

Observación del esmalte dental humano con microscopía electrónica

Reyes-Gasga José*

Autor:

* Instituto de Física

Universidad Nacional
Autónoma de México

Correo electrónico:
jreyes@fisica.unam.mx

Recibido: Junio 2012.

Aceptado: Agosto 2012.

Resumen:

Introducción: En este trabajo se describe la investigación que sobre la estructura y composición química del esmalte dental humano (EDH) se ha realizado en el Instituto de Física de la UNAM. El esmalte y la dentina del diente humano tienen una estructura tipo compuesto formada por cristales nanométricos de hidroxiapatita. Este tipo de estructura da lugar a las propiedades conocidas de los dientes humanos.

Objetivo: El objetivo primordial es el análisis y caracterización del defecto llamado "línea oscura", siempre presente en el centro de los cristales de hidroxiapatita.

Material y método: Los dientes humanos permanentes utilizados en el presente trabajo fueron obtenidos a partir de las extracciones realizadas por motivos ortodóncicos o periodontales, y la microscopía electrónica, tanto de barrido como de transmisión, fue la técnica de análisis usada para su estudio.

Resultados: Se describe la estructura y funcionalidad de la "línea oscura" en el EDH siguiendo la hipótesis de que ésta se formó durante la amelogénesis y que, aunque corresponde a un material de fosfato cálcico, está formada por un fosfato diferente a la hidroxiapatita.

Conclusión: Su estructura y funcionalidad es aún desconocida, pero es altamente probable que la "línea oscura" sea la interface entre hidroxiapatita y fosfato octacálcico.

Palabras clave: Esmalte dental humano, "línea oscura", hidroxiapatita, microscopía electrónica.

Abstract:

Introduction: This article describes the work that on the structure and chemical composition of human tooth enamel (EDH) has been performed at the Institute of Physics, UNAM. Both enamel and dentin of human teeth have a composite-like structure with hydroxyapatite crystals of nanometer size. This type of structure gives them their very well-known properties.

Objective: The main objective of this study has been the analysis and characterization of the structural defect named "dark line", always presented in the center of the hydroxyapatite crystals of the EDH.

Materials and method: Permanent human teeth obtained by orthodontic or periodontal extractions were used in this work, and electron microscopy, both the scanning and transmission modes, was the technique of analysis.

Results: The structure and functionality of the "dark line" in EDH is still unknown. We have followed the hypothesis that it was formed during the amelogenesis and corresponds to a calcium phosphate material but different than hydroxyapatite.

Conclusion: The "dark line" could be an interface between hydroxyapatite and octacalcium phosphate.

Key words: Human tooth enamel, "dark line" defect, hydroxyapatite, electron microscopy.

Introducción

Es bien conocido por los odontólogos que el esmalte dental humano (EDH) es translúcido, su color varía entre blanco-amarillento y un blanco-grisáceo; sin embargo, este color no es propio, sino que depende de la dentina. Su transparencia puede atribuirse a variaciones en el grado de calcificación y homogeneidad: a mayor mineralización, mayor translucidez. Esta transparencia es muy importante en el cuidado bucal, ya que per-

mite estudiar las áreas descalcificadas por caries mediante fibra óptica, pues el esmalte difundirá la luz blanca según su grado de mineralización. La *figura 1* muestra las estructuras componentes del diente humano.

El EDH se compone de 96% de material inorgánico y 4% de material orgánico y 1% de agua. La parte inorgánica de un diente humano se conforma principalmente de un fosfato cálcico llamado hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{HO})_2$); sin embargo,

esta hidroxiapatita no es pura como se presenta en algunos minerales en su estado natural, sino que se encuentra con impurezas de sodio, magnesio y cloro, principalmente. Con el análisis químico del diente humano por medio de la detección de los característicos rayos X, generados al incidir un haz de electrones sobre la muestra, se obtienen las señales características del calcio, fósforo, oxígeno, sodio, magnesio y cloro (Figura 2).

