

EL PROBLEMA DEL TAMAÑO DEL GRANO EN EL ESMALTE Y LA DENTINA

por G. ZAMPIGHI*, P. KITTL** y R. ALVAREZ**

1 Resumen

Se revisan los diferentes métodos usados para estudiar la textura de los dientes (tanto en esmalte como en dentina): en microscopia óptica; rayos X; microscopia electrónica de réplicas en muestras fracturadas, en muestras pulidas y atacadas, en muestras transparentes obtenidas por molienda; y finalmente la difusión de la luz.

Se discute la certeza, que en la determinación de la textura, puede tener cada método. Se dan a conocer los métodos, que se han puesto a punto en este laboratorio para encarar el problema.

2 Abstract

The different methods used to study teeth textures in enamel and dentine, are revised: optical microscopy; x-rays; electron microscopy of broken samples, in polishing and etching samples, in transparencies obtained by grinding; and finally light diffusion. For each method the degree of certainty in determining the texture is discussed. The methods that have been developed in this laboratory to face the problem are exposed.

3 Introducción y planteo del problema

En 1836 Retzius (1) observó al microscopio óptico, ciertos detalles estructurales del esmalte y la dentina. Autores posteriores como Czermack (2), Purkinje (3) y otros, gracias al adelanto de las técnicas ópticas (corte adelgazado, corte desmineralizado y tinciones) completaron el estudio morfológico del esmalte y la dentina.

El microscopio óptico tiene un poder de separación, que no va más allá de 1μ . Esta limitación impidió el estudio y conocimiento de detalles más finos de la estructura del esmalte y la dentina.

Möller y Trömel (4) en 1933 estudiando el esmalte con rayos X, indicaron la presencia de una estructura más fina. Ya el análisis químico había comprobado que los dientes están compuestos en su mayor parte por fosfato tricálcico más un contenido variable de sustancia orgánica. Möller y Trömel confirman este hecho, determinando además, el tamaño de las partículas o granos que constituyen el esmalte, estimando su largo en $10,000 \text{ \AA}$.

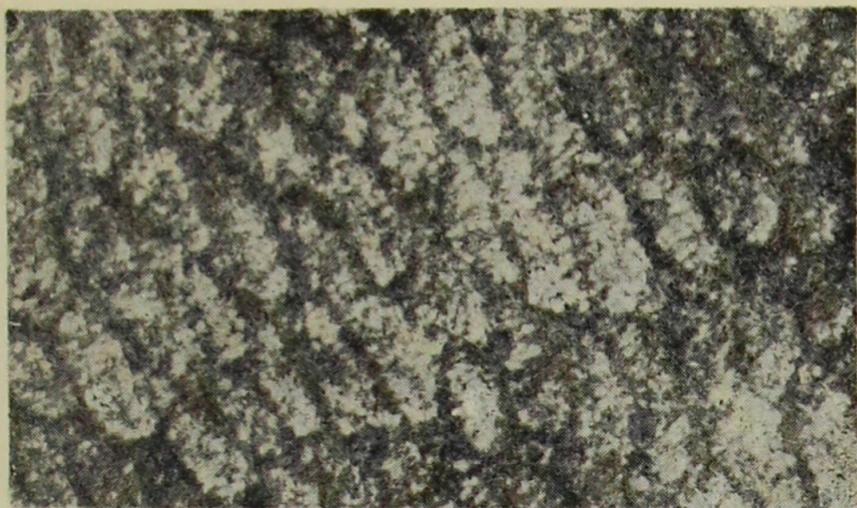
Las sustancias químicas pueden agruparse en disposiciones regulares de átomos que se repiten periódicamente en las tres direcciones del espacio constituyendo los cristales de estas sustancias. Esta disposición regular de átomos, al ser iluminada por rayos X, los difracta lateralmente; este fenómeno es equivalente a la difracción de la luz por una rendija. Como se sabe, la luz y los rayos X son ondas electromagnéticas de diferente longitud de onda.

