, interferirán constructivamente mientras que en otras lo harán destructivamente, formando de esta manera un patrón de difracción.

El diseño de un difractor de rayos X se basa en el análisis de la Ley de Bragg. Un haz colimado de rayos X incide sobre un cristal a un ángulo determinado y se coloca un detector de modo que registre los rayos dispersados. Si se conoce la longitud de onda de los rayos X utilizados, se puede conocer el espaciamiento entre los planos cristalinos. Por lo tanto, este aparato es de gran utilidad en la caracterización estructural de los cristales. Por lo tanto, su análisis nos permitirá conocer las propiedades cristalográficas de éstos.

### III.5. Rayos x característicos.

Los rayos x son radiación electromagnética cuyo espectro electromagnético está entre 0.05 y 125 KeV y se producen por el bombardeo de electrones a la muestra. Sabemos que el átomo está formado de electrones que se mueven en diferentes niveles o capas de energía alrededor de él. Llamados "K", "L", "M", "N" y "O". La energía de estos niveles decrece conforme aumenta la distancia al núcleo (Fig. III.5).

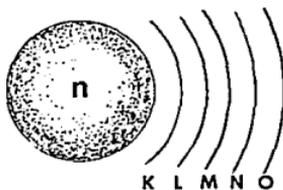


Fig. III.5 Niveles atómicos.

Un átomo está en su "estado base" cuando su energía total es mínima. Cuando los electrones son movidos a niveles de energía no superiores o sacado del átomo, dejando una vacancia en un nivel inferior, se dice que el átomo estará "excitado". Para excitar un átomo el haz electrónico debe tener una energía más alta que la energía crítica para sacar un electrón de un nivel dado. A esta energía crítica se le conoce también como borde de absorción. De esta manera, si el haz electrónico tiene la energía suficiente para excitar los electrones K de un átomo es también capaz de

exitar los electrones L y M. Por lo tanto, las energías de los rayos x característicos son clasificadas de acuerdo con el tipo de transición que las provoca. Por ejemplo, los rayos x "K" resultan de una transición de un electrón de otro nivel hacia el nivel K. Los rayos x "L" resultan de la transición de electrones de otros niveles al nivel L, y así sucesivamente.

También sabemos que existen subniveles de energía dentro de los niveles K, L, M, etc. debido a ligeras diferencias de energía entre los electrones de éstos: el nivel L tiene tres subniveles, el nivel M tiene cinco, el nivel N tiene siete. Ya que cada subnivel tiene diferente energía, los rayos x relacionados con electrones de estos subniveles varían ligeramente. Estas variaciones son tomadas en cuenta y, por ejemplo, los rayos x "K" son subclasificados en  $K\alpha$ ,  $K\beta$  y  $K\gamma$ ; los rayos x "L" son divididos en  $L\alpha$ ,  $L\beta$ ,  $L\gamma$  y  $L\lambda$  y así sucesivamente con la serie M.

La eficiencia de producción de rayos x es baja, razón por la cual si se genera una imagen utilizando la radiación característica de un elemento el tiempo de exposición es  $10^3$  mayor que en el caso de una imagen de microscopía electrónica. Esta es una limitación sería puesto que produce imágenes generalmente muy ruidosas. El poder de penetración de los rayos es, por otro lado, muy alto y todos los fotones que provienen del volumen de interacción contribuyen a la imagen de este tipo limitando su resolución a  $1\mu\text{m}$ . La eficiencia de colección es baja (puesto que los rayos x no pueden ser enfocados con las lentes) produciendo velocidades de barrido lento y tiempos de conteo largos para los análisis cuantitativos.

### III.6. Análisis cuantitativo con rayos x característicos.

El procedimiento normal para hacer el microanálisis de una muestra es comparar la razón de conteo de un elemento dado, primero a partir de una área de la muestra y luego de un espectro estandar del elemento puro o de una aleación de composición conocida. La razón de las intensidades, K, de los elementos de la concentración desconocida con las del estandar es la medida experimental básica. La cuantificación del espectro de rayos x es generalmente

aproximada usando la técnica llamada "de película delgada" sin estándares. En primera aproximación se puede tomar el factor K como la composición química de la muestra, sin embargo éste debe ser corregido tomando en cuenta cinco procesos físicos que son:

1. Corrección de los elementos retrodispersados. Una cierta fracción de los electrones incidentes son retrodispersados en la superficie de la muestra y no pueden producir rayos x. Esta fracción se incrementa con el número atómico de la muestra siendo, por lo tanto, una función de la composición superficial.

2. Corrección del poder de frenado. Está relacionado con la eficiencia de producción de rayos x. El alcance electrónico medio será más grande en un elemento ligero pero la energía de ionización por unidad de masa es alta y la generación de rayos x es baja. Como esta corrección y la primera están controladas por el número atómico son a menudo etiquetadas juntas con el nombre de "corrección del número atómico".

3. Corrección por absorción. Los rayos x son generados a varias profundidades a través del volumen de la muestra. La intensidad que escapa de la muestra depende de la cantidad de absorción que experimenta durante su paso hacia la superficie. Esto dependerá del volumen de interacción, de la absorción del material y de la longitud de onda de los rayos x que serán examinados. La longitud de la trayectoria de absorción también depende del ángulo de incidencia del espectrómetro. Esta corrección es considerada la más importante.

4. Corrección de la fluorescencia característica. Los rayos x son producidos tanto por electrones como por otros rayos x. La emisión de alguna línea característica será causada por el haz electrónico y por alguna línea característica de otro elemento de la muestra. La magnitud de este efecto depende de la composición de la muestra.

5. Corrección de la fluorescencia continua. Proviene de la continuidad de la radiación presente. Es normalmente separada de

la corrección de la fluorescencia característica debido a que se calcula diferente y porque es la más pequeña de las correcciones y, por tal razón, frecuentemente ignorada produce el contraste, es decir variaciones entre blanco y negro que dan como resultado los tonos fotográficos.

### III.7. Microanálisis por pérdida de energía de los electrones (EELS).

La probabilidad de que el haz incidente pierda una cantidad de energía dada al interactuar con la muestra depende de los elementos constituyentes y el espesor de ésta. La respuesta de la muestra a esta pérdida de energía depende del ambiente electrónico, químico y estructural que rodean a sus átomos. Por lo tanto es factible pensar en la utilización de este tipo de información para realizar un análisis estructural de la muestra. Este tipo de análisis se le conoce como "espectroscopia por pérdida de energía de los electrones" (EELS: electron energy loss spectroscopy) y el cual actualmente representa una herramienta muy importante en la caracterización de regiones microscópicas de sólidos inhomogeneos. Este tipo de análisis involucra el paso de los electrones a través de la muestra, la medida de la distribución de la energía y el ángulo de dispersión de los electrones transmitidos. La energía perdida por el haz incidentes es igual a la energía ganada por los electrones de la muestra. El tipo de información que se puede obtener son entre otros: la distribución de los elementos ligeros, el espesor de la muestra, el tipo de enlace existente entre los átomos que constituyen a ésta y su estructura electrónica (Fig. III.6).

El análisis por pérdida de energía electrónica es realizado por medio de un espectrómetro adecuado el cual puede separar las señales provenientes de los electrones dispersados elásticamente (pierden una cantidad despreciable de energía cuando pasan a través de la muestra) de acuerdo a su energía y/o a su momentum.

El análisis por pérdida de energía de los electrones puede realizarse en el microscopio electrónico de transmisión de dos modos distintos: a partir de la imagen de la muestra o del patrón

de difracción de ésta. Si se usa el modo imagen entonces la medida de su origen es igual al campo de visión, es decir, el área iluminada. En este modo la región a analizarse está limitada a cambios tanto en la combinación de la amplificación con la apertura objetiva como de la sección transversal del haz electrónico al observar la imagen. En el modo de difracción el ángulo de resolución deseado y el ángulo de dispersión del haz electrónico son obtenidos fácilmente seleccionando la combinación de la longitud de cámara y el tamaño de la apertura objetiva mientras se observa el patrón de difracción de área selecta en la pantalla.

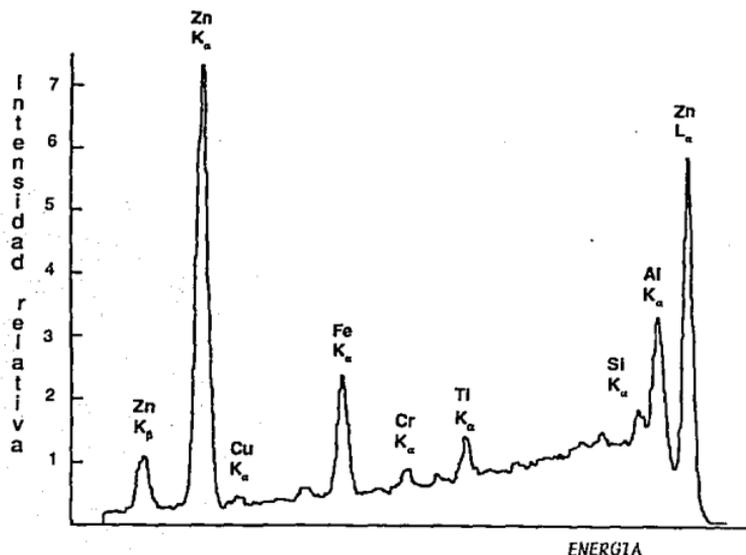


Fig. III.6 Espectro de EELS que despliega la computadora: representa una gráfica de intensidad contra energía.

### III.8. Cristalografía.

En 1665, Robert Hooke representó las formas características de los cristales colocando balas de mosquete en pilas, en la cual cada bala representaba un átomo. Los átomos están unidos por fuerzas primarias o secundarias. En estado sólido, se combinan de manera que aseguran un mínimo de energía interna; en consecuencia, forman una estructura de espacios regulares que se conoce como red espacial o cristalina<sup>29</sup> (Fig.III.7).

Por lo tanto una red puede ser pensada como el resultado de repetir periódicamente una celda primitiva o celda unitaria (Fig.III.9). Por ejemplo, ya que existen catorce formas posibles, en nuestro caso nos apoyaremos en la figura F. El estudio de esta celda unitaria nos conviene para simplificar los cálculos o para exhibir la simetría del cristal. Se puede definir la red espacial como la disposición de átomos en el espacio, de manera que cada átomo está situado en forma similar a cualquier otra celda. Las redes espaciales son producto de uniones de con los átomos. Cristales son aquellos cuyos átomos que lo forman se repiten periódicamente. Es posible describir analíticamente muchas características del cristal, haciendo referencia a sus planos y direcciones cristalinas.

Para el estudio de los cristales fué necesario implementar un sistema de símbolos convencionales y poder describir así su orientación en el espacio. Estas necesidades son cubiertas con los llamados índices de Miller (números naturales). Estos nos sirven para identificar los planos y direcciones cristalográficas en las que se está observando el cristal. Las direcciones se denotan por  $\{u\ v\ w\}$  y los planos por  $\{h\ k\ l\}$ . Los índices de Miller para planos cristalográficos se obtienen de la intersección que forman los planos con los ejes coordenados, pero siendo proporcionales no a los números que denotan la intersección sino a sus recíprocos.

#### EJEMPLO:

$x=1$	$1/x=1/1 = 1 \Rightarrow$	$x=1$	>Dirección $\{111\}$
$y=1$	$1/y=1/1 = 1 \Rightarrow$	$k=1$	>Plano $\{111\}$
$z=1$	$1/z=1/1 = 1 \Rightarrow$	$l=1$	

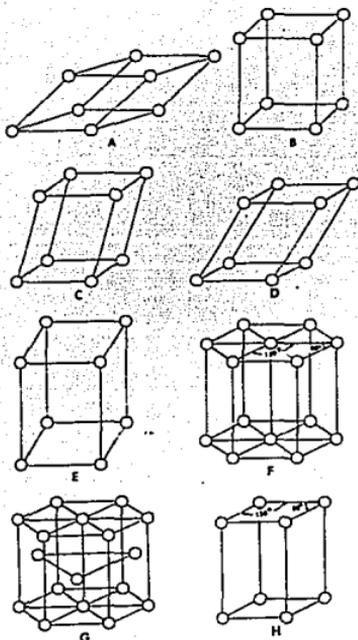


Fig. III.7 Posibles tipos de red simple. La red "F" representa la red del correspondiente al cristal del esmalte.

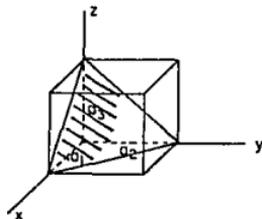


Fig.III.8 Celda Unitaria en el espacio.

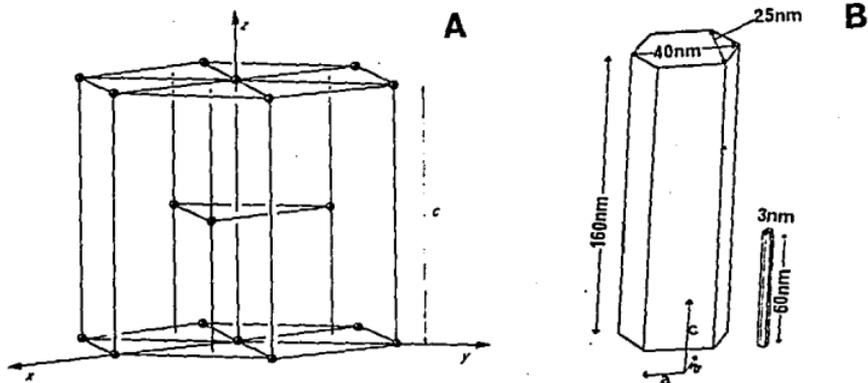


Fig.III.9 (A)Celda Unitaria del cristal hexagonal y sus principales planos y direcciones. (B)Celda unitaria del cristal del esmalte, las dimensiones presentadas son las más representativas.

### III.6 Difracción de electrones.

El fenómeno de la difracción ocurre cuando al incidir un haz de electrones sobre un cristal este haz se dispersa. Estos haces dispersados interfieren constructivamente en determinadas direcciones de acuerdo con la Ley de Bragg.

La Ley de Bragg es una ecuación muy importante en difracción, nos da la condición para que exista interferencia constructiva de la radiación incidente después de interactuar con la muestra, la cual es:

$$2d \operatorname{sen}\theta = n\lambda$$

Donde  $d$  es la distancia entre los planos de la red en la dirección de incidencia y  $\theta$  es el ángulo entre el haz incidente y la interferencia del cristal. Nos indica que la interferencia constructiva entre los rayos AC y DF se da cuando las diferencias de caminos ópticos de la radiación dispersada por planos sucesivos es un múltiplo entero  $n$  de la longitud de onda. Esto es, el rayo DF recorre una distancia GE + EH más que el rayo AC,

entonces la diferencia de caminos recorridos es de  $2d \sin \theta$ . La reflexión de Bragg sólo ocurre para longitudes de onda tales que  $\lambda < 2d$ . (Fig.III.10).

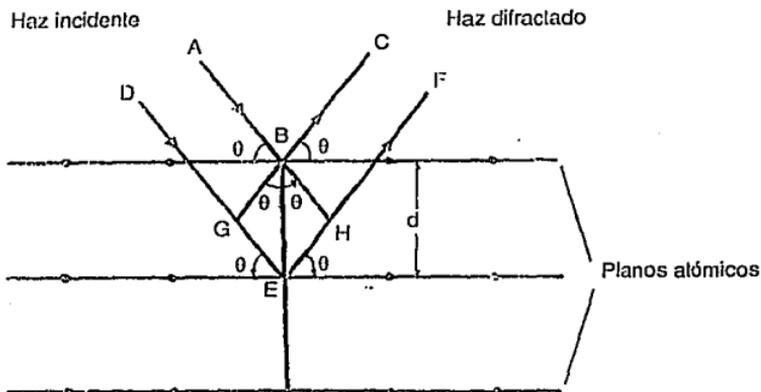


Fig. III.10 Esquema de la interacción haz electrónico-muestra para deducir la Ley de Bragg.

Los patrones de difracción que constan de un arreglo de puntos luminosos, son típicos de monocristales. Significa que sólo un cristal difracta el haz. Si el haz electrónico es bastante ancho o la muestra está formada por varios cristales pequeños orientados aleatoriamente, es decir una muestra policristalina, el patrón de difracción consistirá de anillos concéntricos cuyos diámetros corresponden el espacio que existe entre los planos atómicos del cristal.

Un patrón de difracción da dos tipos de información principalmente:

- 1- El arreglo espacial, definido en función de la simetría que

presenta el patrón, de los valores de las distancias que existen entre los puntos de difracción y el punto central, y los ángulos que se forman entre las líneas que van del centro a cada una de los puntos.

