

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**MINERALIZACIÓN DEL ESMALTE EN LA FLUOROSIS  
DENTARIA. ESTUDIO MICROSCÓPICO Y  
MICROANALÍTICO**

***TESIS DOCTORAL***

**INMACULADA CABELLO MALAGÓN**

**2008**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Inmaculada Cabello Malagón  
D.L.: GR. 472-2009  
ISBN: 978-84-691-9296-2

**MINERALIZACIÓN DEL ESMALTE EN LA FLUOROSIS DENTARIA. ESTUDIO  
MICROSCÓPICO Y MICROANALÍTICO**

**Memoria que presenta la Licenciada en Odontología**

**Inmaculada Cabello Malagón**

**para aspirar al título de Doctor**



**Fdo: Inmaculada Cabello Malagón**

**VºBº El Director de Tesis**



**Fdo: María del Carmen Sánchez Quevedo**

**Doctora en Ciencias Químicas**

**Universidad de Granada**

**VºBº El Director de Tesis**



**Fdo: María Elsa Gómez de Ferraris**

**Doctora en Odontología**

**Universidad de Córdoba (Argentina)**

**VºBº El Director de Tesis**



**Fdo: Miguel Alaminos Mingorance**

**Doctor en Medicina y Cirugía**

**Doctor en Ciencias Biológicas**

**Universidad de Granada**

**Departamento de Histología**

**Universidad de Granada**

**2008**

**DEDICATORIA**

***A mi familia y a Dani***

## **AGRADECIMIENTOS**

A María del Carmen Sánchez Quevedo, por su inestimable ayuda y dedicación para llevar a cabo la presente tesis doctoral, además de por su excelente humor, que siempre hace más llevadera cualquier tarea del laboratorio.

A María Elsa Gómez de Ferraris, que con su gran aporte científico ha contribuido en gran medida a la resolución de gran parte de las dudas que, lógicamente, surgen durante la realización del trabajo, y también por su labor crítica.

A Miguel Alaminos Mingorance, por el esfuerzo, dedicación constante, sus consejos y su inestimable calidad humana. Gracias a su ayuda, he podido realizar gran parte del trabajo, y a través de su sencillez y conocimiento me he “contagiado” de su entusiasmo por la ciencia.

A Antonio Campos Muñoz, gracias por su ayuda y cercanía, su confianza y amabilidad, siempre pendiente de facilitar cualquier medio o recurso que estuviese en su mano, y prestando una especial atención al proceso de realización del trabajo hasta llegar a su consecución.

A Ingrid Johanna Garzón Bello, por su amistad, siempre apoyándome en los malos momentos y disfrutando conmigo de los buenos. Porque también gracias a ella he aprendido mucho acerca del trabajo en el laboratorio.

A Amparo Montalvo Valdivieso, por contribuir también con su alegría y ganas de trabajar a que el laboratorio sea un lugar tan agradable.

A Pascual Vicente Crespo Ferrer, quien me ha ayudado como uno de los coordinadores del programa de doctorado, y en la medida de lo posible, a resolver mis dudas y agilizar los trámites de algunos documentos necesarios para cursar dicho programa y para la presentación del presente trabajo.

A mi familia, en especial a mis padres, porque si a mis profesores les debo su aporte académico, a ellos les debo su apoyo moral, siempre empujándome en los momentos más difíciles. Sin ellos sí que es verdad que este trabajo no se habría llevado a cabo.

A Dani, que con su cariño, y apoyo me ha dado fuerzas en todo momento para seguir hacia adelante en este trabajo y en el día a día.

A todos los miembros del Departamento de Histología, por brindarme su colaboración y apoyo.

La realización de esta tesis doctoral ha sido posible gracias a la colaboración existente entre el grupo de Ingeniería Tisular de la Facultad de Medicina y Odontología con la Universidad Nacional de Córdoba (Argentina) y la Universidad Central de Venezuela (Caracas). En este sentido, quiero agradecer a la Profesora Titular Dña. Fátima Rojas Sánchez, de la Universidad Central de Venezuela, su inestimable ayuda al proporcionarnos las muestras procedentes de zonas endémicas de Venezuela.

Mi más profundo agradecimiento.