Para observar la estructura del EDH a la superficie del diente hay que quitarle unas cuantas micras de material de su superficie. Esto se logra atacándolo químicamente con ácido ortofosfórico. De esta manera podremos ver que el EDH está compuesto de pequeños motivos en forma de cerradura compactados en un arreglo hexagonal (Figura 1). Si partiéramos el diente, de tal manera que se observe al mismo tiempo la dentina y el esmalte, veríamos que estos motivos corresponden a unas “líneas” que corren de la unión amelodentinaria hacia la superficie y se les conoce con el nombre de “prismas”. Los prismas son estructuras alargadas y con un trayecto sinusoidal. Los prismas tienen dimensiones micrométricas (1 micra = 10^{-6} m). La longitud y trayecto de los prismas varían en las distintas zonas del diente debido a que se trata de un registro de la trayectoria seguida por los ameloblastos secretores durante la amelogénesis. Los prismas son más largos en la zona oclusal y más cortos en la zona cervical.

La microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés) nos permite estudiar en detalle la superficie y la estructura del EDH.¹ La figura 1 nos muestra el arreglo de los prismas que conforman el esmalte tanto en sección transversal (tal y como se observan en la superficie del esmalte) como en sección longitudinal (de la superficie a la unión amelodentinaria hacia la superficie).

Si observamos uno de estos prismas a mayor amplificación podremos ver que éstos se componen de millones de cristales a escala nanométrica (1 nanómetro = 10^{-3} micras = 10^{-9} m). Éstos son cristales y están unidos lo más junto posible, pero siempre rodeados de material orgánico. Por lo tanto, podemos decir que el esmalte dental está formado por cristales de hidroxiapatita dentro de una matriz orgánica y se clasifica como un material tipo compuesto. Un material compuesto es cuando dos o más materiales con diferentes propiedades mecánicas se unen para formar una estructura

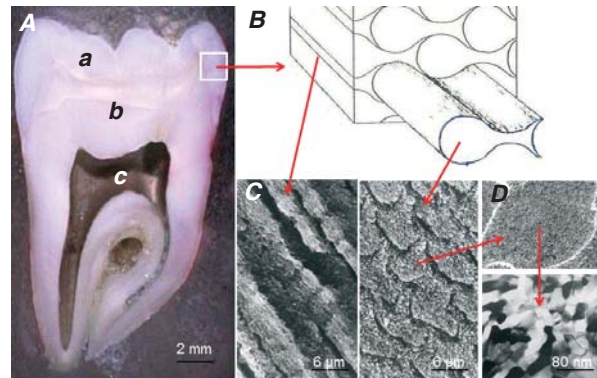


Figura 1. A) Elementos que conforman el diente humano. a) Esmalte, b) Dentina, c) Pulpa. **B)** Dibujo esquemático del arreglo prismático que presenta el esmalte dental. Nótese aquí la forma de “cerradura” que presentan los prismas. Estos prismas van de la unión amelodentinaria hacia la superficie del esmalte. **C)** Imágenes de SEM de los prismas del esmalte en sección longitudinal y transversal. **D)** Imágenes de TEM donde se observan los cristales de hidroxiapatita.

con propiedades mecánicas mejoradas. Un ejemplo clásico de este tipo de material son el cemento y la varilla, que se unen para formar las vigas y columnas de un edificio: la varilla y el cemento no tienen las propiedades adecuadas por sí solos, se requiere de ambos.

Para estudiar los cristales que conforman al prisma, y debido a su escala nanométrica, se usa un microscopio electrónico de transmisión (TEM por sus siglas en inglés). Para observar el EDH con un TEM se requiere que la muestra de EDH tenga un espesor de unos 10 nm, aproximadamente.¹⁻¹⁹ Hay dos modos de preparación para alcanzar estas dimensiones. Uno es hacer polvo el EDH y otro es devastarlo hasta obtener las dimensiones requeridas. En el primer método, el más sencillo, se usa un esmeril (o la pieza de mano) para obtener el polvo del esmalte, que posteriormente se deposita sobre una rejilla de cobre de 3 mm de diámetro, recubierta previamente con una película de plástico “colodión” y una película delgada de carbón. En el segundo método, un poco más laborioso, se usan las técnicas metalográficas, como son los desgastes con papel lija, paños y el pulido a espejo con alúmina. El pulido final se obtiene erosionando atómicamente por medio de un haz iónico (conocido como pulidor “ion milling” por su nombre en inglés). El tipo de estudio que se quiera hacer