2- La cristalografía, a partir de un conjunto de patrones de difracción obtenido en diferentes orientaciones de la muestra y las intensidades de la muestra. Así, al hacer una comparación entre las intensidades entre los diferentes puntos difractados y los patrones de difracción es posible obtener la celda unitaria que presenta el cristal analizado.

### III.7. Indexación de patrones.

La forma de asignar los índices de Miller (h k l) a los puntos o a los anillos de un patrón de difracción es lo que se conoce como indexación.

La obtención de un patrón de difracción en un microscopio electrónico en primera aproximación es mostrado en la figura III.11. En donde R es la distancia entre el haz más intenso del patrón es decir el haz transmitido, y un punto de difracción.

La ecuación  $Rd = \lambda L$  relaciona las distancias interplanares d en el cristal con distancia R en el patrón de difracción.  $\lambda L$  es llamada constante de cámara la cual es fácil de calcular puesto que L es generalmente dada por el instrumento. Al conocer el voltaje de aceleración  $\lambda$  queda fija. Por lo tanto, podemos obtener una lista de distancias interplanares del cristal y comparar sus valores con tablas de distancias para diferentes cristales (aquellas obtenidas a partir de análisis de rayos x) y encontrar el tipo de cristales que se trata.

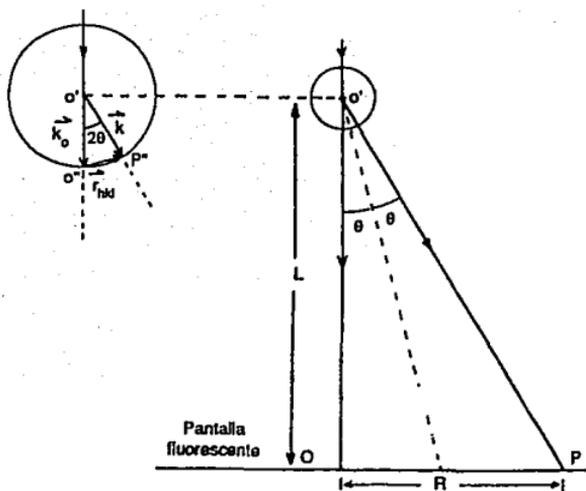


Fig. III.11 Esquema que representa la longitud de cámara ( $L$ ) y la distancia del haz transmitido en cualquiera de los puntos difractados ( $R$ ).

DESARROLLO EXPERIMENTAL

El proceso experimental utilizado para la preparación de muestras del esmalte es el mismo que se utiliza para la preparación de muestras cerámicas para su observación por MET. En este capítulo describiremos los pasos a seguir para producirlas.

IV.1 Obtención de los dientes a estudiar.

La recolección de nuestras muestras se realizó en la Clínica de Exodoncia y el Departamento de Odontopediatría de la Facultad de Odontología. Desde el momento de su obtención hasta que fueron utilizados se conservaron en agua destilada.

Se utilizaron cuatro molares temporales de 10 años, cuatro premolares de 15 años y cuatro molares de 76 años todos libres de caries. De cada pieza dental se obtuvieron mínimo cuatro muestras para analizarlas por microscopía electrónica de barrido y de transmisión, así como para rayos x.

IV.2. Muestras para Microscopía Electrónica de Barrido.

Las muestras preparadas para el microscopio electrónico de barrido se obtuvieron primero mediante una recortadora de diamante. El tamaño de las muestras fueron de aproximadamente 1cm de largo procurando abarcar el espesor del esmalte, y en otras ocasiones se ocupo el total de la corona previo un corte longitudinal del total de la pieza dentaria. Posteriormente fueron desbastadas y pulidas mecánicamente (DIMPLER 200, E.A. Fishione), grabadas con ácido fosfórico durante un minuto y por último se les cubrió con una capa delgada de oro. El ataque tiene como objetivo el realce de las estructuras del esmalte.

IV.3. Muestras para Microscopía Electrónica de Transmisión.

La preparación de muestras para microscopía electrónica de transmisión fueron obtenidas realizando cortes con disco de diamante hasta obtener bloques de 0.3 x 0.3 x 0.1 cm después se realizó un desgaste mecánico hasta lograr un espesor de 60 micras.

Por último se desgastó con una pulidora iónica (Dual Ion Mill. Mod. 600. GATAN) para obtener una perforación en el centro de la muestra de aproximadamente 13 micras (Fig.IV.1).

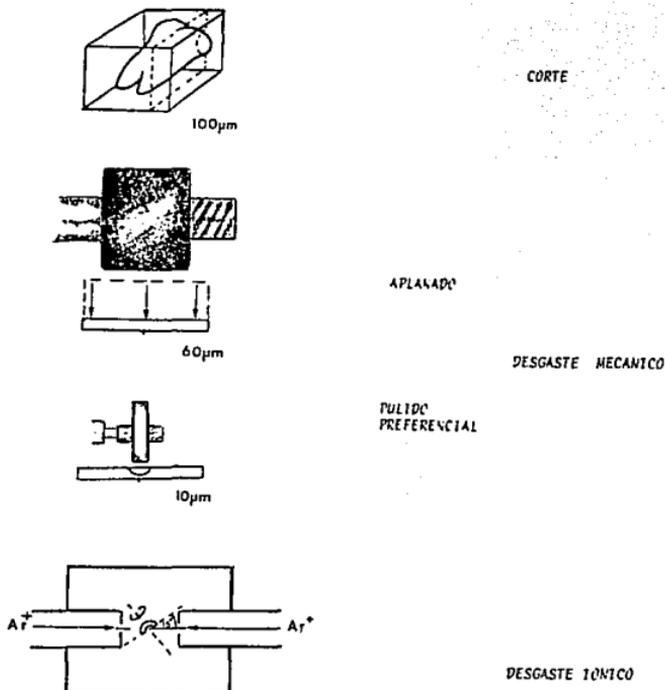


Fig. IV.1 Esquematación de la técnica utilizada para preparación de muestras de microscopía electrónica de transmisión.

En el caso de las muestras para el microscopio electrónico deben ser suficientemente delgadas para que sean transparentes a los electrones. Estos espesores son del orden de 10 a 150 nm.y una mayor zona de análisis.

De cada edad fueron realizadas dos muestras; una en corte transversal y otra en corte longitudinal con respecto al eje de

los prismas (Fig.IV.2). Las muestras para microscopía electrónica de transmisión convencional fueron las mismas para el análisis de alta resolución.

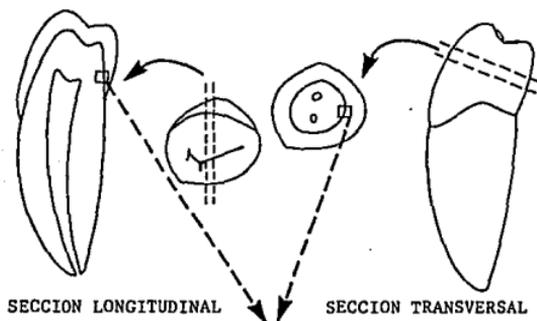


Fig. IV.2 Tipos de cortes realizados a las piezas dentarias para la obtención de muestras.

#### IV.4. Muestras para rayos X.

En el análisis de muestras dentarias por rayos x, se utilizó un Difractómetro Siemens D 500. Las piezas dentales fueron pulverizadas con un motor de baja velocidad (AMERICAN) y una fresa de diamante tomando dos piezas dentarias de cada edad. Así también se realizaron dos muestras en pastilla de cada edad en dos diferentes direcciones: longitudinal y transversal con respecto al eje del prisma. Mientras que para el microanálisis por medio de EDX las muestras fueron realizadas en pastillas siguiendo la misma preparación que las de barrido a excepción que se les aplicó una capa de carbón. Tomando una muestra de cada edad de la porción cuspídea en sección transversal.

#### IV.5 Equipo utilizado.

El microscopio electrónico de transmisión utilizado fué JEOL 100CX, el cual tiene un porta muestras de doble inclinación que nos permite inclinar la muestra  $\pm 60^\circ$  dentro de una esfera. Las imágenes de alta resolución fueron obtenidas con un microscopio

electrónico de transmisión JEOL 4000EX de alta resolución MEAR (Fig. IV.3). Para el análisis por microscopía electrónica de transmisión convencional fué utilizado un microscopio 100 CX MET (Fig.IV.4). El microscopio electrónico de Barrido utilizado fué de la marca JEOLT-5200 MEB (Fig.IV.5).

El desvastador iónico utilizado para la preparación de las muestras de transmisión fué un Dual Ion Mill y se muestra en la figura IV.6.

En la figura IV.7 el Difractómetro utilizado para el análisis de rayos x.

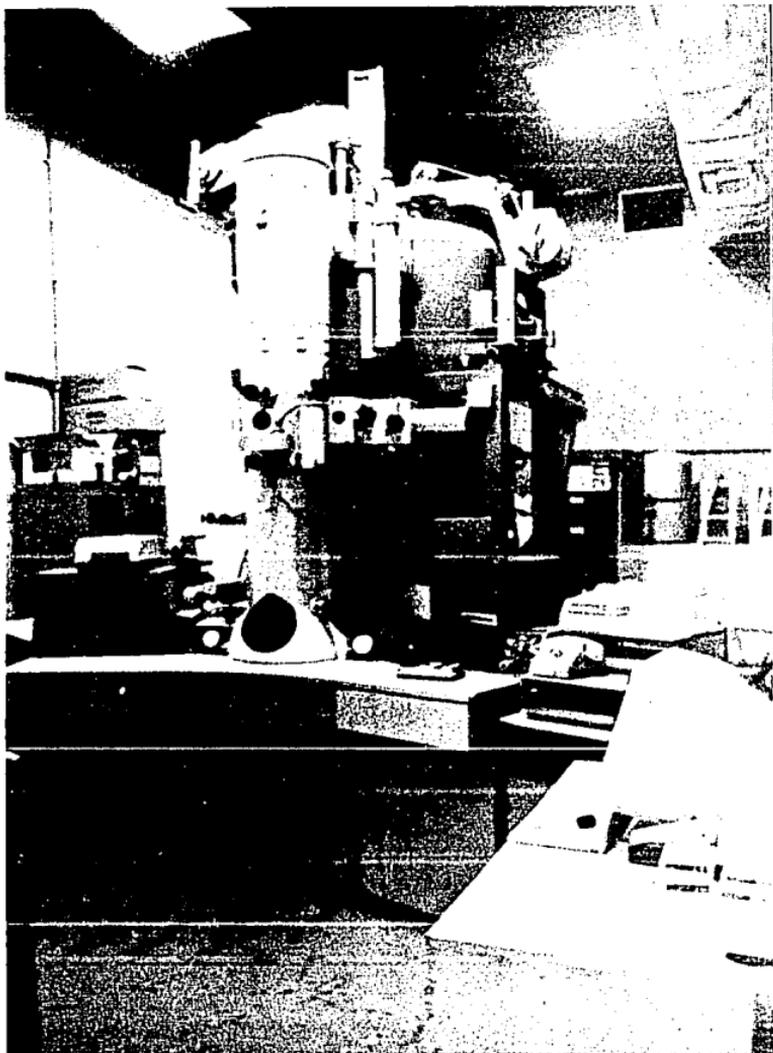


Fig. IV.3 Microscopio Electrónico de Alta Resolución.

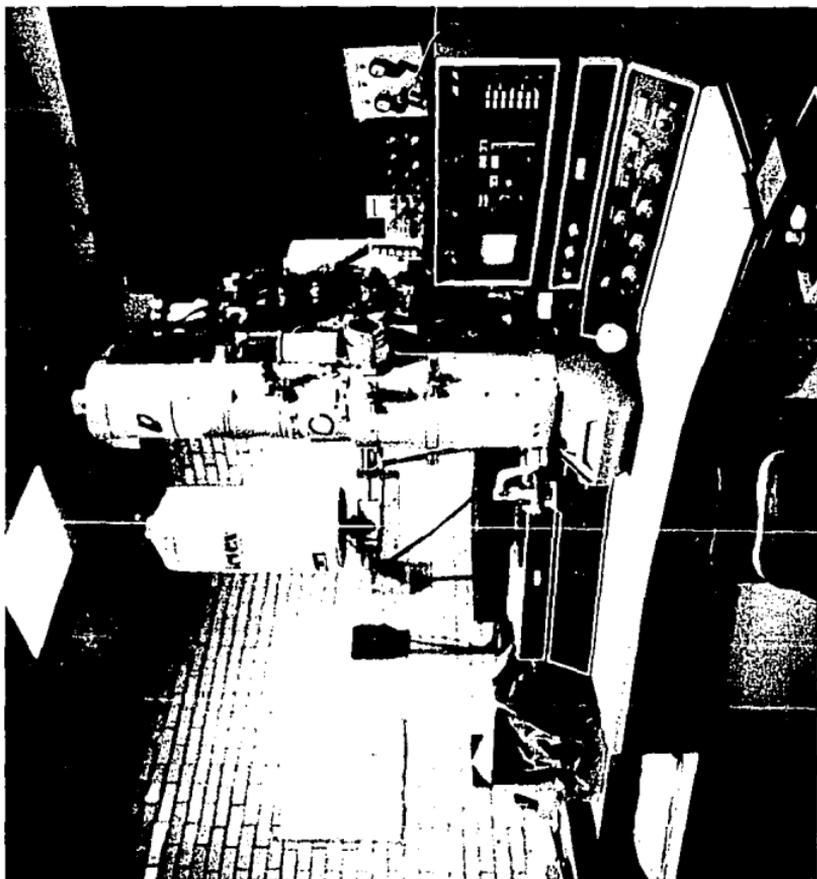


Fig. IV.4 Microscopio Electrónico de Transmisión.

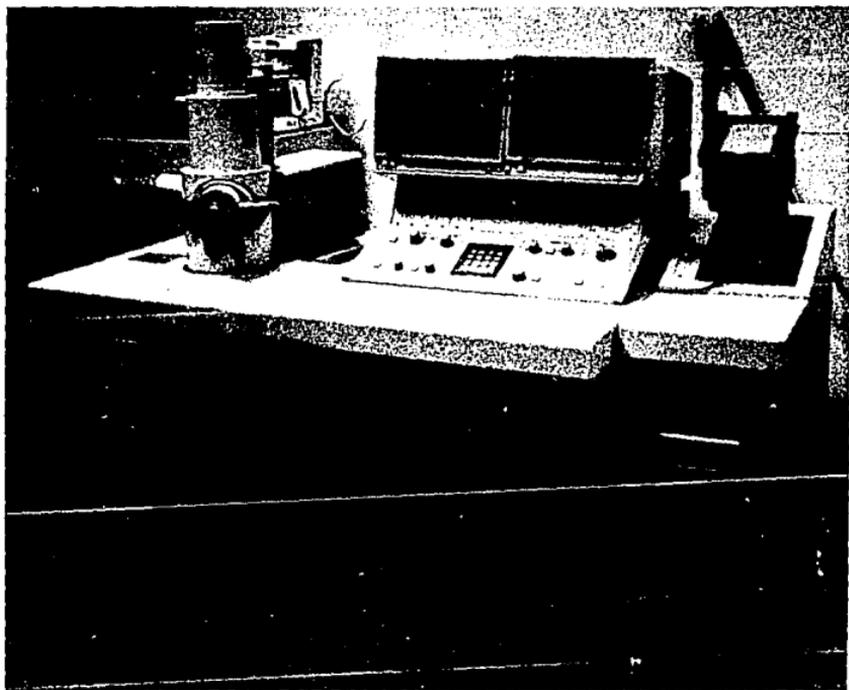


Fig. IV.5 Microscopio Electrónico de Barrido.