La estructura compuesta con los períodos mínimos de repetición en tres direcciones se denomina celda-unidad de la sustancia en cuestión. Una agrupación de varias celdas-unitarias, constituye una partícula o grano, y la variación del tamaño de estos granos hace variar la forma en la que se difractan los rayos X en cada dirección. Cuando el tamaño de grano es muy pequeño, los rayos X se difractan en forma más difusa en cada dirección. Estudiando la forma de difracción de los rayos X en cada dirección, lo que se llama perfil de línea, se puede estimar el tamaño de los granos. Este es el fundamento de la determinación del tamaño de las partículas con difracción de rayos X. Con los rayos X se puede obtener tres tipos de información: a) disposición de los átomos en la celda-unitaria; b) tamaño de los granos, compuestos por agregados de celdas unitarias; c) orientación de estos granos, respecto de la geometría de la muestra investigada. Con respecto al tamaño de grano la presencia de una fase orgánica variablemente distribuida, podría alterar el perfil de línea y por lo tanto invalidar la determinación del tamaño de grano por este método. El microscopio electrónico ha sido utilizado con gran éxito en el estudio de los tejidos altamente calcificados del diente, pero en el problema del tamaño de grano y orientación de los cristales, no se han obtenido resultados satisfactorios.

La técnica de réplica de superficies pulidas y atacadas ha sido usada regularmente y los resultados obtenidos dependen de la velocidad de ataque del ácido empleado, que varía con la diferente densidad atómica que presenta cada grano y con la cantidad, calidad y ubicación de las impurezas. En el caso del esmalte,

*Escuela Dental de la Universidad de Chile y Laboratorio de Microscopia Electrónica del IDIEM.

**Laboratorio de Microscopia Electrónica del IDIEM, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Chile, Casilla 1420, Santiago, Chile.



1 Prismas cortados oblicuamente. Muestras pulidas, atacadas y metalizadas con Al. Visto por microscopia óptica por reflexión. 2.000 ×



2 Prismas cortados oblicuamente. Réplica al microscopio electrónico de una muestra pulida y atacada. Compárese el poder separador con la figura anterior. 3.700 ×

su mayor porcentaje es hidroxapatita y su impureza sería la proteína orgánica que es un 0,6%, según Eastoe (5). Esta proteína no es atacada por los ácidos, permaneciendo en las superficies como una eminencia, que se puede interpretar como el límite de un grano, obteniéndose así, resultados falseados según esta técnica. El ataque con etilendiamina ayuda al estudio del tamaño de grano porque elimina la substancia orgánica, la cual entorpece la interpretación de las fotos.

En el esmalte en que la substancia orgánica representa el 0,6% su utilidad no es muy considerable. En cambio, en la dentina donde el 30-35% es substancia orgánica, el retiro de esta substancia nos permite un estudio acabado del cristal in situ.

La técnica de réplica de superficies fracturadas, muestra según Hall (6) más detalles de los cristales. Sin embargo, la fractura de un compuesto químico depende de su dureza; como ya se especificó en el esmalte existe una proteína variablemente distribuida que hace variar la dureza y también se podrían falsear los resultados obtenidos por esta técnica.

La técnica del corte desmineralizado, no es aplicable para el estudio del problema del tamaño de grano

sino que se utiliza para el estudio de la porción orgánica. Actualmente está siendo dejada de lado debido a que desnaturaliza las proteínas dándonos una visión errónea de su estructura.

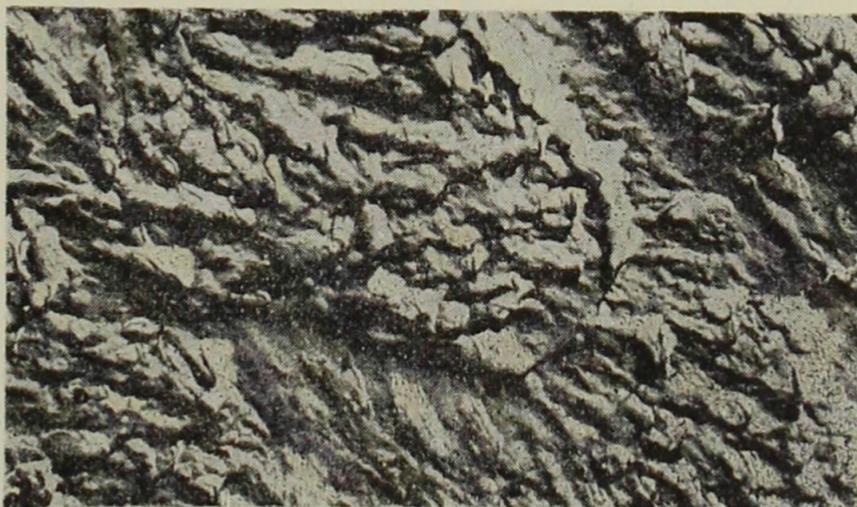
La técnica ideal sería la preparación de una lámina delgada tanto de esmalte como de dentina. Sin embargo, los problemas técnicos han sido insuperables. Se le ha intentado por desgaste, pero cuando la lámina delgada llega a los 2-3 μ de espesor se desintegra en pequeños pedacitos.