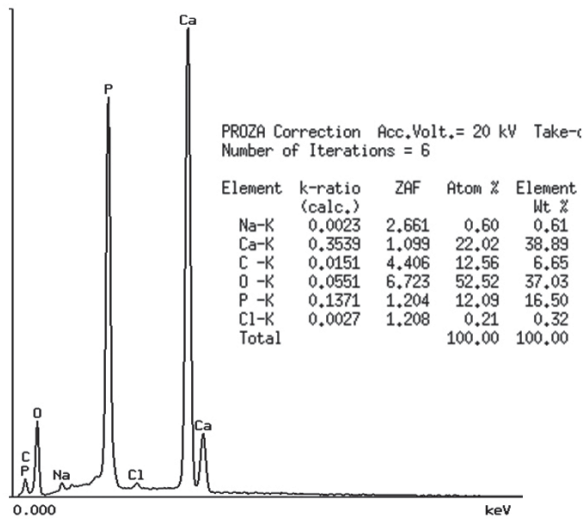


Figura 2. Análisis químico del EDH mediante espectroscopia por dispersión de energía (EDS) de los rayos X característicos generados por los electrones al incidir sobre la muestra en un microscopio electrónico de barrido. En este espectro se registran los elementos calcio (Ca), fósforo (P), oxígeno (O), y carbono. En porcentajes minoritarios se tiene sodio (Na) y cloro (Cl).

marca la diferencia para el método de preparación de una muestra. Por ejemplo, el método de polvo permite hacer el estudio estructural y químico de cristales individuales. Por otro lado, el método metalográfico permite, además, los estudios de la interface entre los cristales y el de interacciones entre éstos. Nosotros hemos empleado los dos métodos de preparación en el estudio del esmalte dental por TEM.¹⁻¹⁹ Por ejemplo, la *figura 3* muestra el espectro de difracción de rayos X generado al interactuar éstos con el polvo de esmalte y los cursores mostrados en rojo indican que este espectro es identificado como hidroxiapatita.

En el caso del método por devastación, los resultados fueron muy interesantes, habiéndose observado los cristales de hidroxiapatita de tamaño nanométrico que conforman al prisma (1 nanómetro es igual a 10^{-9} m). En la *figura 1* se presenta un esquema del EDH donde se observan tanto los prismas en forma de cerradura como los cristallitos de hidroxiapatita que los conforman. Los cristallitos de hidroxiapatita tienen una forma alargada en forma de ladrillos. De hecho, debido a este alargamiento que presentan se dice que éstos forman una estructura tipo texturizada.

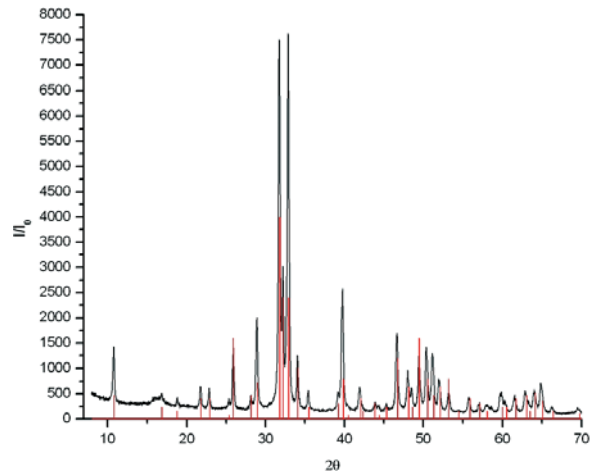


Figura 3. Espectro de difracción de rayos X generado al interactuar los rayos X con polvo de esmalte. Los cursores mostrados en rojo indican que el espectro es identificado como hidroxiapatita.

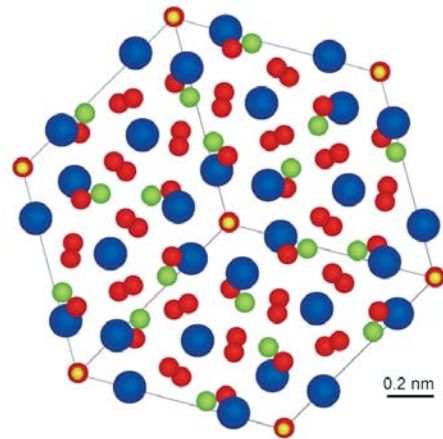


Figura 4. Representación esquemática de la celda unitaria hexagonal de la hidroxiapatita vista desde su plano basal con el arreglo atómico que presentan los átomos de calcio (Ca, en color azul), fósforo (P, en color verde), oxígeno (O, en color rojo) e hidrógeno (H, en color amarillo) dentro de ella.