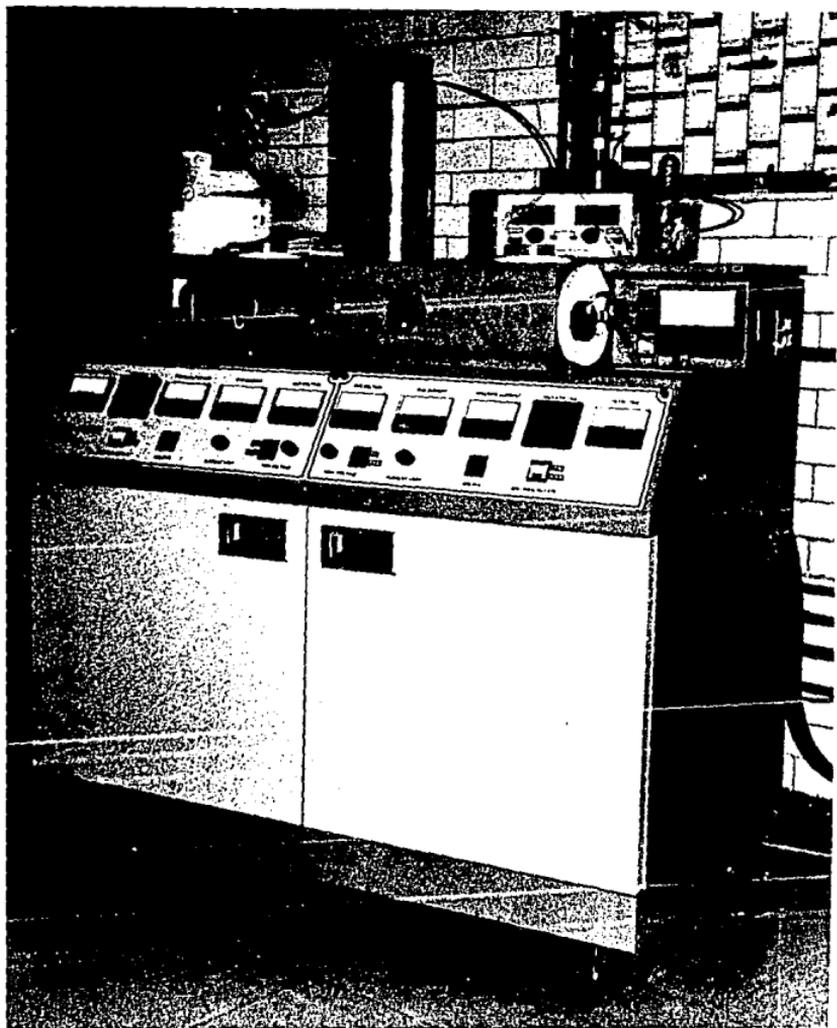


Fig. IV.6 Desvastador iónico Dual Ion Mill.

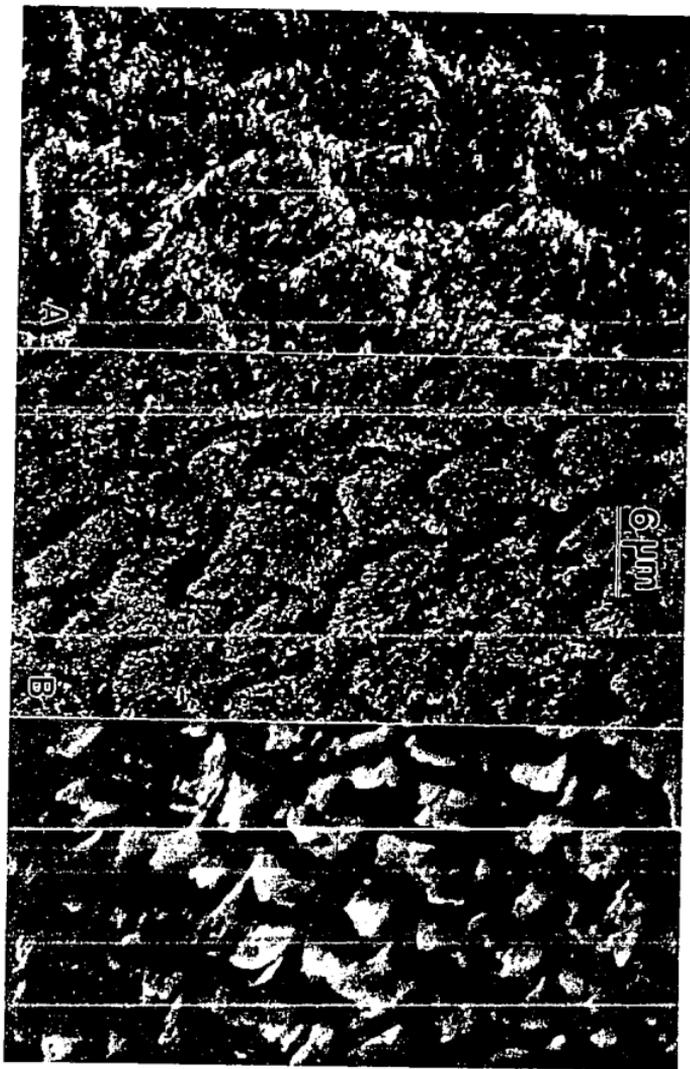


Fig. IV.7 Difractómetro de Rayos X utilizado.

## CAPITULO V

### RESULTADOS

En este capítulo los resultados obtenidos por microscopía electrónica de barrido, microscopía electrónica de transmisión, microscopía electrónica de alta resolución y microanálisis electrónico del esmalte de niño, adolescente y anciano serán presentados. Los resultados son más que excelentes y nos han permitido hacer una continuación del trabajo que, desde hace un año y medio, se viene realizando en este campo.

#### V.1. Microscopía Electrónica de Barrido:

Las características estructurales mencionadas en el capítulo del esmalte fueron observadas por medio de esta técnica. Los resultados obtenidos por Microscopía Electrónica de Barrido son los siguientes: se observó y comparó las estructuras anatómicas del esmalte tales como prismas compuestos por cristales de apatita. En su corte longitudinal presenta el eje mayor de los prismas con una ligera ondulación en su trayecto. Estos prismas se encuentran delimitados por las estructuras llamadas vainas que los separa uno del otro. Además se observaron las líneas de Retzius que son las capas de crecimiento del esmalte.

Es necesario hacer notar aquí que el contraste mostrado por la imágenes de microscopía electrónica de barrido dependen fuertemente de la orientación que presenta la muestra con respecto al haz electrónico. Esto es más fácilmente explicado por medio de la figura V.1. En esta figura el contraste varía fuertemente cuando la muestra se inclina de  $0^\circ$  (Fig.V.1A) a  $45^\circ$  en una dirección dada (Fig.V.1B) o a  $45^\circ$  en dirección contraria (Fig. V.1C). Por lo tanto, es necesario señalar la orientación que guarda la muestra con respecto al haz electrónico cuando se habla de las imágenes de barrido del prisma. En nuestro caso las imágenes analizadas mostraron una orientación cercana a  $0^\circ$ .

Las figuras V.2, V.3 y V.4 muestran las imágenes de microscopía electrónica de barrido en el caso para niño, adolescente y

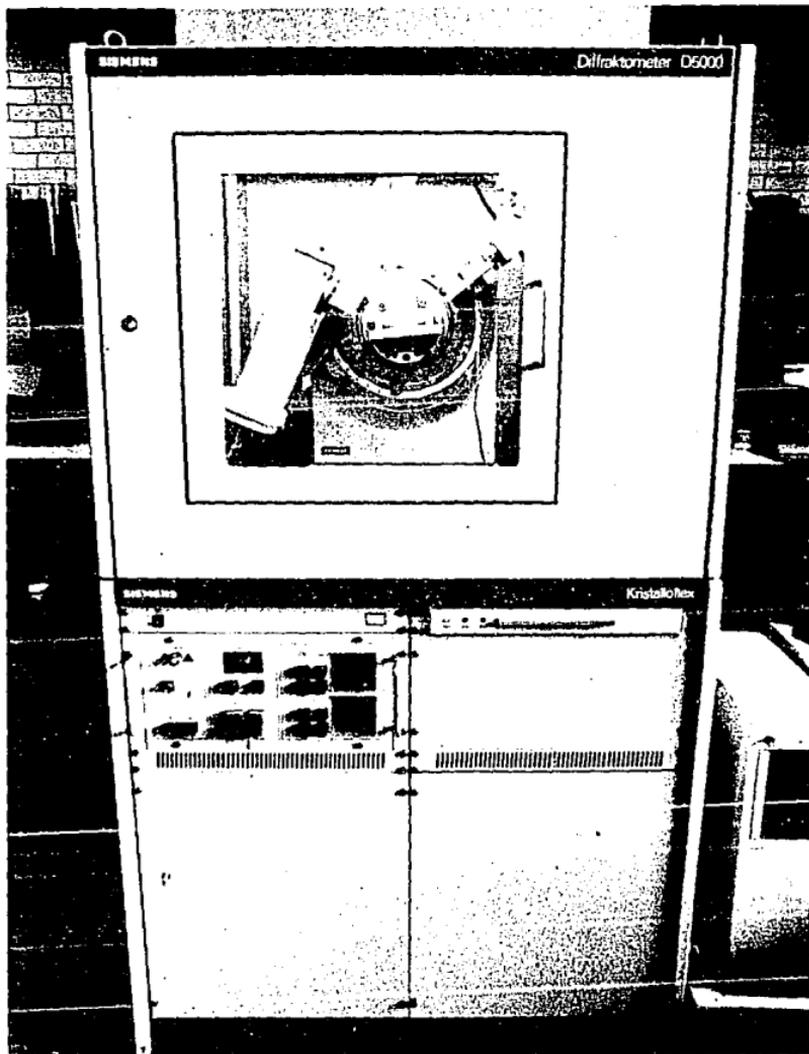


Fig. V.1 Diferentes contrastes de los prismas de acuerdo a la angulación de el haz electrónico en la que fué tomada la fotografía. (A)  $0^\circ$ , (B)  $+45^\circ$ , (C)  $-45^\circ$ .

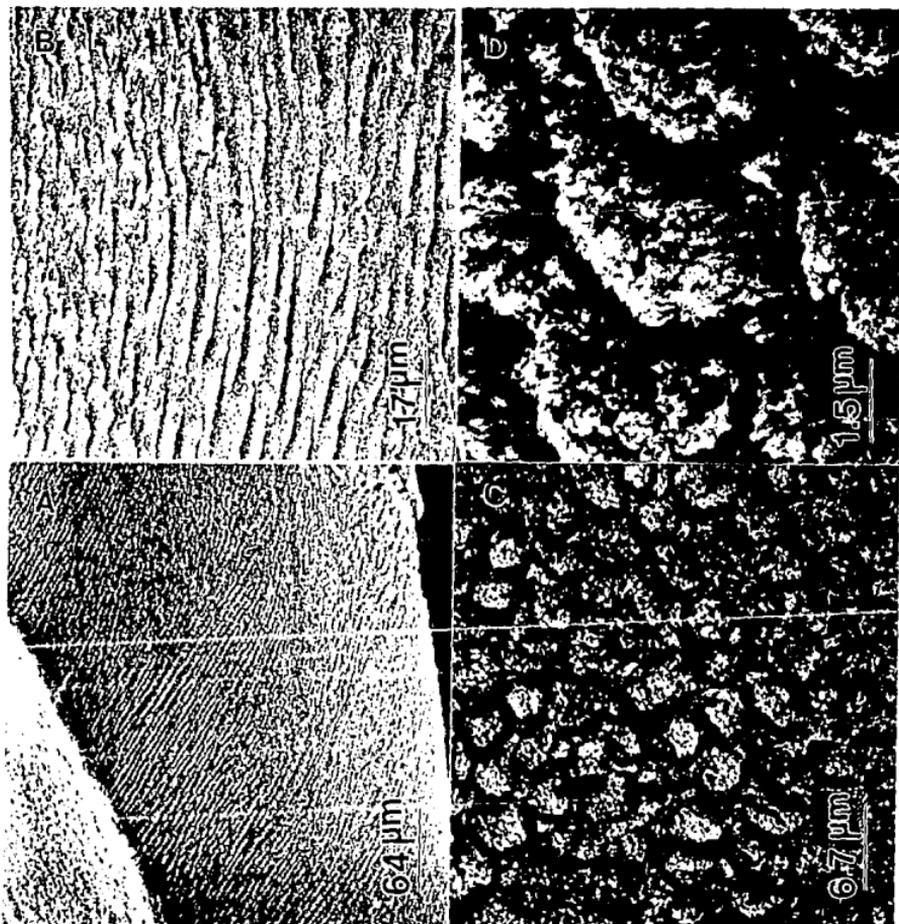


Fig. V.2 Imágenes del esmalte dental infantil por MEB. (A)Vista general, (B)Sección longitudinal, (C)Sección transversal, (D)Sección transversal a mayor amplificación.

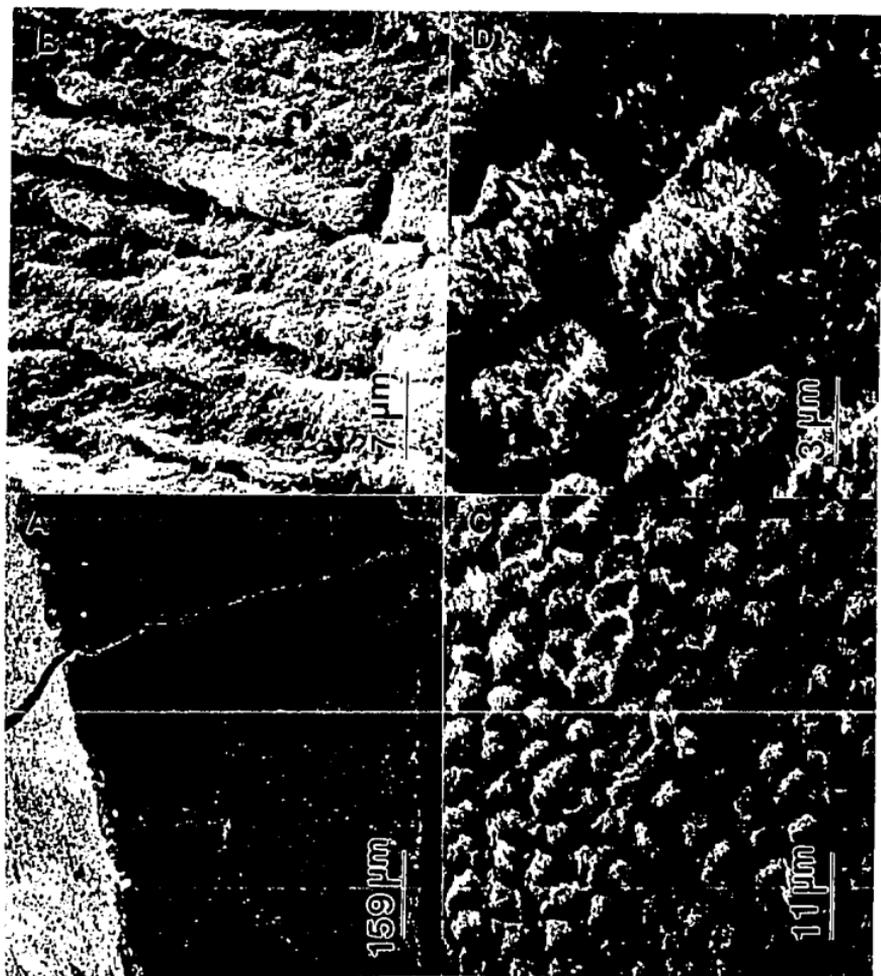


Fig. V.3 Imágenes de 4 vistas del esmalte de adolescente por MEB. (A) Vista general, (B) Sección longitudinal, (C) Sección transversal, (D) Sección transversal a mayor amplificación.