# INDICE

INTRODUCCIÓN .....	1
OBJETIVOS.....	15
MATERIAL Y MÉTODOS.....	17
1. MATERIAL .....	18
2. METODOLOGÍA .....	19
2.1. Recogida de muestras	
2.2. Método de estudio con Microscopía Óptica.	
2.3. Método de estudio con Microscopía Electrónica de Barrido.	
2.4. Método de estudio con Microscopía Electrónica Analítica Cuantitativa por Energía Dispersiva de Rayos-X	
2.5. Análisis estadístico	
RESULTADOS.....	31
1. Resultados morfológicos.	
2. Resultados histológicos con microscopía óptica y técnica de degaste	
3. Resultados histológicos con microscopía electrónica de barrido con electrones secundarios y electrones retrodispersos	
4. Resultados con microscopía electrónica analítica cuantitativa por energía dispersiva de rayos X	
DISCUSIÓN .....	100
CONCLUSIONES .....	112
BIBLIOGRAFÍA .....	115

## **INTRODUCCIÓN**

La fluorosis dental, clásicamente se ha definido como una malformación dentaria originada por la ingesta aguda o crónica de aguas fluoradas a altas concentraciones, si bien existen otros factores como la aplicación de productos fluorados tópicos, bebidas gaseosas, dentífricos y factores genéticos, que pueden originar, también, dicha alteración (Osuji y cols., 1988; Ng'ang'a y cols., 1992; Mascarenhas, 2000; Everett, 2002).

El flúor, ejerce su acción, preferentemente, durante el desarrollo dentario, y afecta tanto al proceso de amelogénesis (formación del esmalte) concretamente a la actividad secretora y maduración de los ameloblastos, como al proceso de dentinogénesis (formación de dentina) alterando, en este caso, la expresión de las proteínas de la matriz dentinaria.

(Fejerskov y cols., 1975, 1979; Thylstrup y Fejerskov, 1979; Shinoda, 1983; Fejerskov y cols., 1983; Suckling y Thurley, 1984; Richards y cols., 1986; Suckling y cols., 1988; Murray y cols., 1991; Milhaud y cols., 1992; Den Besten, 1994; Milan y cols., 2001; Maciejewska y cols., 2006).

Si bien el flúor es considerado beneficioso para la salud dental, ya que actúa como agente remineralizador y por tanto como agente preventivo de la caries dental, estudios recientes han indicado que la fluorosis dental ha ido incrementándose, alcanzando un rango de prevalencia que varía entre el 7,7 y 80,9% en áreas con aguas fluoradas y entre el 2,9 al 42% en zonas sin fluoración del agua (Clark, 1994; Mascarenhas, 2000; Pendrys, 2000),

afectando preferentemente a premolares, incisivos, primer y segundo molar (Ainsworth,1933; Tratman,1940; Forrest, 1956; Moller,1965; Lathan y Grech, 1967; Moller y cols.,1970; Aasenden y Peebles, 1974,1978; Poulsen y Moller, 1974;Thylstrup y Fejerskov,1978; Larsen y cols.,1985 a, b, 1986; Manji y cols.,1986 a, b).

En este sentido, podemos afirmar que la fluorosis dental es un problema endémico de salud pública que afecta a la población infantil y adolescente de varias zonas del mundo (Thylstrup,1978; McInnes y cols., 1982; Burger y cols., 1987; Mann y cols., 1990; Opinya y cols., 1991; Ng'ang'a y cols., 1993; Lewis y Chikte,1995; Milsom y cols., 1996)

Las primeras descripciones de piezas dentarias afectadas con fluorosis dental fueron descritas por Black y McKay, en 1916. Dean en 1934, clasificó la fluorosis en función de sus características macroscópicas, y establece el índice de Dean que relaciona el grado de afectación de la misma con el nivel de exposición al flúor. Thylstrup y Fejerskov, en 1978, mediante microscopía óptica, realizaron una nueva clasificación relacionando el aspecto clínico de la fluorosis con los cambios microestructurales o histológicos del esmalte.