Estas láminas delgadas si bien no es posible prepararlas de gran tamaño, se pueden obtener por molido y selección de trozos por decantación, según método descrito por Kato (7). Estas partículas de un espesor de algunos centenares de Å y un área aproximada de 1 μ^2 son aptas para ser observadas por transparencia al microscopio electrónico.

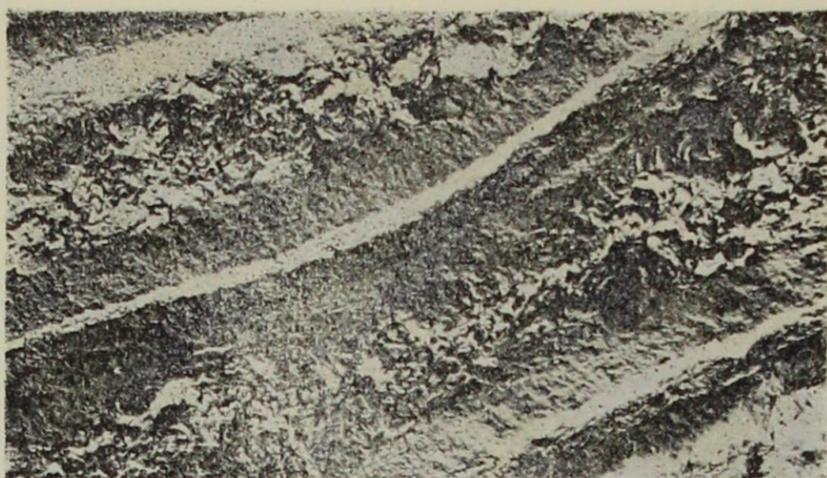
Empero la falta de contraste impide la observación de detalles por la simple transparencia, lo cual se podría evitar con el uso de tinciones. Pese a la falta de contraste, se puede, sin embargo, investigar la naturaleza de estas partículas sometiéndolas a un análisis por difracción. Esta difracción no puede ser



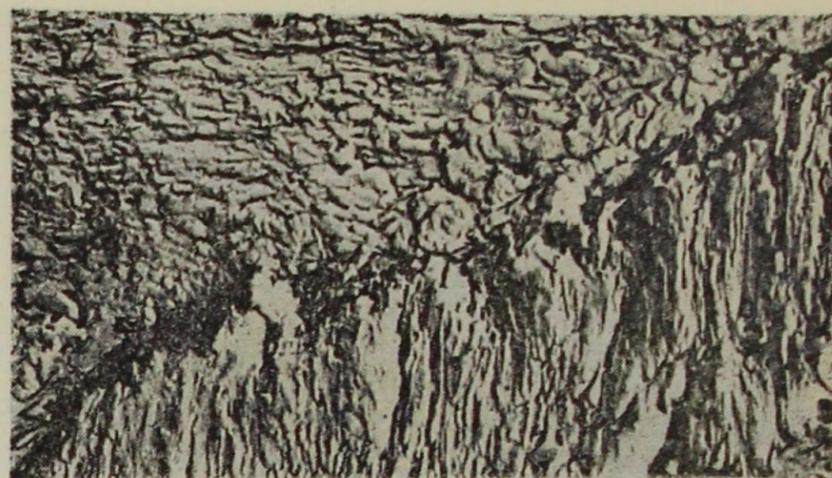
3 Prismas cortados oblicuamente. Réplica observada al microscopio electrónico, de una muestra pulida y atacada. Nótese el ancho considerable de la substancia interprismática. 8.600 ×



4 Prismas cortados oblicuamente. Réplica observada al microscopio electrónico, de una muestra pulida y atacada. Nótese la subestructura de los prismas. 21.000 ×