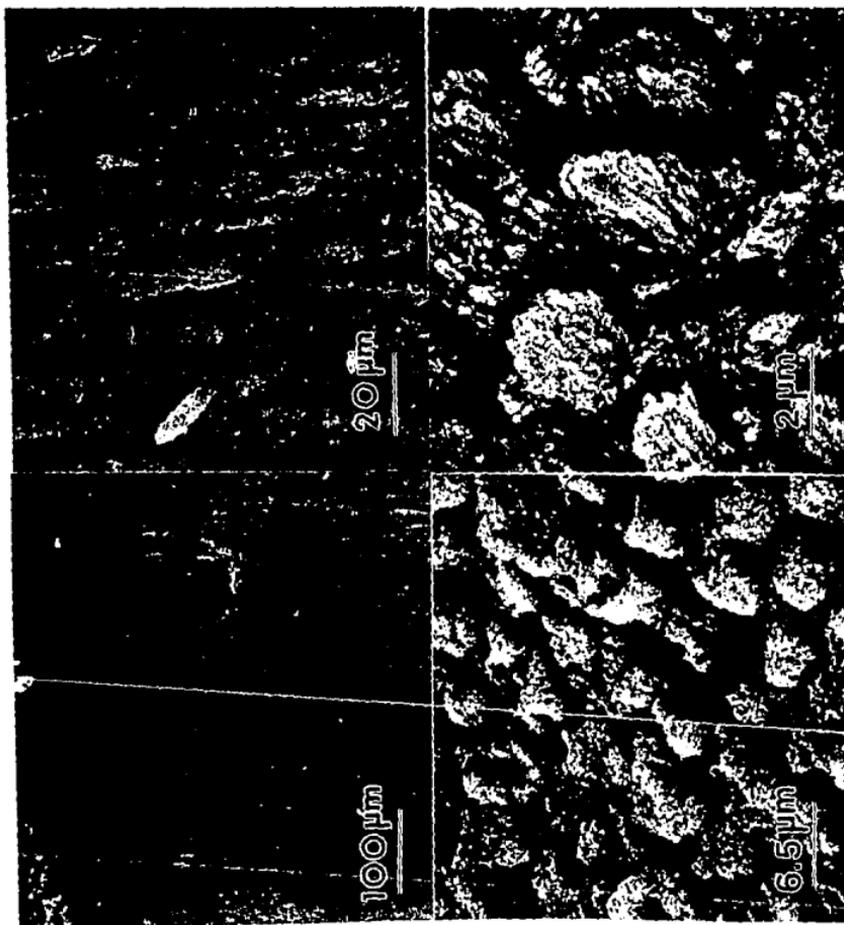


Fig. V.4 Imágenes del esmalte de anciano observado por MEB. (A)Vista general, (B)Sección longitudinal, (C)Sección transversal y (D)Sección transversal a mayor amplificación.

anciano. En estas figuras, en el inciso (A) se muestra una vista general del esmalte; en el inciso (B) los prismas vistos en dirección longitudinal; en el inciso (C) estos prismas son observados en sección transversal; en el inciso (D) se muestra los prismas en sección transversal a mayor ampliación en la cual los cristales de apatita que conforman los prismas son observados. A partir de estas figuras, principalmente de las mostradas de los incisos (B) y (C), se obtiene que las dimensiones de los prismas son las siguientes: en el caso del niño el prisma tiene un tamaño de 3.6  $\mu\text{m}$  en diámetro; el prisma del joven tiene un diámetro de 5.68  $\mu\text{m}$ ; y en el caso del anciano 5.66  $\mu\text{m}$ . El ancho de estos prismas, en el tercio medio del diente, presenta un valor muy aproximado en lo que respecta al joven y anciano: en el caso del niño 3.90  $\mu\text{m}$ ; del joven 6.2  $\mu\text{m}$  y en el caso del anciano 6.0  $\mu\text{m}$ . Es decir, el prisma muestra un crecimiento de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  a partir de la infancia hasta la adolescencia, después de la cual sus dimensiones permanecen más o menos constantes. Es decir 1  $\mu\text{m}$  a nivel atómico es referirse a una dimensión grande

## V.2. Microscopía Electrónica de Transmisión.

La microscopía electrónica de transmisión nos permitió observar los cristálitos de la apatita que conforman los prismas del esmalte. En este caso también obtuvimos resultados relevantes. La figura V.5 muestra la imagen de campo claro (A) y de campo oscuro (B) de la muestra infantil vista en sección longitudinal; la figura V.6 y V.7 muestran las imágenes de campo claro y oscuro tanto en sección transversal como longitudinal respectivamente de la muestra joven; las figuras V.8 y V.9 denota estas imágenes para el caso de la muestra anciano. Los cristálitos en general, cuando se observan en sección transversal, no mostraron una forma completamente hexagonal (Fig.V.6A y V.8A). Por el contrario son muy irregulares. Esto está en completo acuerdo con la morfología de los cristálitos del esmalte reportados por otros investigadores<sup>30</sup>. La forma irregular de los cristálitos queda más que confirmada en las imágenes de campo oscuro (Fig.V.6B y V.8B).

A pesar de lo anteriormente expuesto, y a partir de las figuras V.5, V.6, V.7, V.8, y V.9, podemos dar una aproximación de las

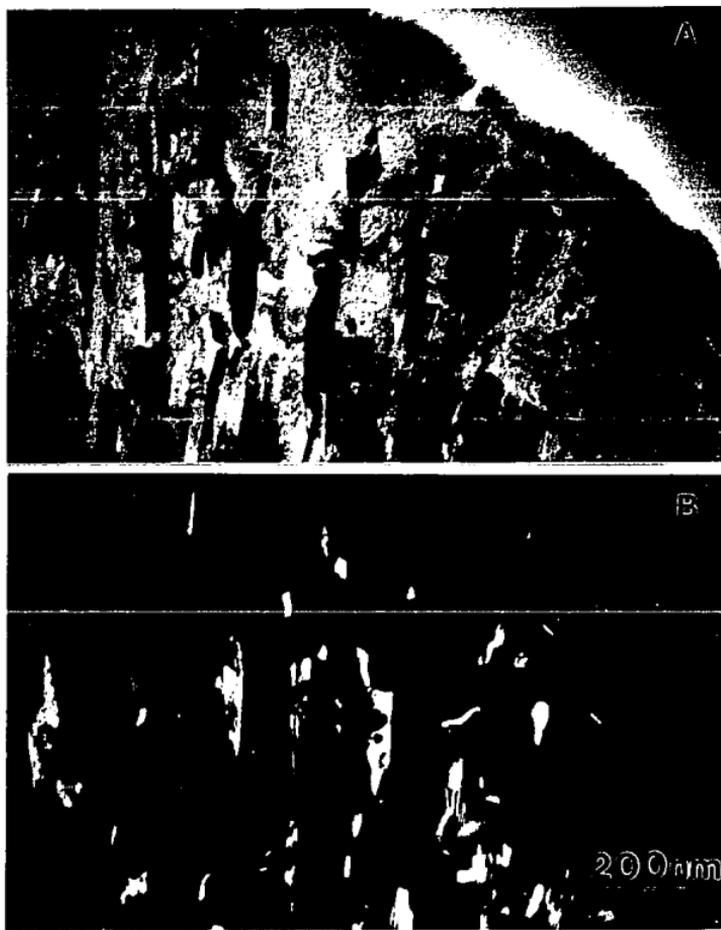


Fig. V.5 Muestra infantil vista en sección longitudinal mediante (A) campo claro y (B) campo oscuro.

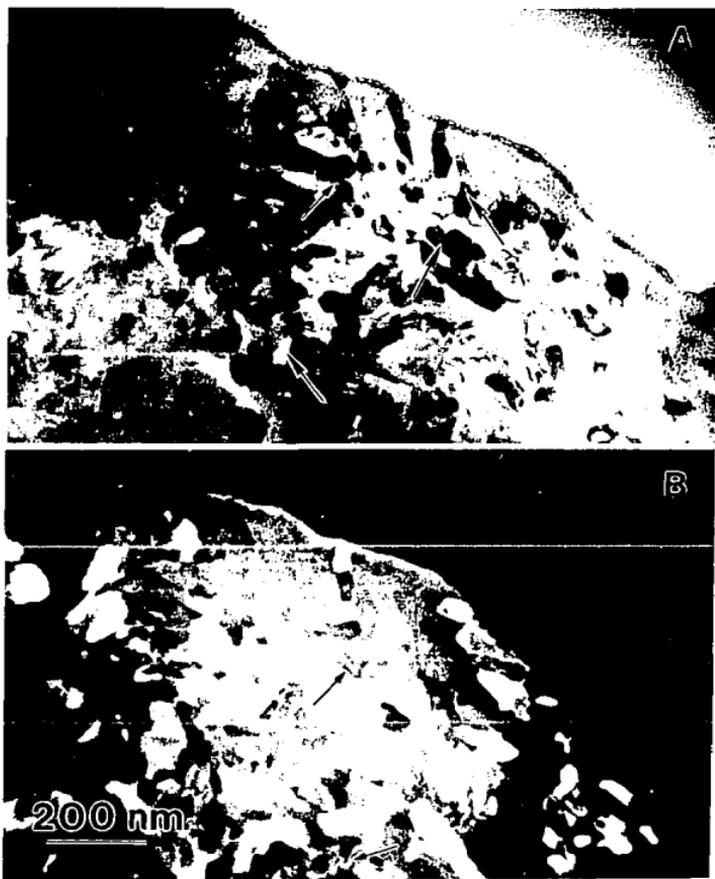


Fig. V.6 Imágenes de campo claro (A) y obscuro (B) en sección transversal de la muestra joven. Las flechas muestran la presencia de la línea oscura en los cristalitas.

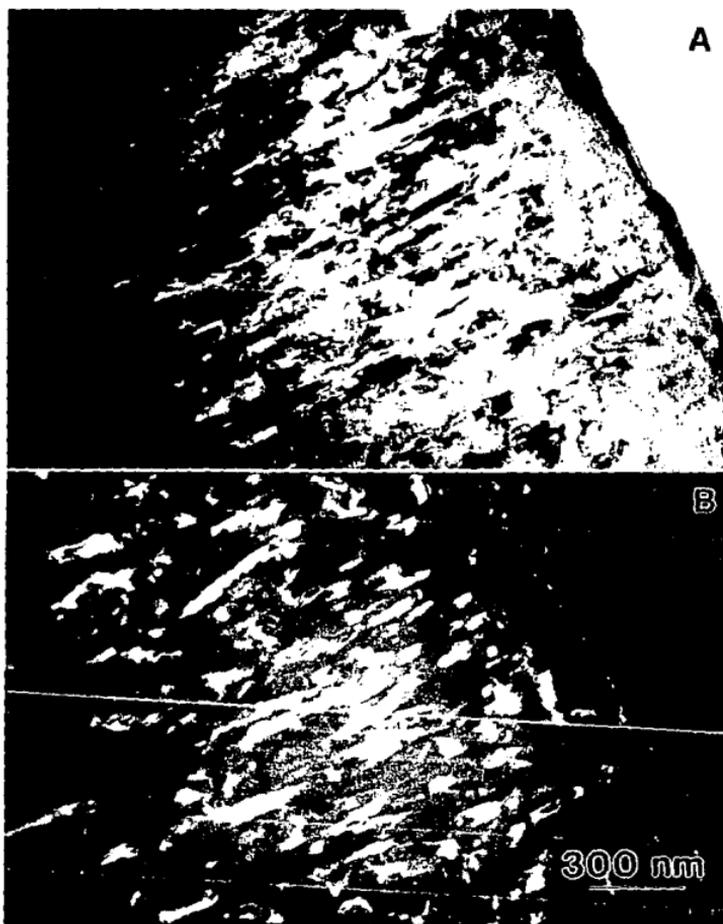


Fig. V.7 Imágenes de campo claro (A) y oscuro (B) de muestra joven en un corte longitudinal.

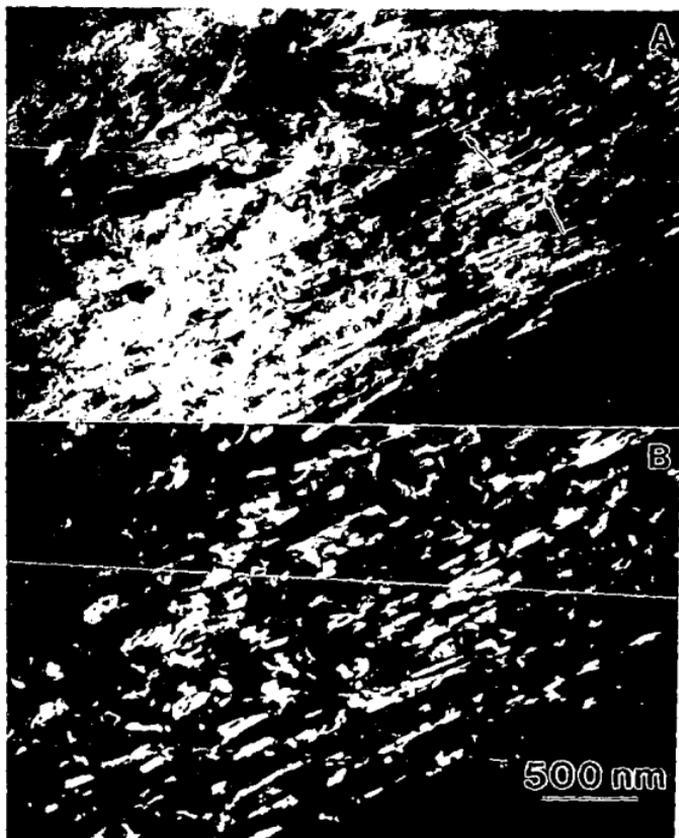


Fig. V.7a Imágenes de campo claro (A) y campo oscuro (B) de sección longitudinal. Las flechas indican la presencia de la línea oscura en los cristales.



Fig. V.8 Imagen de la muestra de anciano en corte transversal. (A) campo claro y (B) campo oscuro. Las flechas indican la presencia de la línea oscura en los cristalitas.



Fig. V.9 Imagen del esmalte de la muestra de anciano en corte longitudinal. (A) campo claro, (B) campo oscuro.

dimensiones de los cristalitas en los diferentes casos. En el caso de la muestra infantil las dimensiones fueron de 29.7 nm en espesor y 300 nm en longitud. La muestra joven presentó 51.4 nm en espesor y 600 nm en longitud. La muestra anciano presentó un espesor de 58.3 nm y longitudes de 800 nm. Esto es, también en lo que respecta a las dimensiones del cristal de apatita del esmalte se presenta un crecimiento desde la niñez hasta la adolescencia y después permanecen constantes.

Es muy importante hacer notar las diferencias que se presentaron entre las muestras infantil, joven y anciano cuando se observaron en la dirección longitudinal (Figs.V.5, V.7 y V.9). Las muestras infantil y adulto presentan cristalitas de esmalte alargados y bien definidos a lo largo de toda la muestra; como se puede notar principalmente en los campos claros. Sin embargo la muestra anciano presenta pocas zonas, que son relativamente pequeñas, en donde los cristales son alargados (Fig.V.5). La mayor parte de ésta presenta cristales pequeños que asemejan bastante a los observados en la sección transversal (Fig.V.10), sugiriendo un rompimiento de los cristales alargados con respecto al envejecimiento. Este es un resultado muy importante porque indica que a medida que pasa el tiempo los cristales de la apatita del esmalte tienden a perder su forma alargada en su sección longitudinal y se rompen.

Un resultado también muy interesante es el que se muestra en la figura V.11, y es el que se refiere a la existencia de la línea oscura en las muestras observadas. La línea oscura se presentó si no en todos los cristales si en la mayoría y en todas las muestras estudiadas, sin importar que fueran de niño, adolescente o anciano. La figura V.11A muestra los cristalitas del esmalte en dirección transversal y la figura V.11B los muestra en la dirección longitudinal. Esto demuestra que la línea oscura es en si un plano en la muestra volumétrica y que se presenta independientemente de la edad del esmalte.

Los patrones de difracción electrónica muestran diferencias muy interesantes en las direcciones tanto transversal como longitudinal. La figura V.12 muestra los patrones de difracción de

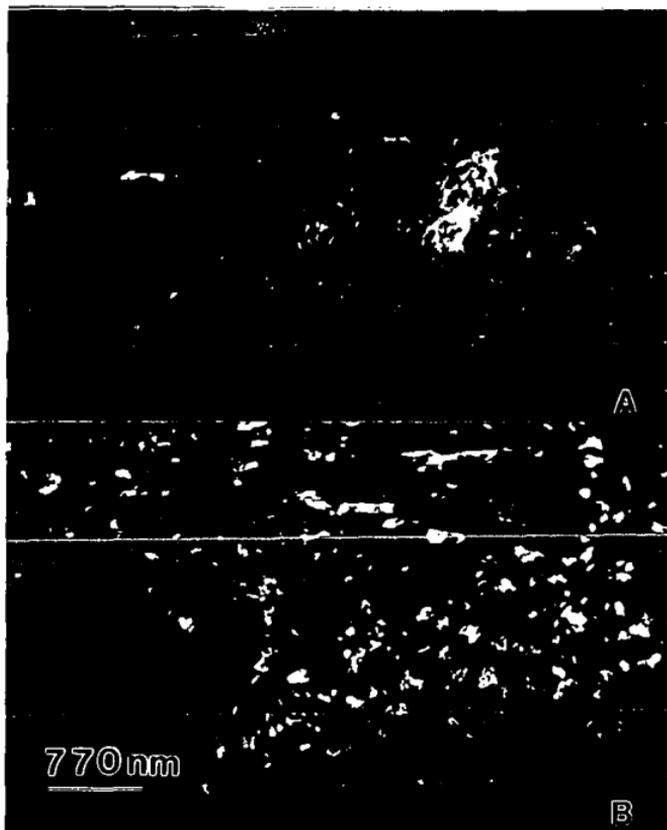


Fig. V.10 Imagen de microscopía electrónica de transmisión del esmalte de la muestra observada en corte transversal. (A) campo claro y (B) campo oscuro.