Macroscópicamente, las características del esmalte fluorótico se manifiestan por presentar color marrón, a veces opaco, quebradizo, poroso y sin brillo. También se observa la presencia alterna de bandas horizontales

oscuras y marcadamente opacas, así como pérdida total o parcial de crestas y altura del esmalte (Dean,1934; Roholm,1937; Kierdorf y cols., 1993)

Mediante técnicas de microrradiografía se distinguen distintas zonas o áreas en el espesor del esmalte de dientes fluoróticos: capa más externa con un alto contenido mineral, capa hipomineralizada, ubicada por debajo de la anterior, de longitud variable y capa más interna, próxima a la unión amelo-dentinaria, de menor mineralización en relación con la más superficial. Así mismo se observa, también, la presencia de estrías de Retzius (Fejerskov y cols., 1975; Fejerskov,1977; Thylstrup y Fejerskov,1979; Kierdorf y cols.,1993; Aoba y Fejerskov, 2002).

Con microscopía electrónica de barrido se observan así mismo poros y fracturas en la superficie del esmalte, esmalte aprismático en las regiones próximas a la capa hipomineralizada, bandas de Hunter-Schereger. Se aprecian tanto, estrías de Retzius muy acentuadas como prismas alterados en la capa más externa del esmalte (Fejerskov, 1977; Thylstrup y Fejerskov, 1979; Kierdorf,1997).

Los estudios realizados con microscopía electrónica de transmisión, evidencian diferencias en la morfología cristalina. Se observan cristales de tamaño grande y pequeño en la zona hipermineralizada del esmalte (zona más externa), mientras que en la zona hipomineralizada los cristales son más

pequeños que los observados en la zona hipermineralizada. También se aprecian perforaciones en la región central del cristal y defectos en la superficie del mismo.

Los estudios realizados a nivel dentinario, ponen de manifiesto la existencia de áreas de dentina interglobular, presencia de marcadas líneas incrementales y aumento de la luz de los túbulos dentinarios próximos a la unión dentino-pulpar (Kierdorf y cols., 1993; Vieira y cols., 1994, 2006; Rojas-Sánchez y cols., 2007).

Por otra parte, como se ha indicado con anterioridad, la existencia de distintas zonas hiper o hipomineralizadas en el esmalte, se ha observado mediante técnicas microscópicas, pero sin que se haya determinado la influencia de un modo significativo del flúor sobre la mineralización dentaria.

Debido a la importancia que tiene la clínica odontológica restauradora, específicamente en lo referido a los sistemas adhesivos de los materiales dentales en los dientes afectados con fluorosis, es imprescindible tener un mayor conocimiento estructural y químico del esmalte y dentina (Gómez de Ferraris y Campos, 2000). Lyaruu y cols., en 1990, mediante la combinación de la microscopía electrónica de transmisión y microscopía electrónica analítica, realizó estudios semicuantitativos del contenido mineral en el esmalte fluorótico a fin de confirmar el incremento de la densidad electrónica observada mediante técnicas de microrradiografía. Posteriormente, Vieira y cols., 2005 determinó,

también mediante métodos semicuantitativos, la influencia del flúor sobre la mineralización dentaria.

El desarrollo de la microscopía electrónica de barrido y su aplicación a los tejidos duros desde el final de la década de los sesenta ha convertido, en efecto, a dicho instrumento en palabras de Dempster (1979), en una de las herramientas más útiles para el estudio de los procesos de mineralización.

La utilización de la microscopía electrónica de barrido con electrones retrodispersos, resulta ser de gran utilidad a la hora de estudiar el patrón de mineralización de los tejidos mineralizados, ya que provee imágenes con diferentes escalas de grises, de manera que las regiones más densas se corresponden con áreas poco mineralizadas y por el contrario las áreas menos densas se relacionan con zonas más mineralizadas. Aunque esta técnica es de gran utilidad para determinar la mineralización, la asociación de la microscopía electrónica de barrido (mediante el uso de electrones retrodispersos) junto con las técnicas de microscopía electrónica analítica cuantitativa, constituyen un método más exacto para determinar la composición mineral existente en los tejidos mineralizados (Crespo y cols., 1987; Sánchez-Quevedo y cols., 1988, 2001 a-c, 2004, 2005; Fernández-Segura y cols., 1988, 1997; Crespo y cols., 1993, 1996; Campos y cols., 2000; Rojas-Sánchez y cols., 2007).

Como es sabido, cuando un haz de electrones incide sobre una muestra e interactúa con ella, se producen diversas interacciones entre los electrones del haz y los átomos de la muestra que nos dan información acerca de la composición elemental de la misma. Como resultado de dichas interacciones, se originan los electrones secundarios, los electrones retrodispersos, X-ray, etc. (Fig. 1).