La hidroxiapatita del EDH

En cristalografía se define la “celda unitaria” como la celda donde los átomos de un material presentan el arreglo mínimo, pero la repetición infinita de esta celda o “ladrillo” dará lugar al material que se trate. En cristalografía se ha demostrado que existen 13 celdas o “ladrillos” en los materiales periódicos y se les llama “Celdas de Bravais”.

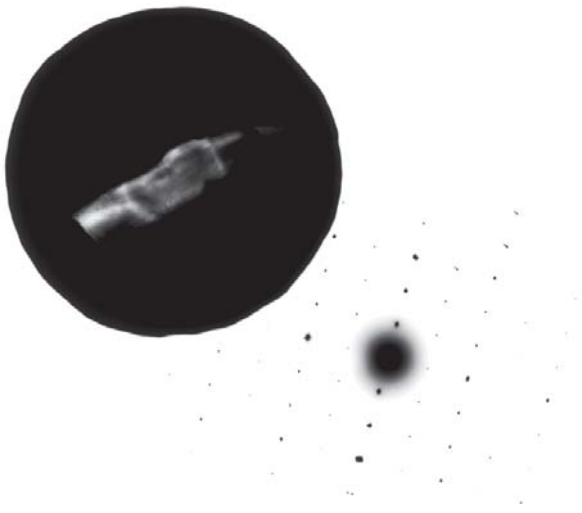


Figura 5. Patrón de difracción electrónica de área selecta de un solo grano de EDH (mostrado en el círculo). El análisis de los patrones de difracción indica que la celda unitaria que presenta el arreglo atómico del esmalte es hexagonal. Se invirtió el contraste de esta imagen para mayor claridad del patrón de difracción.

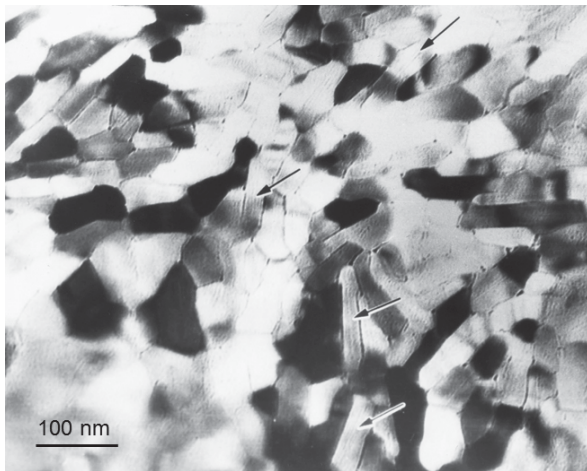


Figura 6. Imagen de TEM de los cristales de hidroxiapatita que conforman el prisma del esmalte dental. Nótese el tamaño que presentan estos cristales y lo compacto de su arreglo. En este caso, estos cristales se encuentran en la cabeza de los prismas. Las flechas indican la presencia de la línea oscura en centro de algunos de los cristales.

El “ladrillo” con el cual se forma la hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) pertenece a una de estas celdas de Bravais. Este “ladrillo” es hexagonal con dimensiones $a = 0.941 \text{ nm}$ y $c = 0.688 \text{ nm}$, con grupo puntual $P6_3/m$.

Una representación de esta celda unitaria se presenta en la *figura 4*. La hidroxiapatita en forma natural también se puede presentar como celda unitaria monoclinica. Sin embargo, los estudios cristalográficos por medio de microscopía electrónica de transmisión, al igual que los de difracción de rayos X (*Figura 3*), demuestran que el esmalte dental presenta una celda unitaria hexagonal.

Esto también lo confirma de forma contundente la difracción electrónica de área selecta en los granos del EDH (*Figura 5*).^{7,14} El patrón de difracción electrónico es la “huella digital” del arreglo atómico que presenta el material bajo estudio. Este patrón es centro-simétrico y pertenece a uno de los 32 grupos puntuales cristalográficos. De hecho, por ser el patrón de difracción una proyección bidimensional del espacio tridimensional, éste pertenece sólo a diez grupos puntuales cristalográficos. Al conocer sólo tres de estos patrones de difracción, que no sean colineales (los cuales se obtienen al inclinar la muestra *in-situ* en el MET), se logra definir experimentalmente la celda de Bravais a la que pertenece un material. Este modo de operación del microscopio electrónico permite seleccionar uno de los cristales y obtener su patrón de difracción, tal y como se muestra en la *figura 5*.