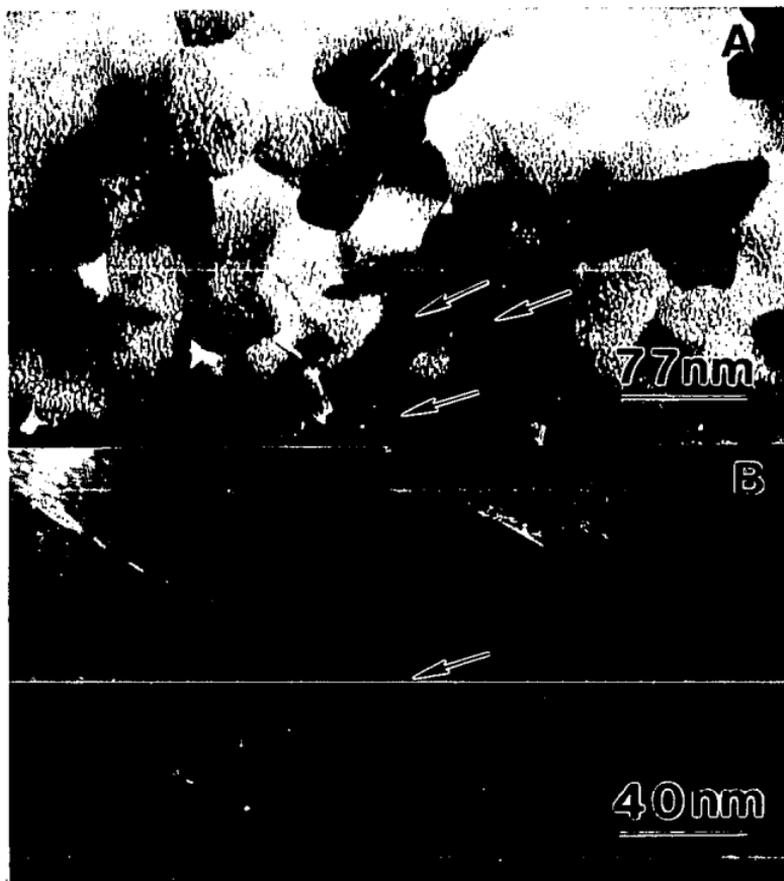


Fig. V.11 Imágenes de microscopía electrónica de transmisión que muestran la presencia de la línea oscura (señalada por las flechas). (A) En corte transversal y (B) en corte longitudinal.

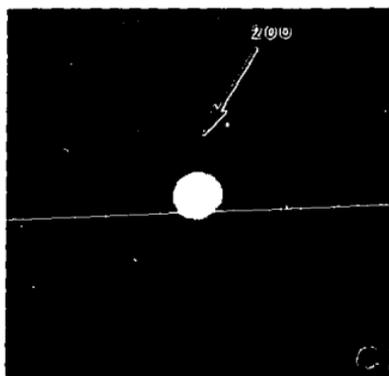
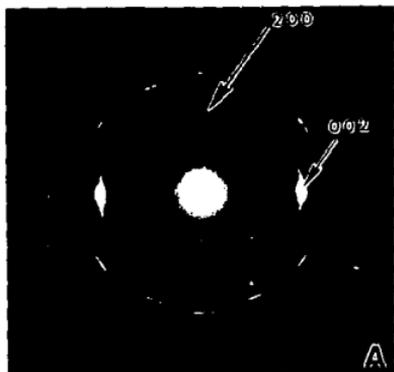


Fig. V.12 Patrones de difracción de área selecta de las muestras infantil (A), adolescente (B) y anciano (C) en sección longitudinal. Las diferencias entre ellos en forma son evidentes.

área selecta en la dirección longitudinal en el caso de las muestras infantil (A), adolescente (B) y anciano (C). Todos estos patrones son fácilmente indexables de acuerdo con las distancias interplanares de la hidroxapatita (Ver Tabla de la Fig.II.26). El patrón de difracción de área selecta de infantil (Fig.V.12A) muestra un semiarco muy intenso con lo cual sugiere la existencia de una orientación preferencial a lo largo de la orientación del eje mayor de los cristalitas. El ángulo del arco de éstos determinan la magnitud de la desviación en grados que sufren estos cristales en un arreglo texturalizado. El patrón de difracción de área selecta de la muestra juvenil presenta una serie de arcos concéntricos los cuales indican también la presencia de cristales con orientación preferencial. Sin embargo el arco intenso (002) ha desaparecido. No obstante este tipo de patrón de difracción aun presenta una muestra texturizada, es decir una muestra presenta una determinada inclinación de su eje mayor con respecto a la dirección del haz electrónico incidente. En éste tipo de patrones, cuando la muestra se inclina a lo largo del diámetro paralelo al eje de inclinación, los arcos coinciden con el patrón de anillos original; mientras que a lo largo del diámetro perpendicular los anillos originales desaparecen y aparecen otros nuevos puesto que la inclinación provoca que la esfera de reflexión (esfera de Ewald) corte los planos de las capas de mayor orden. Los patrones de difracción de la muestra anciano (Fig. V.12C) no presentan mayor cambio si se toman en sección transversal o longitudinal (compararse con la Fig. V.12 y V.13). Esto indica de nuevo el rompimiento de los cristales de apatita del esmalte produciendo que no exista diferencia entre los contrastes mostrados en estas dos direcciones: ambas están formados por cristalitas de forma irregular y no mostrando direcciones preferenciales.

Debemos hacer notar las diferencias que se presentan en los patrones de difracción de las muestras en estudio cuando se observan sin la apertura de área selecta. En éste caso el área de la cual proviene las reflexiones difractadas es mucho mayor. Estos patrones de difracción se muestran en la figura V.14, siendo el patrón de difracción proveniente de la muestra infantil mostrada en el inciso A, mientras que la juvenil y anciano se muestran en

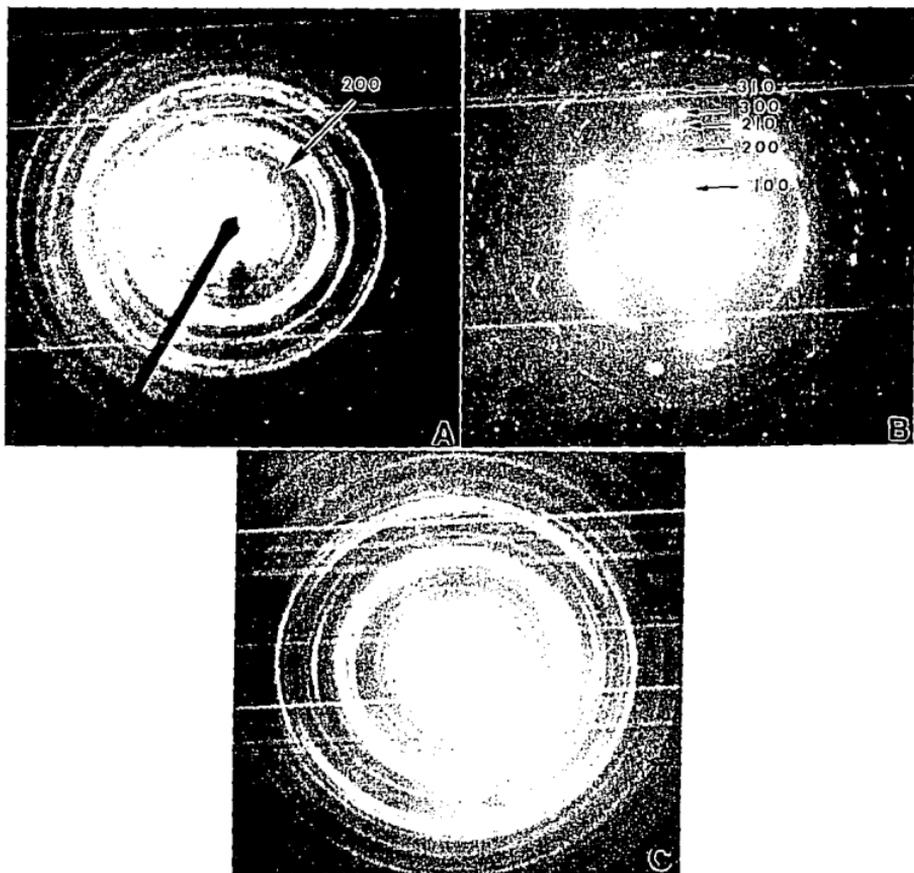


Fig. V.13 Patrones de difracción en sección transversal. (A) Infantil, (B) adolescente y (C) anciano.

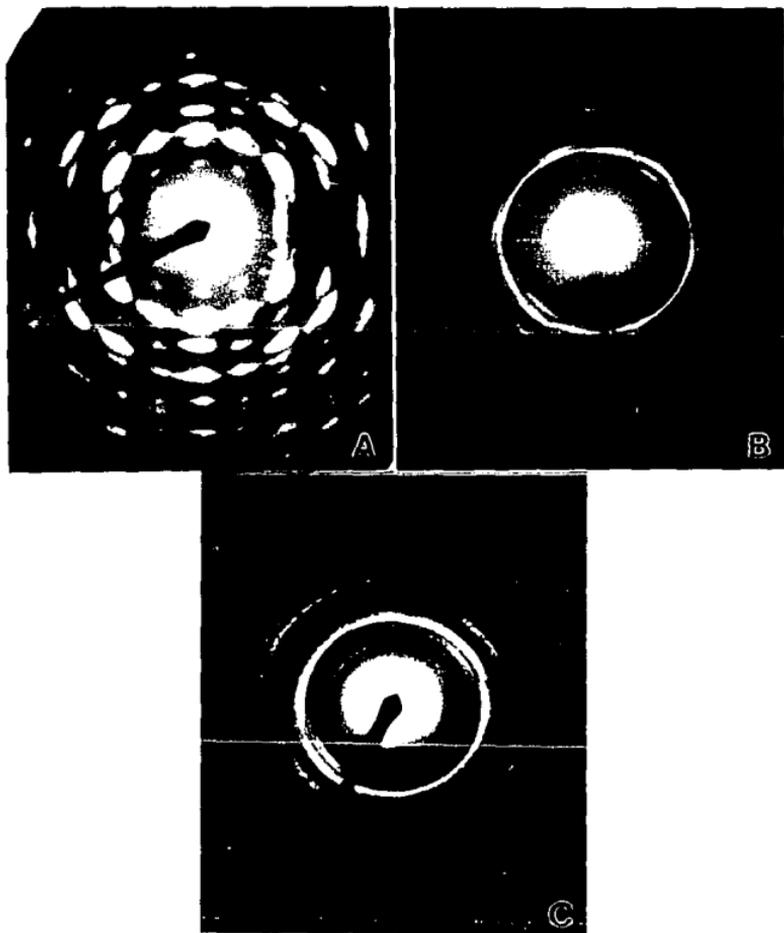


Fig. V.14 Patrones de difracción en la dirección longitudinal de los prismas de las muestras (A) infantil, (B) adolescente y (C) anciano pero ahora sin la apertura de área selecta. Las diferencias entre ellos y los mostrados en la figura V.13 es evidente.

los incisos B y C respectivamente. De nuevo observamos diferencias entre los patrones de la muestra infantil con los de las muestras juvenil y anciano.

En el caso de los patrones de difracción de área selecta de las muestras en sección transversal, éstos reproducen el contraste mostrado en la figura V.12 como se muestra en la figura V.13 para el caso de la muestra de adolescente y (Fig.V.15) para la muestra anciano. De nuevo observamos diferencias en intensidades entre los patrones de difracción de área selecta (Figs.V.13B y V.15B) con respecto a los patrones de difracción sin la apertura de área selecta (Figs.V.13A y V.15A). Sin embargo estas diferencias no son tan pronunciadas como en el caso de los patrones de difracción obtenidos en la dirección longitudinal (Figs.V.12 y V.13). Recordemos que el patrón de difracción sin la apertura de área selecta proviene de una área mayor que en el caso cuando la apertura está puesta.

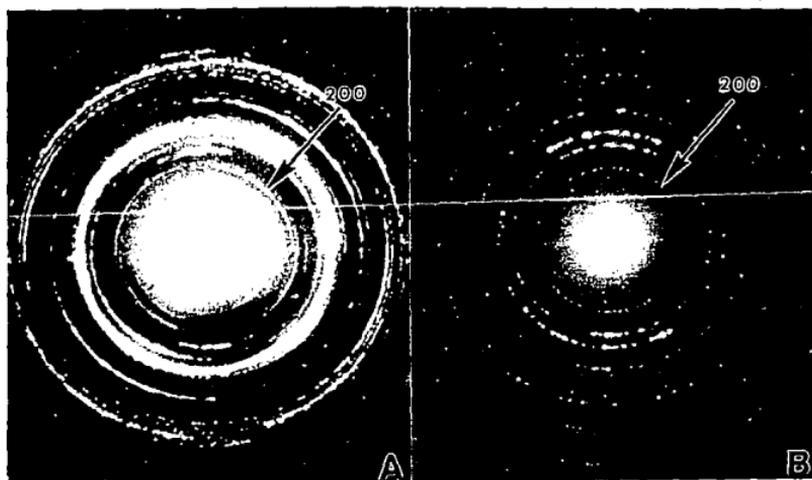


Fig. V.15 Patrón de difracción de la muestra de adolescente (A) con y (B) sin apertura de área selecta respectivamente. Nótese que algunos anillos de los que aparecen débiles en (A) desaparecen en (B).

Esto nos sugiere que los anillos que desaparecen provienen del área que difractan fuera del diámetro de la apertura.

### V.3. Microscopía Electrónica de Alta Resolución.

Las imágenes de alta resolución del esmalte muestra características muy interesantes (Fig.V.16), como ya se a comentado en trabajos anteriores<sup>9</sup>. Se hizo notar la existencia de material amorfo entre los cristales (marcado con A en la figura V.16), seguramente residuos de materia orgánico. La figura V.16 muestra una imagen típica de alta resolución del esmalte y cuyo análisis demuestra que corresponde a la dirección [0001] de la estructura de la hidroxiapatita.

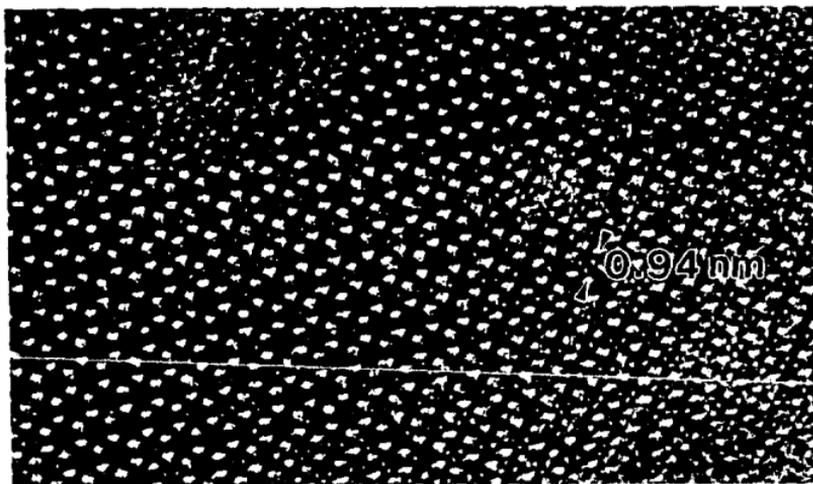


Fig. V.16 Imagen de microscopía electrónica de alta resolución de la hidroxiapatita con la dirección [0001].

La figura V.17 muestra las imágenes tanto de microscopía convencional en campo claro (Fig.V.17A) como de alta resolución (Fig.V.17B) en la dirección longitudinal. Como puede observarse ésta figura corresponde a la línea oscura observada en estos dos modos. La figura V.18 presenta las imágenes de alta resolución de

la línea oscura, en donde las imágenes mostradas en los incisos B y C son una amplificación de la mostrada en A los recuadros mostrados en C corresponden a la imagen simulada en la dirección [1100] de la línea oscura cuando se utilizan modelos en los cuales existen vacancias de Ca a lo largo de esa dirección<sup>9</sup>. Como se puede observar la imagen simulada concuerda bastante bien con la imagen experimental. Todo esto demuestra que la línea oscura, que se muestra como línea tanto en las muestras de sección transversal como longitudinal, corresponde, por o tanto a un plano que intersecta completamente al cristal de la apatita del esmalte.

#### V.4. Análisis Químico

El análisis químico de las muestras se realizó por medio de tres técnicas diferentes. La pregunta que nos planteamos aquí, y que intentaremos contestar, es sobre el tipo de técnica de análisis químico que nos permita conocer la composición del esmalte principalmente alrededor y en la zona de la línea oscura. Debido a que las muestras presentaban a grosomodo los mismos resultados con cada una de las técnicas utilizadas, comentaremos cada uno de éstos resultados en forma general. Es decir sin referirnos a alguna muestra en particular, con excepción del primer caso que describiremos.