En relación con los electrones retrodispersos, estos se originan cuando un electrón del haz choca frontalmente con el núcleo de un átomo de la muestra, siendo repelido en sentido contrario, fuera de la muestra. La intensidad de dicho efecto varía proporcionalmente con el número atómico, de modo que los elementos químicos de la muestra con un alto número atómico producirán más electrones retrodispersos que los que tienen un número atómico más bajo. De esta manera, los electrones retrodispersos proporcionan imágenes basadas en el contraste que se origina por diferencias en la composición del número atómico. De este modo, esta técnica ha sido utilizada para proporcionar información de distintos tipos de muestras, en las que pequeños detalles, a diferencia de la información que proporciona los electrones secundarios, pueden ser diferenciados o discernidos mediante los electrones retrodispersos (Warley, 1997).

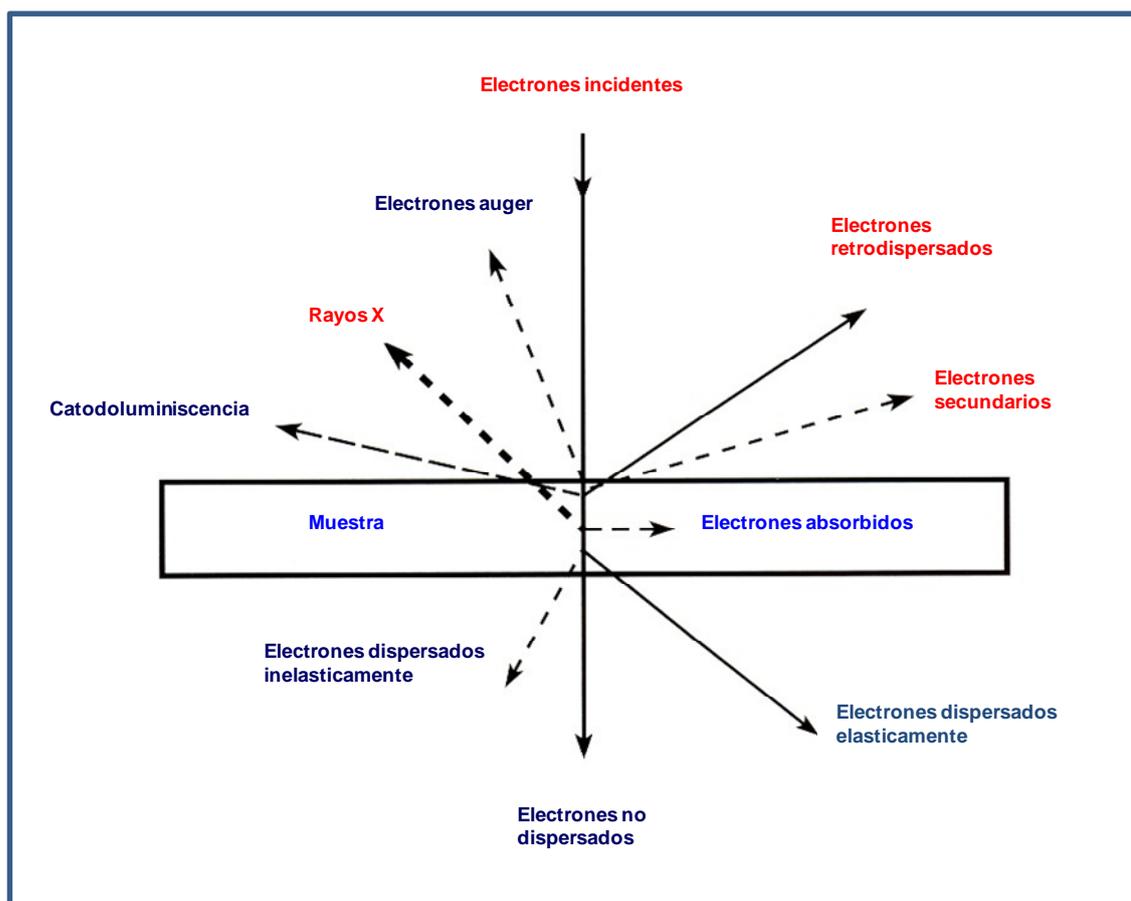


Fig.1

Aunque las técnicas microanalíticas surgen con Castaing en 1951, en relación con el análisis químico cristalográfico, es a partir del último tercio del siglo XX, mediante la aplicación conjunta de la microscopía electrónica y los sistemas de detección de rayos X, cuando se define a la microscopía electrónica analítica, como una técnica “no destructiva” que, utilizando como fuente un haz de electrones, permite analizar “in situ” la composición química de las muestras de forma simultánea a su observación (Roomans y cols., 1981; Morgan, 1985; Panessa, 1983; Warley, 1997).