5 Canaliculos dentinarios vistos longitudinalmente. Réplica observada al microscopio electrónico de una muestra obtenida por rotura. Nótese las diferentes estructuras: canaliculos dentinarios, dentina intercanalicular y pericanalicular. 9.200 ×



6 Réplica observada al microscopio electrónico de esmalte de una muestra obtenida por rotura. Nótese dos zonas de diferente orientación. La superior podría corresponder a una zona prismática. 15.200 ×

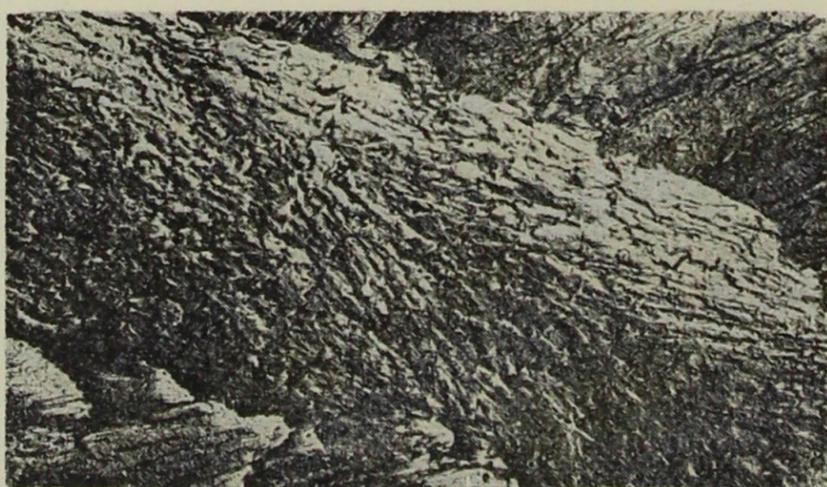
mediante rayos X, debido a que no es actualmente posible obtener un haz suficientemente intenso de $1 \mu^2$ de sección. El microscopio electrónico puede resolver este problema puesto que permite concentrar un haz intenso de electrones en una zona de aproximadamente el tamaño de la partícula. Estos electrones son difractados por los átomos del compuesto según ciertas direcciones bien determinadas. Cuando la partícula iluminada es un monocristal la difracción produce una distribución regular y discontinua de haces difractados. En el caso que las partículas tengan un gran número de granos orientados al azar, cada uno de los haces difractados por un grano en una cierta dirección y que forme un determinado ángulo con el haz incidente podrá girar alrededor del haz incidente como eje de la misma manera que gira la orientación cristalina del grano respecto al eje. El lugar geométrico de los haces difractados estará contenido en conos que al cortar la pantalla del microscopio electrónico perpendicular al haz incidente, engendrará un círculo.

Resumiendo, la aparición sobre la pantalla de una

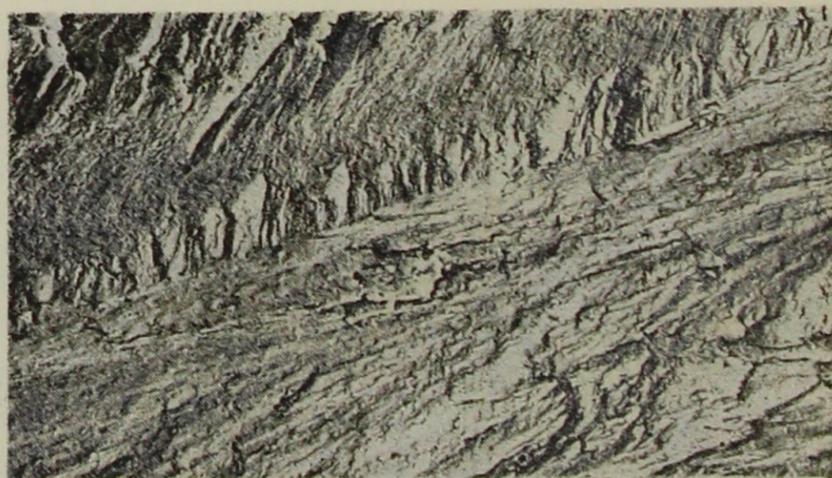
disposición discontinua de puntos indica la presencia de un monocristal, cuando estos puntos se agrupan en círculos denota la presencia de un policristal.