##### V.4.1 Análisis por Espectroscopía de Dispersión de Energía de Rayos X Característicos (EDX).

El microanálisis realizado por medio de espectroscopía de dispersión de rayos x muestra que las diferencias entre las muestras infantil, juvenil y anciano son mínimas en lo que a concentraciones químicas se refiere (Figs.V.19, V.20 y V.21). En este caso todos los elementos de la hidroxapatita, con excepción del H, son mostrados en las figuras. También se muestran las señales de algunos elementos traza como son el Na, Si, Cl y Mg. Sin embargo las concentraciones relativas de las tres muestras son aproximadamente iguales. La señal de C proviene de la delgada capa de C con la cual se cubrió la muestra para poder ser observada por medio de electrones en los microscopios y para minimizar su daño, como se describió en el capítulo de desarrollo experimental.



Fig. V. 17 La línea oscura en muestras de sección longitudinal. (A) En imagen de campo oscuro y (B) en imagen de alta resolución. Las flechas indican algunas de éstas.

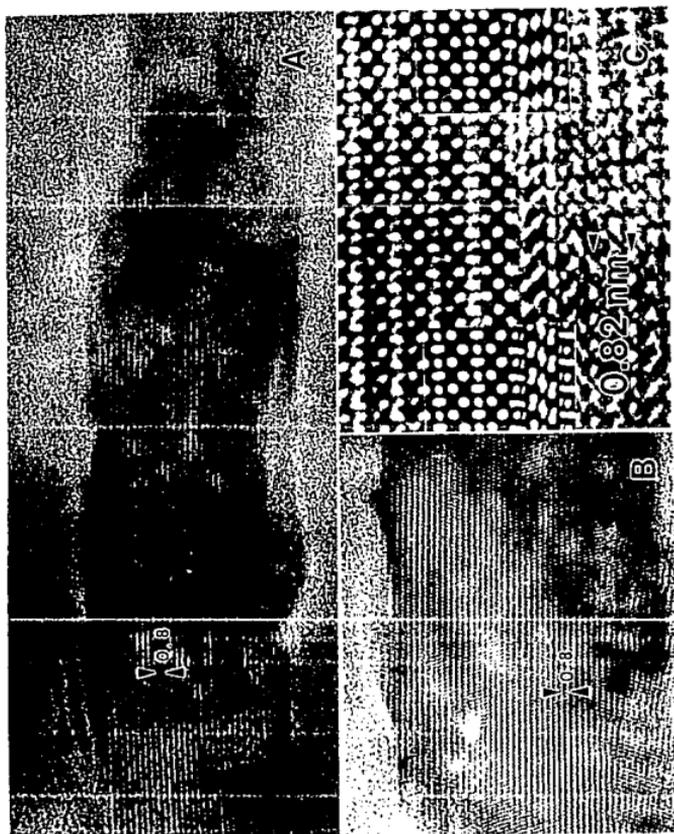
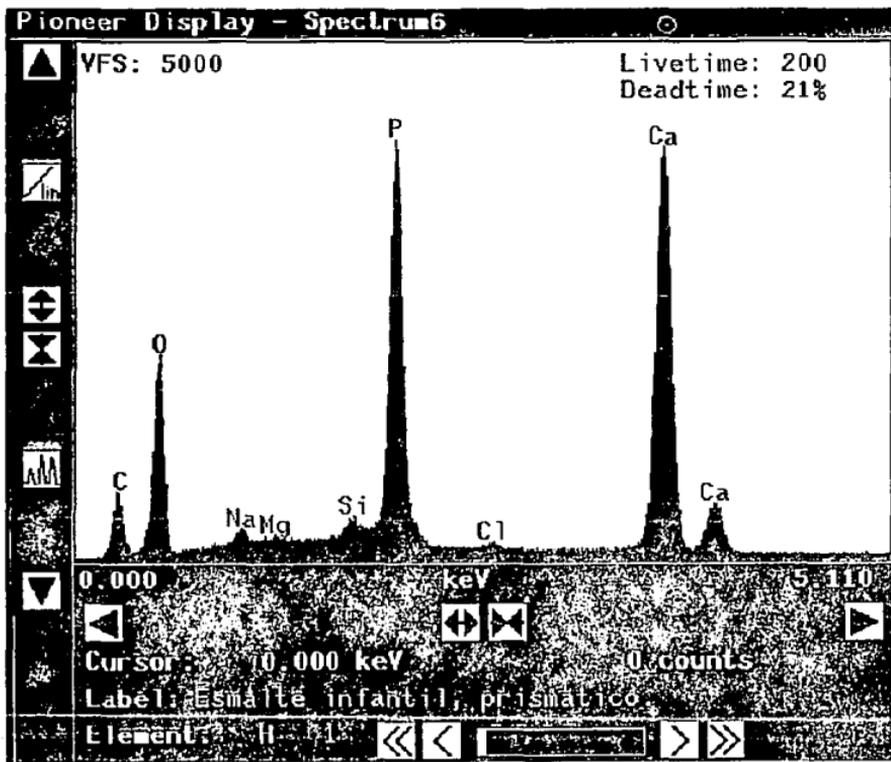


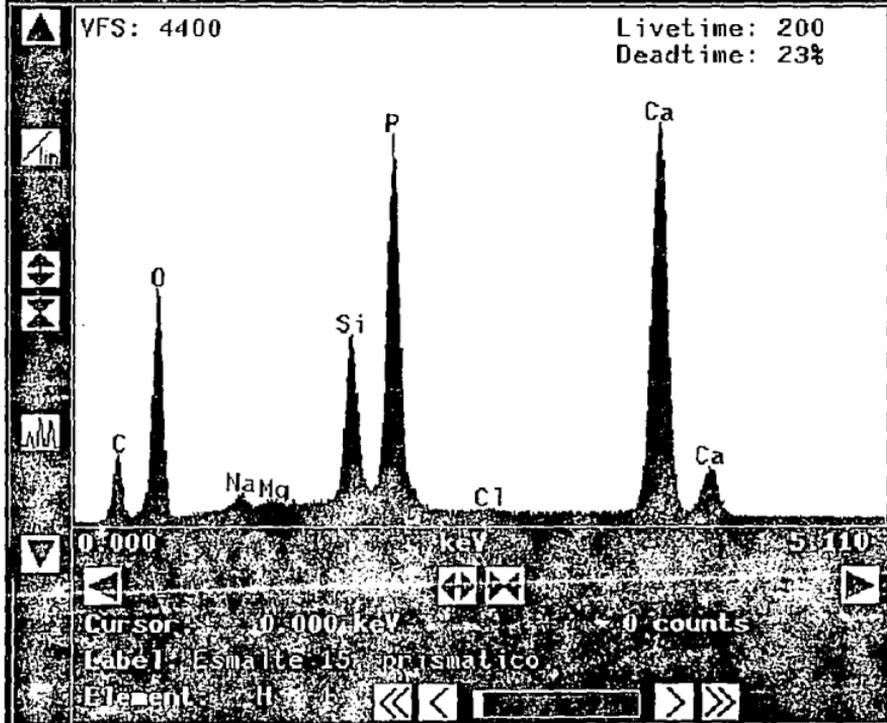
Fig. V.18 Imágenes de alta resolución del esmalte en sección longitudinal. (A) Vista general, (B) a mayor ampliación. En (C) la posición de las columnas atómicas y los recuadros muestran las imágenes simuladas.



Element	k-ratio	Z	A	F	Atom %	Wt %
O -K	0.09885	0.925	4.964	1.000	65.29	45.41
Na-K	0.00378	1.022	2.185	0.999	0.84	0.84
Mg-K	0.00099	1.004	1.654	0.997	0.15	0.16
P -K	0.14827	1.058	1.116	0.993	12.91	17.38
Cl-K	0.00282	1.087	1.112	0.980	0.22	0.33
Ca-K	0.32675	1.070	1.026	1.000	20.59	35.87
<b>Total</b>						<b>100.00 %</b>

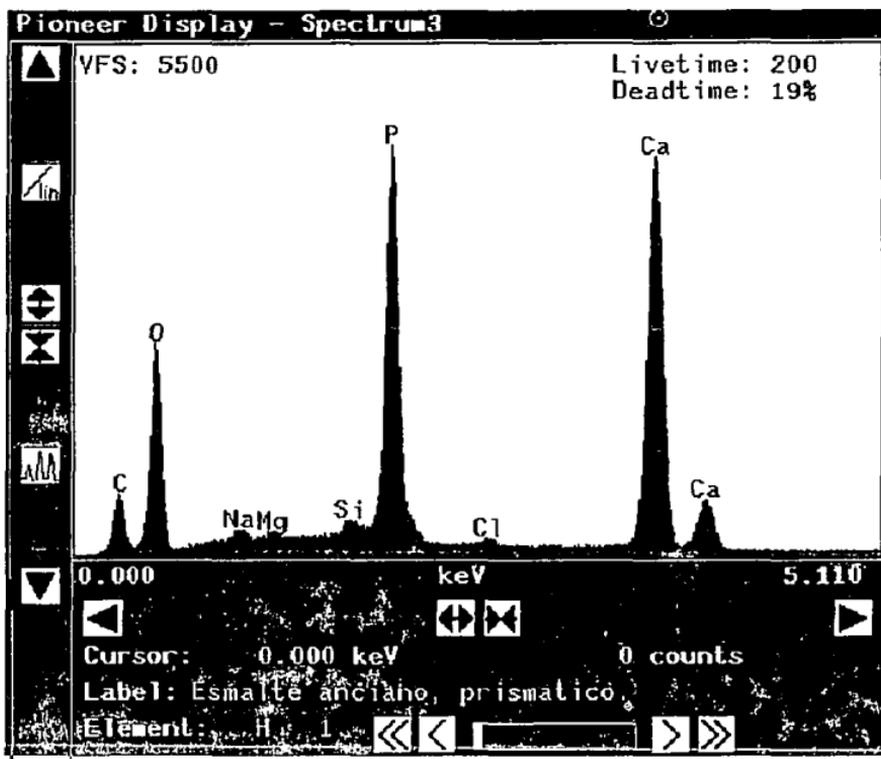
Fig. V.19 Espectro de rayos x caracteristicos de la muestra infantil tomado por EDX.

Pioneer Display - Spectrum8



Element	k-ratio	Z	A	F	Atom %	Wt %
O -K	0.11320	0.930	4.668	1.000	68.64	49.16
Na-K	0.00408	1.030	2.218	0.999	0.90	0.93
Mg-K	0.00162	1.012	1.672	0.997	0.25	0.27
P -K	0.13026	1.065	1.120	0.993	11.12	15.42
Cl-K	0.00188	1.097	1.101	0.981	0.14	0.22
Ca-K	0.30861	1.077	1.022	1.000	18.94	33.99
Total						100.00 %

Fig. V.20 Espectro de rayos x caracteristicos de la muestra adolescente tomado por EDX.



Element	k-ratio	Z	A	F	Atom %	Wt %
O -K	0.10507	0.927	4.824	1.000	66.74	47.01
Na-K	0.00323	1.027	2.204	0.999	0.72	0.73
Mg-K	0.00098	0.968	1.599	0.996	0.14	0.15
P -K	0.14470	1.061	1.117	0.993	12.48	17.02
Cl-K	0.00367	1.048	1.140	0.975	0.27	0.43
Ca-K	0.31495	1.073	1.025	1.000	19.64	34.66
Total						100.00 %

Fig. V.21 Espectro de rayos x característicos de la muestra anciano tomado por EDX.

El que no se presente diferencia aparente entre los espectros de las diferentes muestras es un resultado importante pero, sin embargo, también limitante. Por las características mismas de la técnica, el que no podamos analizar áreas menores a 10 nm. en el mejor de los casos, nos indica que esta técnica no nos ayudará en el análisis químico de la zona de la línea oscura como es nuestro objetivo.

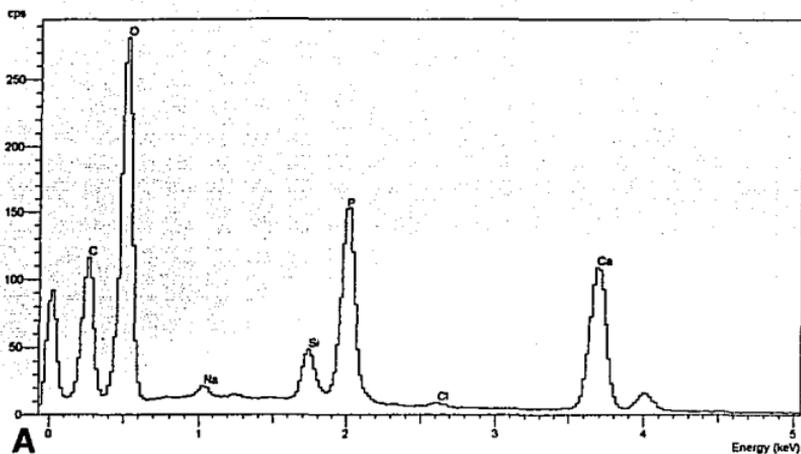
Es muy importante hacer notar que si se cuenta con el dispositivo adecuado en el microscopio electrónico pueden obtenerse imágenes de concentración que se conoce comúnmente como mapeos químicos (Fig.V.22). Es decir en las imágenes del microscopio electrónico las zonas de las cuales proviene la señal del elemento son resaltadas, como se muestran en la figura V.22B. En la figura V.22A se muestra el mismo espectro que se observa en las figuras V.19, V.20 y V.21. Como puede observarse en la figura V.22B la homogeneidad de la muestra es demostrada.

Esta parte de la técnica presenta un buen potencial en el análisis de la línea oscura siempre y cuando seamos capaces de medir sus concentraciones relativas.

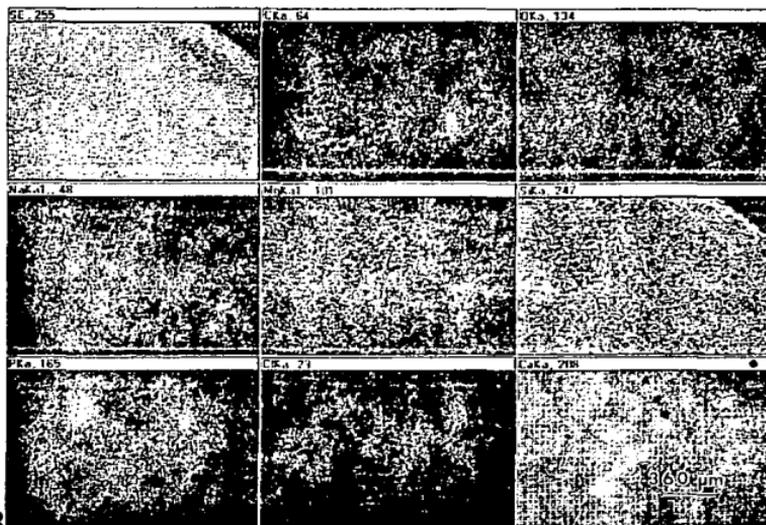
Aquí debemos de resaltar que la señal del Si provenga posiblemente del papel lija que se usó para la preparación de la muestra. Por lo tanto, debemos asegurarnos de mejorar el método de limpieza que se utiliza después de que la muestra ha sido pulida.