Imágenes a nivel atómico del esmalte dental

La *figura 6* presenta la imagen de TEM convencional y la *figura 7* presenta la imagen de alta re-

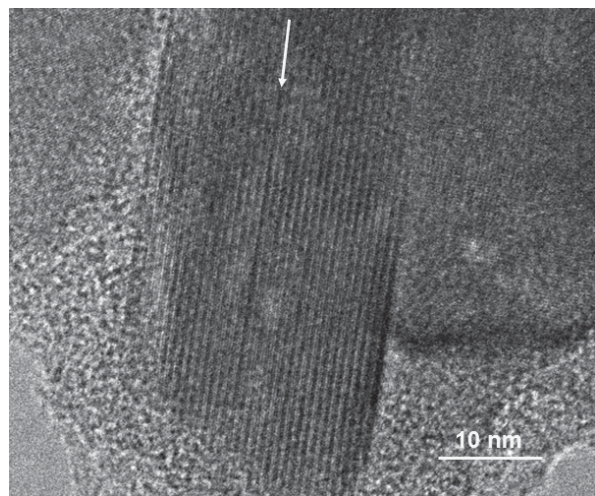


Figura 7. Imagen de HRTEM de uno de los cristales del EDH mostrando la presencia de la línea oscura en centro (indicada por la flecha).

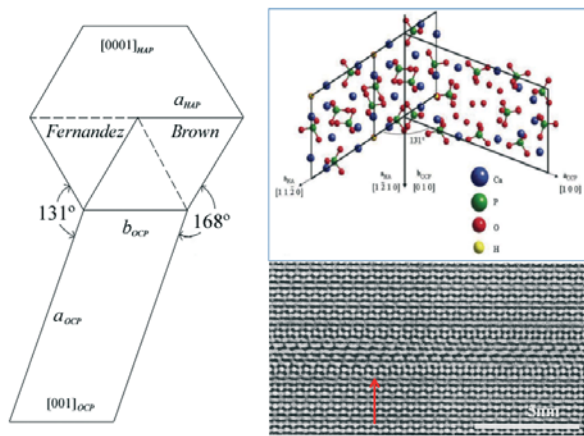


Figura 8. Análisis de la interface entre el fosfato octacálcico y la hidroxiapatita. El esquema representa la forma en que se unirían la celda unitaria de la hidroxiapatita y del fosfato octacálcico para generar la interface. También se presenta la imagen simulada a partir del modelo y cuyo contraste concuerda con la imagen experimental. Si se observa esta imagen de forma rasante a lo largo de la flecha, se define una dislocación claramente.

solución (HRTEM, por sus siglas en inglés) del esmalte dental. Como se puede observar en la figura 7, cuando observamos por TEM el arreglo de cristales del EDH inmediatamente comenzamos a ver “parches” en la imagen. El origen de estos “parches” se basa en el hecho de que el EDH no es conductor.^{2,5} Así que estos “parches” son la huella del proceso de daño electrónico. Cuando una muestra no conductora es observada por microscopía electrónica, debido a que los electrones incidentes no son conducidos a “tierra”, los electrones “atrapados” en la muestra comienzan a destruirla. Esto representa una limitante en la observación del EDH, pues después de un corto tiempo de observación la muestra comienza a destruirse y estos “parches” cubren la totalidad del área de observación.^{8,16,18}