En el caso de esmalte y la dentina, hay divergencia entre los autores. Scott (8) presenta anillos tanto para la zona prismática como interprismática. En la dentina en cambio Kato (7) muestra diagramas de puntos y Frank (9) tanto para zonas pericanalicular como intercanalicular muestra diagramas de anillos. Ambos autores, Frank y Kato, informan haber usado área selecta; si suponemos que en ambos casos se iluminó la misma zona podemos estimar para el caso de anillo un tamaño de grano de aproximadamente 300 \AA , y para el caso de puntos, que se trata de un monocristal de un tamaño aproximado a la de la partícula iluminada, $1 \mu^2$.

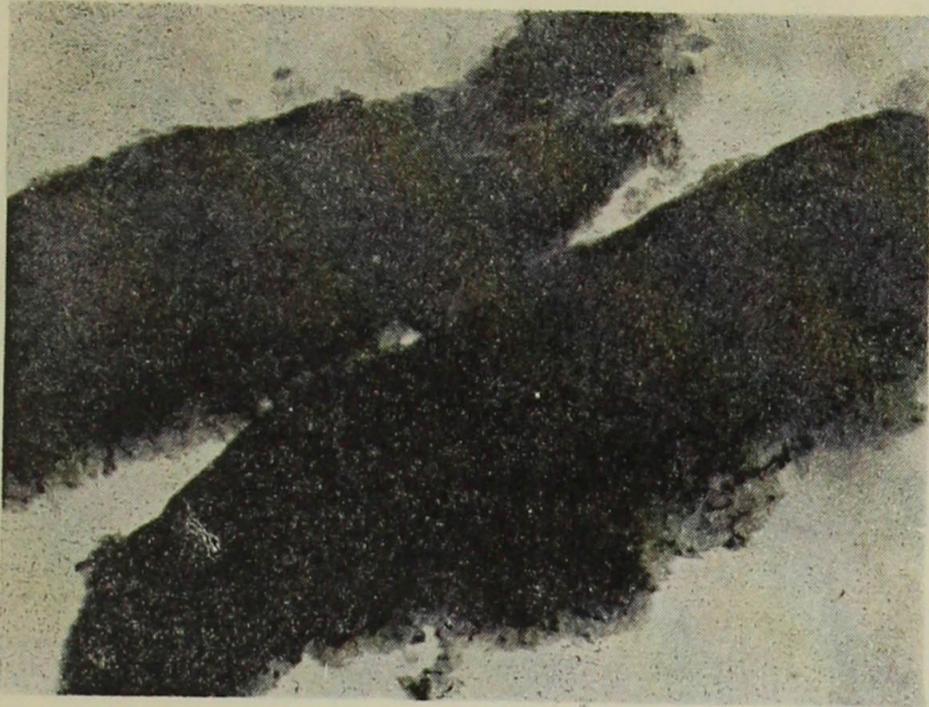
En el presente trabajo, nos hemos ocupado de poner a punto varios métodos diferentes de investigación con el objeto de comparar en forma directa los diferentes resultados obtenidos, habiendo agregado además una nueva técnica que es la difusión de la luz.



7 Réplica observada al microscopio electrónico de una muestra obtenida por rotura. La diferente orientación cristalina no nos permite aclarar si nos encontramos en una zona prismática o interprismática. 18.500 ×



8 Réplica observada al microscopio electrónico de esmalte de una muestra obtenida por fractura. Obsérvese la orientación diferente en las dos zonas. 9.200 ×



9 Trozos de esmalte de una muestra molida. Observada por transparencia, en el microscopio electrónico, a la derecha el diagrama de difracción de las partículas. Nótese la disposición en anillos de los puntos de difracción. 30.000 ×



10 Trozos de esmalte de una muestra molida. Observada por transparencia en el microscopio electrónico, a la derecha el diagrama de difracción de las partículas. Nótese la disposición de los puntos de difracción. 30.000 ×

4 Preparación de las probetas y resultados obtenidos

a) Microscopia óptica.