#### V.4.2 Análisis por Rayos X.

El análisis por difracción de rayos x en una muestra de esmalte en polvo (Fig.V.23A) demuestra que la estructura del esmalte está formada en su mayor parte por hidroxiapatita, lo cual era de esperarse. Sin embargo cuando la muestra que se analiza por esta técnica no es en polvo sino en pastilla, se obtienen resultados muy interesantes. Dependiendo de que región del esmalte se obtiene la pastilla los resultados son diferentes. Por ejemplo el patrón de difracción de rayos x mostrado en la figura V.24B se obtuvo de una pastilla proveniente de un corte transversal de la zona incisal, mientras que el mostrado en la figura V.25C se obtuvo de



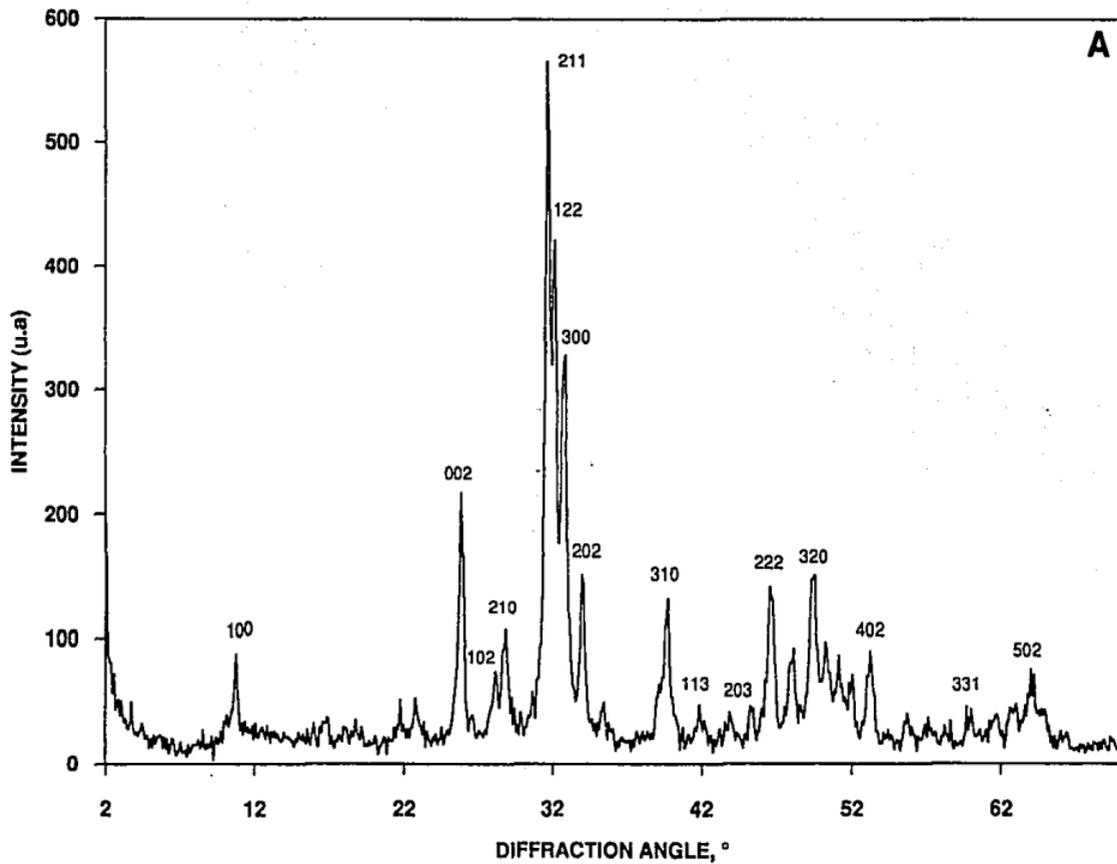
**A**



**B**

Fig. V.22 (A) Representa el espectro de los elementos que existen en la superficie del esmalte y (B) Es el mapeo que resalta la zona de donde proviene la señal del elemento.

Fig. V.23A Diffractograma obtenido a partir de polvo de esmalte.



A

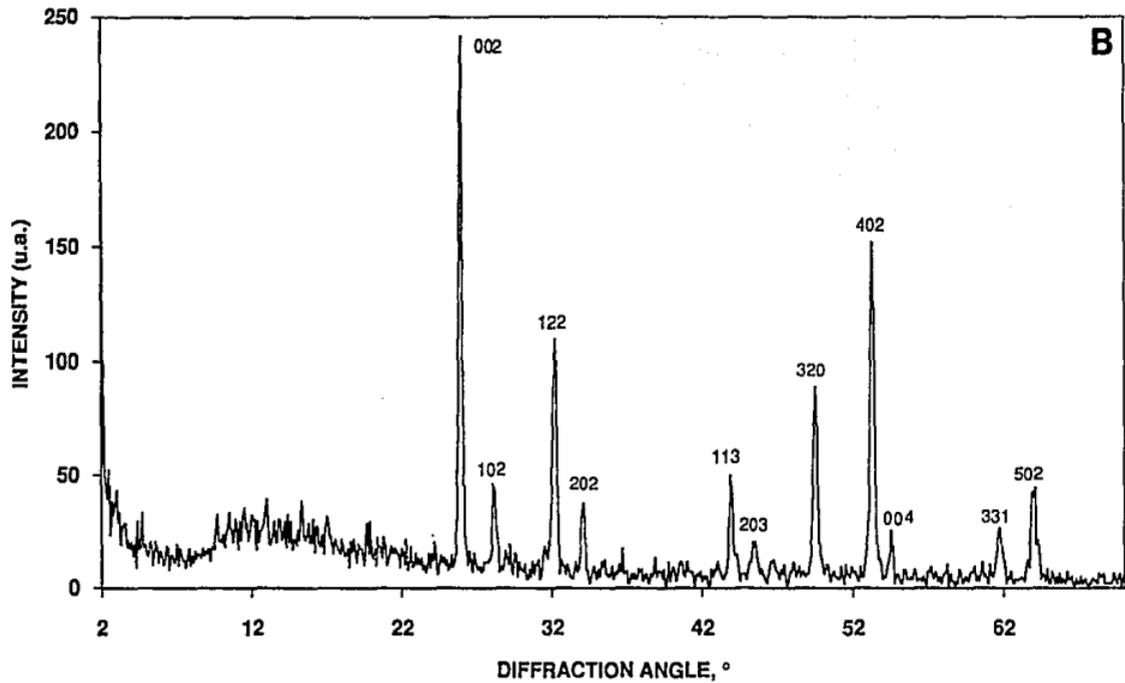


Fig. V24B Difractograma obtenido de un corte transversal del esmalte a la altura de la zona incisal.

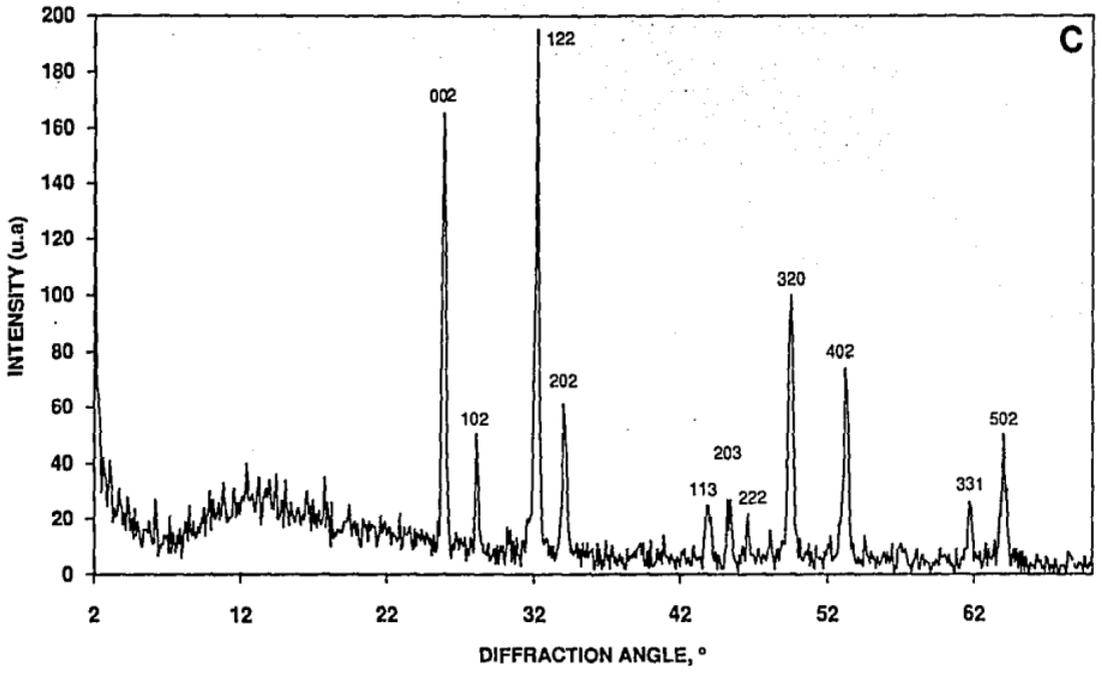
**C**

Fig. V.25C Diffractograma obtenidode un corte longitudinal del esmalte a la altura dela zona del tercio medio.

un corte longitudinal del tercio medio.

Como puede observarse éstos difractogramas muestran la existencia de direcciones preferenciales en el esmalte. Por principio de cuentas en la figura V.24B la dirección  $[002]$  es mayor que la  $[122]$  y la dirección  $[402]$  es mayor que la  $[320]$ . En la figura V.25C se presenta el caso contrario con respecto a estas direcciones. Esto demuestra la existencia de direcciones preferenciales en el esmalte pero que no corresponden a las mismas en distintas zonas del diente (Fig. V.26).

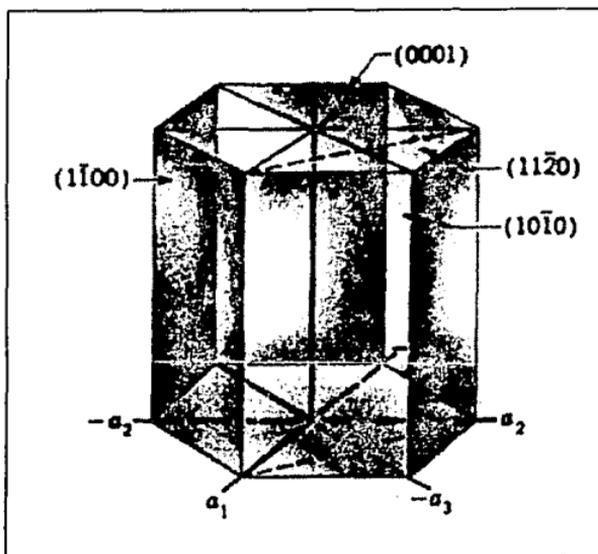


Fig.V.26 Imagen del hexágono mostrando los planos que más se presentan en los difractogramas.

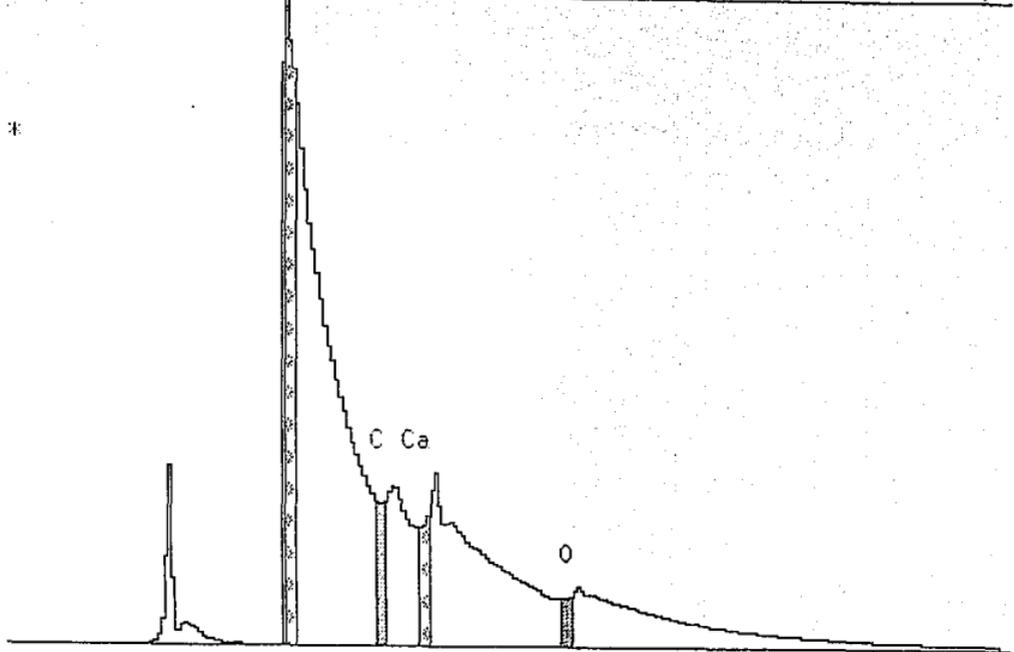
#### V.4.3 Análisis por Pérdida de Energía de los Electrones (EELS).

El análisis químico por pérdida de energía de los electrones es una de las técnicas que más prometen en el análisis de la estructura del esmalte y la relación que guardan sus elementos con las impurezas. Esto es consecuencia de las características que ésta presenta y que han sido ya discutidas en el capítulo de microscopía electrónica.

La figura V.27 muestra el espectro de EELS característico del esmalte los incisos A y B son el mismo espectro que por falta de espacio en la pantalla fué dividido en dos. Al igual que en los espectros de EDX los elementos del esmalte son mostrados con excepción del H. El análisis de las formas que presentan sus señales nos permitiran conocer con detalle la estructura local de estos elementos con respecto a los elementos traza. Como puede observarse en la figura V.27 el esmalte analizado presenta los mismos elementos mayoritarios que en el caso del análisis por EDX La señal proviene del Si no aparece, lo cual confirma nuestra hipótesis de que el Si presentado en el análisis por EDX proviene del papel lija que se utilizó durante la preparación del esmalte para su observación por microscopía electrónica de barrido, que fueron las que se utilizaron en EDX.

Volvemos a mencionar que el hecho de que hayamos obtenido este tipo de espectro a partir del esmalte abre las puertas a un gran numero de estudios estructurales en éste campo.

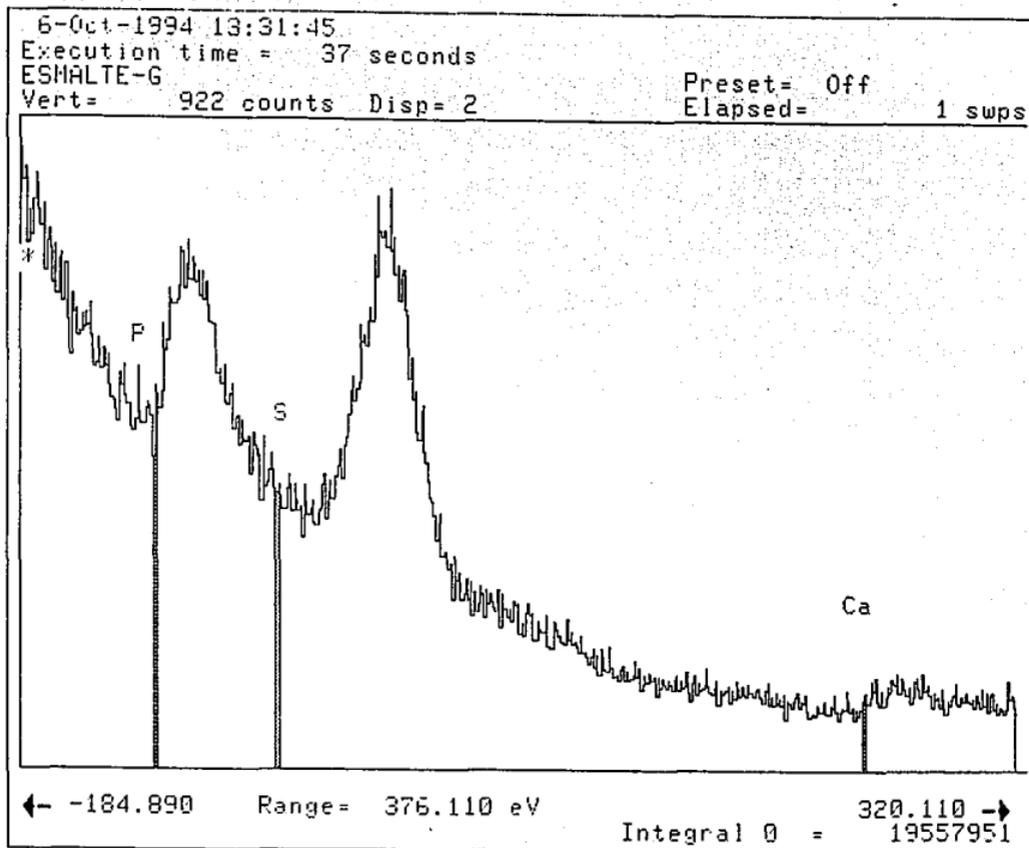
6-Oct-1994 13:27:34  
Execution time = 28 seconds  
ESMALTE-G  
Vert= 893866 counts Disp= 2  
Preset= Off  
Elapsed= 1 swps



← -564.890 Range = 376.110 eV Integral 0 = -312.890 →  
19557951

Fig. V.27 Espectro de EELS del esmalte dental humano.

Fig. V.28 Continuación del espectro de EELS mostrado en la figura V.27.



## CAPITULO VI

### DISCUSION

Los resultados del presente trabajo fueron excelentes y nos permitieron adentrarnos aún más en el conocimiento de la estructura cristalina y morfológica del esmalte. El análisis de muestras de distintas edades nos permitió conocer en cierta forma la evolución que presenta el esmalte con respecto al tiempo. También nos permitió obtener información adicional sobre el defecto planar conocido como la línea oscura. En este capítulo realizaremos los resultados que consideramos los más importantes, en lo que al conocimiento del esmalte se refiere, y los cuales ya se presentaron en el capítulo anterior.