Viendo con detenimiento la imagen de HRTEM del EDH de la figura 7 podemos observar que los cristales de la hidroxiapatita presentan un “defecto” en el centro (indicado por la flecha). El estudio de este defecto es muy importante, ya que cuando el esmalte se somete a un proceso de disolución por medios ácidos, como en el caso del proceso carioso, los cristales del EDH comienzan a disolverse principalmente en el centro del cristal; es decir, exactamente en el lugar donde se encuen-

tra este “defecto”, al cual se le ha dado el nombre de “la línea oscura”.^{4,15}

La línea oscura

El estudio tanto de la estructura y composición química de la hidroxiapatita del EDH, así como su cristalografía son necesarios para caracterizar y entender completamente el papel que juega la línea oscura en la estructura del esmalte.^{3,10,11,16} A pesar de los equipos modernos de TEM y HRTEM, el estudio estructural y químico de la “línea oscura” son temas nada fáciles de llevar a cabo. Hay que tomar en cuenta que la línea oscura representa un contraste con un espesor entre 1 a 2 nm. Además su contraste es fuertemente dependiente del foco del microscopio: cuando la imagen de un cristal del EDH está sobre-enfocada la línea aparece oscura (de ahí su nombre), cuando está desenfocada aparece blanca, y en foco exacto desaparece.^{4,15}

Existen varias hipótesis sobre la estructura y composición química de la línea oscura y sobre el papel que representa en la estructura del EDH.

Se ha comentado que ésta puede ser producto de una descalcificación, una dislocación, una frontera de grano, etc. Sin embargo, hasta el momento, ninguna de ellas ha sido claramente comprobada. Recientemente surgió la idea que la línea oscura es el residuo de un material diferente a la hidroxiapatita que se originó durante la amelogénesis (de aquí que se disuelva primero durante un ataque ácido). Así, la línea oscura se presenta como resultado de la existencia de otro material que se produjo antes que el cristal de hidroxiapatita y que funcionó como base para que el cristal de hidroxiapatita nucleara y creciera para dar origen al EDH. Este material previo se supone que es otro fosfato cálcico, llamado fosfato octacálcico.¹⁷

Nuestro grupo decidió, por lo tanto, trabajar también en esta dirección. Tomando en cuenta que los parámetros de la celda unitaria del fosfato octacálcico son $a = 1.98$ nm, $b = 0.96$ nm, y $c = 0.68$ nm con una celda de Bravais triclinico y grupo espacial P1, se ve inmediatamente la forma de relacionar ambas celdas unitarias.⁹ De este modo, se generó un modelo de la línea oscura a partir de la celda unitaria de la hidroxiapatita y de la celda del fosfato octacálcico (Figura 8). Una vez que se cuenta con un modelo del material bajo estudio, es relativamente fácil simular el contraste que éste debe de presentar en un microscopio HRTEM.

Uno de los resultados interesantes que nos muestra este modelo, y como resultado de las diferencias dimensionales de entre las celdas unitarias de la hidroxiapatita y del fosfato octacálcico, es la predicción de dislocaciones alrededor de la zona de la línea oscura. Por lo tanto, nos dimos a la tarea de inspeccionar con cuidado esta zona. La *figura 8* muestra la imagen simulada, donde se observa, en forma rasante en la dirección mostrada por la flecha, que existe el contraste de una dislocación.

Agradecimientos

Al Dr. Ramiro García-García por haber colaborado de forma importante en la preparación de varios trabajos escritos sobre este tema. También agradece a Pedro Mexía, Roberto Hernández, Carlos Flores, Luis Rendón, Samuel Tehuacanero, Cristina Zorrilla, Jaqueline Cañetas, Manuel Aguilar, Mario Monroy Escamilla y Carlos Ángeles por el apoyo técnico realizado en el estudio del EDH e hidroxiapatita. De igual manera agradece el análisis que sobre este tema realizaron en sus tesis profesionales Elson Sánchez Pastenes, Marisol Reyes Reyes, María Josefina Arellano Jiménez, Claudia Minerva Rodríguez Alcántara, Ana María Trejo González, Alfredo Madrigal, María del Jesús Gloria, Laura Vargas Ulloa, Irma Belio Reyes, Carlos Eduardo Zamora Montes de Oca, Irma Araceli Belio Reyes, América Ayuso Arce, María del Pilar Gutiérrez Salazar, Gaby E. Tiznado Orozco, Ivet M. Gil Chavarría, Ana Guadalupe Rodríguez Hernández. Este trabajo fue realizado con el apoyo económico de la DGAPA-UNAM con el proyecto IN101710.