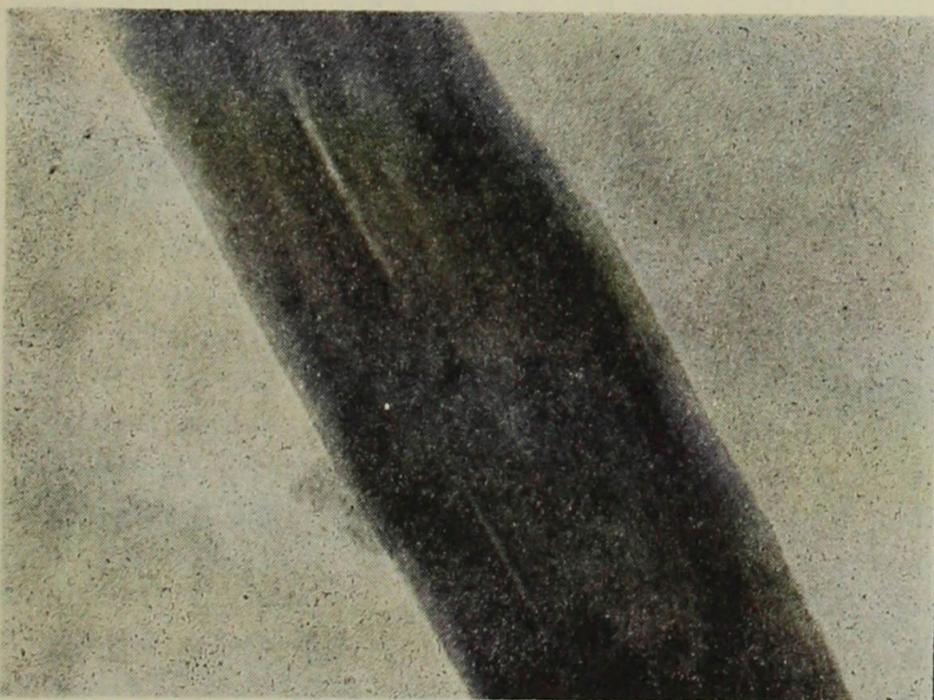
La muestra es un diente sano extraído por razones paradenciopáticas. Se le incluye en plástico y se somete al procedimiento rutinario de pulido. Luego se ataca con HCl al 5% durante 45 segundos, se vaporiza Al en su superficie y se observa por reflexión (Fig. 1).

Se observa con este método, en el esmalte, los prismas y la substancia interprismática. El contraste que permite observar los prismas es debido a la diferente forma de reflexión de las distintas zonas. Además

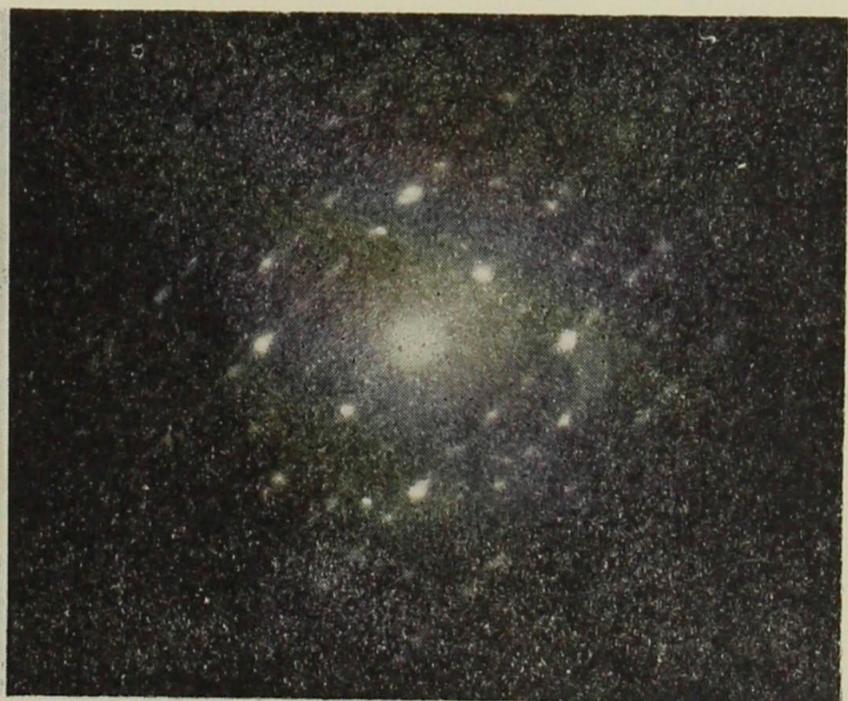
es bastante clara una subdivisión en el interior de los prismas.

b) Microscopia electrónica.