#### VI.1 Microscopía Electrónica de Barrido.

La microscopía electrónica de barrido en el análisis estructural del esmalte, principalmente del prisma, tiene mucho que decir. Aparte de permitir la observación de los componentes estructurales del esmalte como son los prismas, las vainas, las líneas de Retzius. etc., también nos ha mostrado algunas variantes en el contraste de los prismas mismos (como se puede observar en las figuras de MEB mostradas en el capítulo de esmalte). En algunos de los prismas mostrados (que han sido marcados con flecha) se observa un proceso de ataque distinto al resto de los prismas, a pesar que todos ellos fueron sometidos al mismo tratamiento químico. En algunos casos podemos ver un contraste tipo dona y en otros casos la vaina ha sido atacada preferencialmente. También podemos ver diferentes tipos de patrones de ataque en otros prismas. Esto indica zonas de ataque preferenciales en el esmalte y que bien podrían ser un producto de calcificación inhomogénea en éste<sup>2,17</sup>. Todo esto representa un campo de trabajo aún virgen en su mayor parte.

A partir de las imágenes de barrido, se obtuvo un incremento en las dimensiones de los prismas del esmalte entre la muestra infantil y adolescente. Esto indica un crecimiento en este lapso de tiempo de estos prismas que después de la adolescencia

permanece constante. Este tema lo discutiremos junto con los resultado de MET.

## VI.2 Microscopía Electrónica de Transmisión.

La microscopía electrónica de transmisión, al igual que la microscopía electrónica de barrido, mostró una evolución en el tamaño de los cristales. En el caso de la microscopía de barrido los prismas de la muestra infantil son relativamente más pequeños que en el caso de las muestras juvenil y anciano. La misma situación tenemos en el caso de los cristales que conforman a estos prismas: los cristalitos del esmalte también presentan un crecimiento en sus tamaños. Esto era de esperarse puesto que el esmalte de los dientes infantiles no han alcanzado completamente su tamaño y se encuentran en proceso de obtenerlo con el tiempo, como en el caso de la muestra juvenil. Se ha demostrado<sup>20</sup>, que una vez que los ameloblastos producen el esmalte, los cristalitos que lo forman muestran un proceso de crecimiento hasta ocupar todo el espacio disponible para ellos. Nuestros resultados muestran que este tamaño se obtienen hasta que la persona es joven y durante su niñez los cristalitos aún estan creciendo.

La microscopía electrónica de transmisión también mostró el rompimiento de los cristales a lo largo de su eje c con respecto a la edad. Las fotografías de campo claro de esmalte en las muestras infantil, adolescente y anciano son algo diferentes. Las imágenes de las muestras infantil y adolescentes son muy parecidas en lo que al contraste se refiere; es decir, muestran cristales alargados en la dirección c en secciones longitudinales. Sin embargo el contraste observado en la muestra anciano no se diferencia del mostrado en la sección transversal: los cristales no son alargados en la dirección c. Este es un resultado muy importante puesto que nos ha permitido observar que el esmalte de anciano pierde sus propiedades al menos desde el punto de vista estructural. Esto último debe ser tomado en cuenta para explicar las propiedades que el esmalte de las personas seniles presenta.

Otro resultado importante lo presenta el hecho de que las imágenes en campo claro de los cristalitos en sección longitudinal se

muestran alargados. Sin embargo las imágenes de campo oscuro muestra que estos cristalitas están compuestos en sí de cristalitas más pequeños y en distintas orientaciones con respecto al haz, pero siempre mostrando su eje c perpendicular al haz electrónico. Es decir los prismas están compuestos de pequeños cristalitas alargados a lo largo de su eje c, y estos últimos a su vez están compuestos de cristales aún más pequeños también paralelos a su eje c. Es decir los cristales alargados son en realidad cristales compuestos<sup>33</sup>.

### VI.3 Análisis Químico.

Se ha comentado frecuentemente en este trabajo que el esmalte dental humano está formado por un tipo de fosfato de calcio llamado apatita. En sí esta apatita se identifica bastante con la hidroxiapatita, pero en este caso es una hidroxiapatita impureza. A pesar de todo, y como los trabajos de simulación de imágenes han demostrado, la estructura de la hidroxiapatita que nos permite conocer las características de la apatita del esmalte. Son varios los elementos que impurifican a la hidroxiapatita, sustituyendo a los átomos de Ca la mayoría de las veces.

Estas impurezas juegan un papel importante en las propiedades del esmalte y su análisis es crucial en el conocimiento de la estructura de éste. Desafortunadamente este análisis no es tan fácil como parece puesto que requiere de un análisis local en áreas de dimensiones de nm.

En este trabajo hemos realizado el análisis químico del esmalte por medio de diferentes técnicas y se ha observado que todas ellas nos dan las concentraciones de los elementos que componen la hidroxiapatita. Todas estas técnicas no presentan los análisis químicos que provienen de zonas cuyas dimensiones son del orden de 100 nm en las mejores condiciones. Sólo por mencionar, la línea oscura presenta espesores aproximadamente de 1 nm. Sin embargo ninguna de ellas es capaz de analizar y mostrarnos la concentración de H, resultado que ninguna de estas técnicas lo darán por el momento. Tal vez a futuro cuando evolucionen aún más los detectores utilizados.

De todas las técnicas utilizadas aquella que más promete dentro del análisis estructural de la línea oscura, por las dimensiones de ésta, es la de EELS. Como se a comentado anteriormente, es altamente probable que la línea oscura represente una variación local en la composición química de la estructura del esmalte. La línea oscura es un plano atómico en la estructura del cristalito y por lo tanto, el análisis que se haga de ello deberá ser a nivel atómico. La técnica de EELS, por lo tanto, presenta todas las características que un análisis a nivel atómico requiere, lo cual la hace idónea para el análisis de la línea oscura.

#### VI.4 Línea oscura.

En este trabajo se ha demostrado que la línea oscura se observa en la mayoría de los cristales observados en la sección transversal y en algunos de los cristales en sección longitudinal. Esto demuestra que la línea en sí representa un plano en el volumen del cristal. El hecho de que se vea en la mayoría de los cristales observados en sección transversal implica que el corte intersecta al plano "de la línea oscura" independientemente de la altura del corte. En el caso del corte longitudinal la probabilidad de que se intersecte éste plano es menor puesto que la orientación de los cristales en esta orientación se da en forma aleatoria alrededor de su eje c, como se comentó en la sección anterior.

Varios autores<sup>1</sup> han interpretado éste plano como el indicio de la descalcificación que sufre el diente durante el proceso carioso. Sin embargo las observaciones hechas por Nylen<sup>6</sup> indican la presencia de ésta desde estadios iniciales del crecimiento. Es decir ésta línea se presenta inmediatamente después de la nucleación de los cristales. Por lo tanto la suposición de que sea un producto de desmineralización podría ser no correcta.

Otros autores<sup>8</sup> lo han interpretado como un defecto planar, el cual puede terminar tanto dentro como fuera del cristal de esmalte. La ausencia en las imágenes de microscopía electrónica del contraste de algún defecto cristalino conocido indica que no se trata de ninguno de ellos; es decir no se trata de dislocaciones, fallas de

apilamiento, frontera de antifase o frontera de gemelación. El hecho de que el defecto planar algunas veces termine dentro del cristalito indica que no puede ser una frontera cristalina.

Otros autores<sup>31</sup> han expuesto la idea de que este defecto se debe a la existencia de un plano del cristal con composición distinta, principalmente un plano de carbonato cuyos iones forman una estructura cristalina coherente a la estructura de la hidroxiapatita. Esto significaría que durante el proceso de crecimiento del esmalte grandes cantidades de iones impureza se encuentran presentes y se incorporan preferencialmente en el centro de los cristalitos en crecimiento. Sin embargo este punto tiene aún que ser comprobado.

A pesar de todo lo anterior no podemos descartar la posibilidad de que a lo largo de este plano se inicie el proceso carioso. Puesto que siendo un defecto por naturaleza la probabilidad de que se inicie la destrucción del cristal en él es alta. En los procesos de desmineralización ha sido demostrado que éste se inicia en el centro de los cristales, apoyando la idea de que este plano representa una zona de vulnerabilidad del esmalte<sup>32</sup>.

Experimentalmente la línea oscura es difícil de observar en el microscopio electrónico de transmisión. Esto se debe entre otras cosas a que su contraste depende fuertemente del valor del foco del aparato representando una fuerte limitante y que sólo seamos capaces de distinguir la línea durante el análisis de las micrografías. Por lo hasta el momento, no podemos hacer un análisis in situ de ésta. Algunas veces se a tenido que proceder a ciegas; es decir realizar el análisis del cristalito suponiendo la línea y luego esperar a observar las micrografías para ver si ésto era cierto o no. Debemos, por lo tanto, buscar un método experimental que nos permita observar la línea in situ en el microscopio electrónico de transmisión para llevar acabo su análisis.

## CONCLUSIONES

1) Los resultados obtenidos tanto por microscopía electrónica de transmisión como de barrido muestran propiedades del esmalte muy interesantes. Las imágenes del microscopio de barrido muestran que el esmalte consiste de prismas, o varillas, compuestas por pequeños cristales ubicados paralelamente al eje longitudinal de éstas, y que van adaptando una inclinación lateral con respecto a la vaina de la varilla. Las imágenes del microscopio de transmisión muestra que el tamaño de estos cristallitos varía con la edad. Por otro lado las imágenes de alta resolución mostraron que la línea oscura tiene el comportamiento de "objeto de fase", es decir que cambia de oscura a blanca en función del foco. El análisis químico nos mostro la existencia de direcciones preferenciales en la estructura del esmalte y, aparte de los elementos que constituyen la hidroxiapatita, también mostro una gran cantidad de Na.

2) Los cristales del esmalte dental humano presentan forma alargada en las imágenes de campo claro, pero están compuestos por un conjunto de cristallitos orientados aleatoriamente a lo largo de su eje c. Por lo tanto podemos concluir que el esmalte está formado por prismas compuestos por cristallitos alargados en la dirección de su eje c que a su vez están compuestos por cristallitos más pequeños que están rotados al rededor de su eje.

3) Los cristales del esmalte son altamente anisotrópicos con uno de sus planos, aquel que representa la línea oscura, paralelo al eje c del cristal. Por lo tanto, en secciones transversales la densidad de cristallitos con línea oscura es mayor que en secciones longitudinales.

4) Los cristales de la muestra anciano ya no presentan alargamiento en la dirección c. Esto es, no hay diferencia en el contraste observado en secciones transversales y el mostrado en secciones longitudinales. De la experiencia adquirida por este trabajo, los cristales mostrados en la muestra infantil son los más perfectos, desde el punto de vista estético, para su observación por

microscopía electrónica de transmisión.

5) La línea oscura es en realidad un plano en el cristal del esmalte el cual ha sido observado desde el inicio del crecimiento de los cristales. Por lo tanto no puede ser un producto del proceso cariioso ni del proceso de desmineralización. Sin embargo sí presenta una zona de vulnerabilidad del diente en el inicio y desarrollo de estos procesos.

6) El análisis químico que tenga como objetivo el estudio de los átomos que forman la línea oscura deberá hacerse utilizando la técnica de EELS. Puesto que, debido a las características de la línea oscura, esta técnica nos permitirá conocer y analizar el medio ambiente químico de los átomos que lo forman.

## BIBLIOGRAFIA

1. ETIOPATOGENIA Y PROFILAXIS DE LA CARIES DENTAL, Asociación Dental Mexicana (1990).
2. Ten Cate. HISTOLOGIA ORAL. Panamericana. 1986.
3. P. D. Frazier, ADULT HUMAN ENAMEL: AN ELECTRON MICROSCOPE STUDY OF CRYSTALLITE SIZE AND MORPHOLOGY, J. Ultrastruc. Res. 28, 1 (1963).
4. R. Zapanta LeGeros. CALCIUM PHOSPHATES IN ORAL BIOLOGY AND MEDICINE. Editor Howard M. Myers, San Francisco California (1991).
5. Whitford G.M., Schuster G.S., Pashley D.H., Venkatwarlu A.P. FLUORIDE UPTAKE BY STREPTOCOCCUS MUTANS. Infect. and immun. 1977;18:680-7.
6. Eggert FM, Maenz L, Tam Y-C. MEASURING THE INTERACTION OF HUMAN SECRETORY GLYCOPROTEINS WITH ORAL BACTERIA. J. Dent. Res. 1987;66:610-2.
7. Pollock J.J., Lotardo S., Gaval R., Grossbard B.L. LYSOSYME-PROTEASE-INORGANIC MONOVALENT IONS LYSIS OF ORAL BACTERIAL STRAINS IN BUFFERS AND STIMULATED WHOLE SALIVA. J. Res. 1987;66:467-74.
8. D. G. A. Nelson, G. J. Wood, J. C. Barry y J. D. B. Featherstone, THE STRUCTURE OF (100) DEFECTS IN CARBONATE APATITE CRYSTALLITES: A HIGH RESOLUTION ELECTRON MICROSCOPE STUDY, Ultramicroscopy 19, 253 (1986).
9. C. M. Alcántara Rodríguez. CARACTERIZACION DEL ESMALTE DENTAL HUMANO POR MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION. Tesis de Licenciatura. Odontología, 1993.
10. E. F. Bres, J. C. Barry, J. L. Hutchinson. A STRUCTURAL BASIS FOR THE CARIOUS DISSOLUTION OF THE APATITE CRYSTALS OF HUMAN TOOTH ENAMEL, Ultramicroscopy 12, 367 (1984).
11. Moss Salentijn. DENTAL AND ORAL TISSUES. Lea & Tebiger. 1990.

12. Abrahamovich.
13. B. Marie U. Nysten ELECTRON MICROSCOPE AND ALLIED BIOPHYSICAL APPROACHES TO THE STUDY OF ENAMEL MINERALIZATION. Journal of the Royal Microscopical Society, Vol. 83, Pts. 1 y 2, June 1964. Pages 135-141.
14. D. Vincent Proverza. ORAL HISTOLOGY. Lea & Febiger. 1986.
15. James K. Avery. ORAL DEVELOPMENT AND HISTOLOGY. (1990).
16. Orban. HISTOLOGIA Y EMBRIOLOGIA BUCALES. 1981.
17. D. Gaspersic. HISTOGENETIC ASPECTS OF THE COMPOSITION AND STRUCTURE OF HUMAN ECTOPIC ENAMEL, STUDIED BY SCANNING ELECTRON MICROSCOPY. Archs oral Biol. Vol. 37. No. 8, pp.603-611, 1992.
18. E. D. Eanes. ENAMEL APATITE: CHEMISTRY, STRUCTURE AND PROPERTIES. J. Dental Special Issue B.58 (B): 829-834, March 1979.
19. Mjor Ivar A. EMBRIOLOGIA E HISTOLOGIA ORAL HUMANA. Salvat. 1989.
20. M. H. Ross, E. J. Reith, L. J. Romrell, HISTOLOGIA TEXTO YATLAS DE COLOR, Panamericana, segunda edición.
21. Y. Doi, E. D. Eanes., H. Shimokawa, and J. D. Termine. INHIBITION OF SEEDED GROWTH OF ENAMEL APATITE CRYSTALS BY AMELOGEN AND ENAMELIN PROTEINS IN VITRO. J. Dent Res 63 (2):98-105, February, 1984.
22. Naray-Szabo, S., Z. Kristallogr. 75.387 (1930).
23. Beevers y McIntyre.
24. Key M. I., Young R. A., and Pousner A.S., Nature 204 (1964).
25. Young R.A. and Elliot J.C. Archs Oral Biol. 11,699 (1966).
26. González, R. C. Y P. Wintz. DIGITAL IMAGE PROCESSING. Addison-Wesley Publishing Company. (1987).

27. Elliot, J. C. CLIN. ORTHOP. 93:313-345 (1973).
28. R. Zapanta LeGeros, CHEMICAL AND CRYSTALLOGRAPHIC EVENTS IN THE CARIES PROCESS, J. Dent. Res. Spec. Iss. 69, 567 (1990).
29. R. W. Phillips. LA CIENCIA DE LOS MATERIALES DENTALES DE SKINNER. Interamericana. Octava edición. 1989.
30. Rönholm, E. THE AMELOGENESIS OF HUMAN THEETH AS REVEALED BY ELECTRON MICROSCOPY, DEVELOPMENT OF THES ENAMEL CRYSTALLITES. J. Ultrastructure Res., 6,249-303.
31. J.C. Voegel and P. Garnier. BIOLOGICAL APATITE CRYSTAL DISSOLUTION. J.Dent. Res. 58(B):852-856, March 1979.
32. J. C. Voegel and R. M. Frank. STAGES IN THE DISSOLUTION OF HUMAN ENAMEL CRYSTALS IN DENTAL CARIES. Calcified Tissue Resech. 24, 19-27 (1977).
33. C. A. Grove, G. Judd, and G. S. Ansell. DETERMINATION OF HIDROXYAPATITE CRYSTALLITE SIZE IN HUMAN DENTAL ENAMEL BY DARK-FIELD ELECTRON MICROSCOPY. J. Dent. Res. January-February 1972.