Referencias bibliográficas

1. Reyes-Gasga J, Gloria M, González M, Madrigal A. La microscopía electrónica y el EDH. *Revista Ciencia y Desarrollo del CONACYT*. 1995; XXI(125): 30.
2. Reyes-Gasga J, García R, Vargas-Ulloa L. In-situ observation of fractal structures and electrical conductivity in human tooth enamel. *Philosophical Magazine*. 1997; 75: 1023-40.
3. Reyes-Gasga J, Alcántara-Rodríguez C, González-Trejo A, Madrigal-Colín A. Child, adult and aged human tooth enamel characterized by electron microscopy. *Acta Microscopica*. 1997; 6: 25.
4. Belío-Reyes A, Vargas-Ulloa L, Jiménez-García L, J Reyes-Gasga. Chemical analysis around the crystal dark line of the human tooth enamel crystallites. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*. 1999; 19: 52-56.
5. Reyes-Gasga J, García R, Álvarez-Fregoso O, Chávez-Carvayar J, Vargas-Ulloa L. Conductivity in human tooth enamel. *Journal of Materials Science*. 1999; 34: 2183-8.
6. Reyes-Gasga J. Estudio del EDH por microscopía electrónica y técnicas afines. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*. 2001; 21(2): 81-5.
7. Reyes-Reyes M, Reyes-Gasga J, García R. Análisis por microscopía y difracción electrónica de las reflexiones prohibidas de la hidroxiapatita del EDH. *Tip Revista en Ciencias Químicas-Biológicas*. 2001; 4(1): 40-9.
8. Reyes-Gasga J, García-García R. Analysis of the electron-beam radiation damage of TEM samples in the acceleration energy in the range from 0.1 to 2 MeV using the standard theory for fast electrons. *Radiation Physics and Chemistry*. 2002; 64: 359-67.
9. Fernández M, Zorrilla-Cangas C, García-García R, Ascencio J, Reyes-Gasga J. New model for the hydroxyapatite-octocalcium phosphate interface. *Acta Crystallographica*. 2003; B59: 175-81.
10. Gutiérrez-Salazar M, Reyes-Gasga J. Microhardness and chemical composition of human tooth. *Materials Research* 2003; 6: 1-7.
11. Sánchez-Pastenes E, Reyes-Gasga J. Determination of the point and space groups for hydroxyapatite by computer simulation of CBED electron diffraction patterns. *Revista Mexicana de Física*. 2005; 51: 525-9.
12. García Garduño M, Reyes-Gasga J. La hidroxiapatita, su importancia en tejidos mineralizados y su aplicación biomédica. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 2006; 9: 90-5.
13. Gil-Chavarría I, García-García R, Reyes-Gasga J. Comportamiento estructural de la unión esmalte-dentina en dientes humanos: un modelo mecánico-funcional. *Acta Microscópica*. 2006; 15: 34-47.
14. Reyes-Gasga J. Estudio por microscopía electrónica del EDH. *Revista "Tecnología y Desarrollo"*,

- Revista de Ciencia y Desarrollo del Perú. 2007; 3: 6-12.
15. Reyes-Gasga J, Carbajal-de-la-Torre G, Bres E, Gil-Chavarría I, Rodríguez-Hernández A, García-García R. STEM-HAADF electron microscopy analysis of the central dark line defect of human tooth enamel crystallites. *J Mater Sci: Mater Med.* 2008; 19: 877-882.
 16. Reyes-Gasga J, García-García R, Arellano-Jiménez M, Sánchez-Pastenes E, Tiznado-Orozco G, Gil-Chavarría I, Gómez-Gasga G. Structural and thermal behavior of human tooth and three synthetic hydroxyapatites from 20 to 600 °C. *J Phys D Appl Phys.* 2008; 41(22): 1-11.
 18. Arellano-Jimenez M, Garcia-Garcia R, Reyes-Gasga J. Synthesis and hydrolysis of octacalcium phosphate and its characterization by electron microscopy and x-ray diffraction. *Journal of Physics and Chemistry of Solids.* 2009; 70: 390-5.
 18. Reyes-Gasga J, Garcia-Garcia R, Bres E. Electron beam interaction, damage and reconstruction of hydroxyapatite. *Physica.* 2009; B 404: 1867-73.
 19. Tiznado-Orozco G, Garcia-Garcia R, Reyes-Gasga J. Structural and thermal behavior of carious and sound powders of human tooth enamel and dentine. *Journal of Physics D: Applied Physics.* 2009; 42(23): 235408.