La probeta es un diente tratado con CaF_2 . Se le incluye en plástico y se somete al mismo procedimiento de pulido. Se le ataca con HCl al 1% durante 5 segundos. La superficie así pulida y atacada se impresiona con triafol y se sombrea con Cr a 45° y C a 90° . A las impresiones así sombreadas se les recubre con una capa de parafina, se disuelve el triafol con baños sucesivos de acetato de amilo, y una vez retirado totalmente el triafol se disuelve la parafina



11 a) Corte delgado longitudinal de un diente 8 ×



11 b) Muestra iluminada por dos haces paralelos, que a la izquierda ilumina la dentina y a la derecha el esmalte. Obsérvese la difusión en ambos casos. 8 ×

procediéndose a pescar las muestras con una grilla que se lleva al microscopio electrónico. La réplica así obtenida es negativa (Figs. 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8).

Con esta técnica, se observan los prismas de un diámetro aproximado entre 5-6 μ y de una forma de arcadas incompletas. En el interior de los prismas podemos ya observar la presencia de una estructura y una zona circundante o substancia interprismática de aproximadamente 1 μ (Fig. 2).

En la figura 3 se observan muy claramente prismas de varias formas que dependen de la dirección del corte y diámetros. Se ve la substancia interprismática que posee un ancho que varía entre 1 y 3 μ .

En la figura 4 podemos observar a mayor aumento la típica forma de arcadas del prisma rodeado de una zona delgada de substancia interprismática. El ataque muestra claramente una topografía que podemos considerar como granos, tanto en la zona prismática como interprismática. Estos granos presentan una forma alargada sin una dirección preferencial dentro de cada prisma y sus dimensiones están comprendidas en 1 μ de largo y 0,2 μ de ancho. Una zona con respecto a la otra cambia su orientación en 90°, única diferencia notoria encontrada entre el prisma y la substancia interprismática, diferencia que no justifica el uso de esta terminología distinta.

En la técnica de réplica de superficies fracturadas, se usó como probeta un diente sano que se fracturó por medios mecánicos. Se realizaron réplicas de triáfol que se somborean con Cr a 45° y C a 90°. Se monta al microscopio electrónico según procedimiento descrito anteriormente. En la figura 5 se observa una réplica de fractura de dentina, pudiéndose describir las diferentes estructuras, como ser el canalículo, la dentina pericanalicular y la dentina intercanalicular. El diferente grado de calcificación de la dentina pericanalicular y de la intercanalicular, hace que la fractura de la primera sea neta y la de la segunda irregular.

En la figura 6 se muestra una réplica de fractura del esmalte. Se puede describir dos zonas, una superior que se subdivide en pequeñas superficies en que predomina la forma rectangular con sus ejes mayores paralelos entre sí y una zona inferior, en que estas pequeñas superficies poseen su eje mayor paralelo entre sí y más largo que el de la zona superior. Estas superficies tienen forma alargada y el eje mayor de la zona superior está rotado en 90° con respecto a la zona inferior. Además, en las dos zonas y repartidos al azar, se observan pequeños puntos de sección perfectamente circular, que podrían corresponder a fibras orgánicas que permanecen en el esmalte maduro, a pesar de que Fearnhead (10), Millard y Pau-

tard (11), y Höhling (12), comunican que no es posible observarlas en el esmalte totalmente calcificado.

La figura 7 corresponde a una réplica de fractura del esmalte, en ella se observan tres zonas: una superior, una media, y una inferior. La zona superior y la zona inferior parecen corresponder a zonas prismáticas, la zona media sería la interprismática. En las tres zonas se pueden observar las figuras punti-formes descritas anteriormente como correspondientes a fibras orgánicas. La zona superior se subdivide en pequeñas superficies de forma rectangular con su eje mayor muy alargado. En la zona media parece observarse una parte central en que los cristales son paralelos entre sí y partes laterales que van divergiendo e inclinándose con respecto al eje central. Las pequeñas superficies de la zona media tienen eje mayor más corto que los de las otras dos zonas. La zona inferior es igual a la superior ya descrita.

En la figura 8 se observan las dos zonas, subdivididas en pequeñas superficies de la misma manera que en la figura 7.

c) Difracción de área selecta.

De un diente sano extraído por razones ortodóncicas, se arrancan pedacitos con ayuda del torno dental. Estos se embeben en aceite de linaza y entre dos vidrios se frotan para reducir su tamaño. Se lava la muestra con benceno y se procede a pescar aquellos que estén en suspensión. Con este método se prepararon muestras de esmalte y dentina.

En la figura 9 a) se observan dos partículas poco transparentes. En la figura 9 b) se observa el diagrama de difracción en anillos que muestran claramente la presencia de un policristal con un tamaño medio de 5.000 Å por cristal.

La figura 10 corresponde a una partícula de 1,5 μ de largo por 0,5 μ de ancho sensiblemente monocristalina.

d) Difusión de la luz.

Cuando un haz luminoso al introducirse en un medio se transmite lateralmente se dice que este medio difunde la luz. En general esta difusión es producida por partículas suspendidas en el medio en que actúa la luz o que existan zonas de pequeño tamaño de diferentes propiedades ópticas que la del medio donde están dispersadas. Estas partículas pueden ser no sólo submicroscópicas sino también átomos o moléculas. Esta propiedad depende del tamaño de las zonas (partículas) y produce un efecto de emitir lateralmente las longitudes de onda mayor siendo las de menor longitud de onda menos dispersadas. Así, una lámina delgada de esmalte o dentina será azulada observada por reflexión y parda o rojiza por transparencia. Estudiando la característica de

la luz transmitida, se puede llegar a determinar el tamaño de las partículas que constituyen el diente. La experiencia realizada consiste en hacer pasar un delgado haz de luz a través de una lámina delgada cortada de un diente, y de impresionar una película fotográfica pegada a la superficie por donde sale la luz. Lateralmente a la sección recta del haz luminoso aparece un halo de luz difundida (Fig. 11).

5. *Discusión*

Los resultados obtenidos usando las diferentes técnicas descritas son los siguientes:

- a) Para réplica de superficies pulidas y atacadas 10.000 Å de largo por 2.000 Å de ancho.
- b) Para réplica de superficies fracturadas se obtiene 7.000 Å de largo por 3.000 Å de ancho.
- c) Difusión de la luz 5.000 Å.
- d) Difracción de electrones: se ha obtenido un tamaño medio de 10.000 Å.

Como se puede apreciar los resultados son concordantes. Como meta futura está el averiguar no sólo un valor medio aproximado del tamaño de grano del esmalte y la dentina, sino las razones por las cuales los autores han obtenido valores diferentes a los nuestros y diferentes entre sí, usando las mismas técnicas.

Finalmente queda sólo agregar que, por razones de espacio disponible en la presente publicación, nos impide una discusión detallada de los resultados.

6. *Agradecimientos*

A Mrs. C. Barceló e I. Dümmler por su asistencia en el trabajo de microscopía electrónica.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Retzius, A.: *Academicus Handlingar för år* (1836), Stockholm, 52-140 (1838)
- (2) Czermack, J.: *Z. Zool.*, 2, 297-322 (1850)
- (3) Purkinje: *Zitiert bei Czermak* (1835)
- (4) Möller, H., y Trömel, G.: *Naturwiss.* 21, 346 (1933)
- (5) Eastoe, J. E.: *Nature*, 187, 411-412 (1960)
- (6) Hall, D.: *J. Dent. Res.*, 37, Nº 2, 243-253 (1958)
- (7) Kato, S. y Ohkura, Y.: *Nihon Univ. U. S. D.*, 3, Nº 4 (1902)
- (8) Scott, D. B. y Wyckoff, W. G.: *J. of the Royal Microscopical Society*, vol. LXXV, Part 4, Dec. (1956)
- (9) Frank, R. M.: *Third European Symposium on Calcified Tissues*, editado por H. Fleisch, H. J. J. Blackwood y M. Owen (1966)
- (10) Fearnhead, R. W.: *Nature*, 188, 509 (1960)
- (11) Millard, A. y Pautard, F. G. E.: *Proc. 4th Intern. Conf. Elect. Microsc.*, Springer, Berlin (1960)
- (12) Höhling, H. J.: *Dent. Zahnärztl.*, 16, 694 (1961)