En nuestro grupo de investigación se ha desarrollado en este campo distintas aportaciones metodológicas y descriptivas en diferentes estudios mineralizados (Sánchez-Quevedo y cols., 1987a, b, 1988, 1989, 1992, 1998, 1999, 2001a-c, 2004, 2005, 2006, 2007; Campos y cols., 1987, 1990, 1992, 1993, 1999, 2000; García y cols., 1990; López-Escámez y cols., 1992 a-c, 1993 a-c; López-Escámez y Campos 1994; Crespo y cols., 1985, 1990, 1996; Fernández-Segura y cols., 1997, 1999 a, b; Carranza y cols., 2006; Rojas-Sánchez y cols., 2007; Fernández-Segura y Warley, 2008).

El fundamento físico del proceso tiene su base en la relación directa entre la energía que se necesita para producir un fotón de Rayos X y el número atómico del elemento analizado, según propuso Mosely en 1913. Por lo tanto, la energía de la radiación X es característica para el número atómico del elemento, lo que es utilizado para identificar un elemento químico en la muestra (Morgan, 1985).

Para que se originen los Rayos X característicos es necesario que un haz de electrones incida sobre los átomos de la muestra y colisionen con los electrones que se encuentran alrededor del núcleo. Como consecuencia de ello se produce, entre otros fenómenos, la ionización de los átomos de la misma, es decir, pérdida de los electrones de los orbitales internos, que conlleva la aparición de un “hole” (agujero o espacio vacío), y hace que el átomo sea inestable.

Para alcanzar nuevamente la estabilidad, los electrones situados en una capa más externa, saltan y ocupan dicho espacio o hol. Este salto de electrones de un nivel de energía superior a otro inferior, implica una liberación de energía, igual a la diferencia de  $E$  entre los dos orbitales, que se manifiesta en forma de radiación electromagnética (Rayos-X característicos), la cual depende del número atómico del elemento y de los orbitales implicados, de manera que dicha energía puede ser empleada para identificar los elementos químicos de la muestras (Jenkins y De Vries, 1969) (Fig. 2).

Además de la generación de Rayos X característicos, se originan también los denominados Rayos-X continuos, Radiación continua o Background, como consecuencia de la desaceleración que sufren los electrones del haz primario al interactuar con el núcleo atómico y el cambio de trayectoria de los electrones incidentes al interactuar con el núcleo atómico (Heinrich, 1981) (Fig. 3).

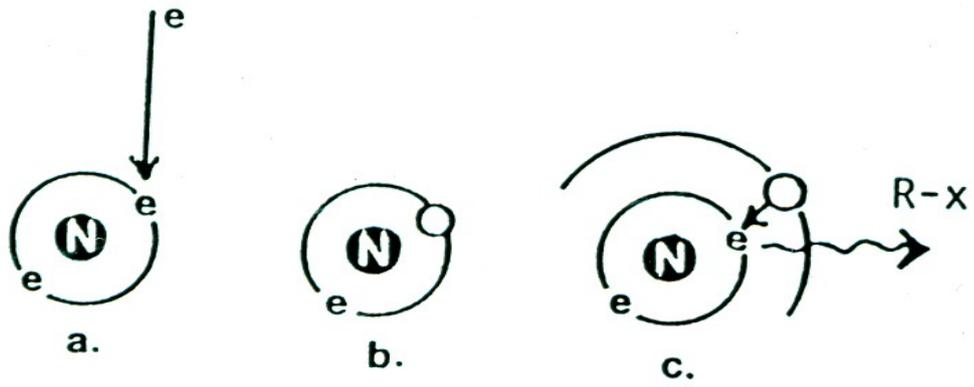


Fig. 2

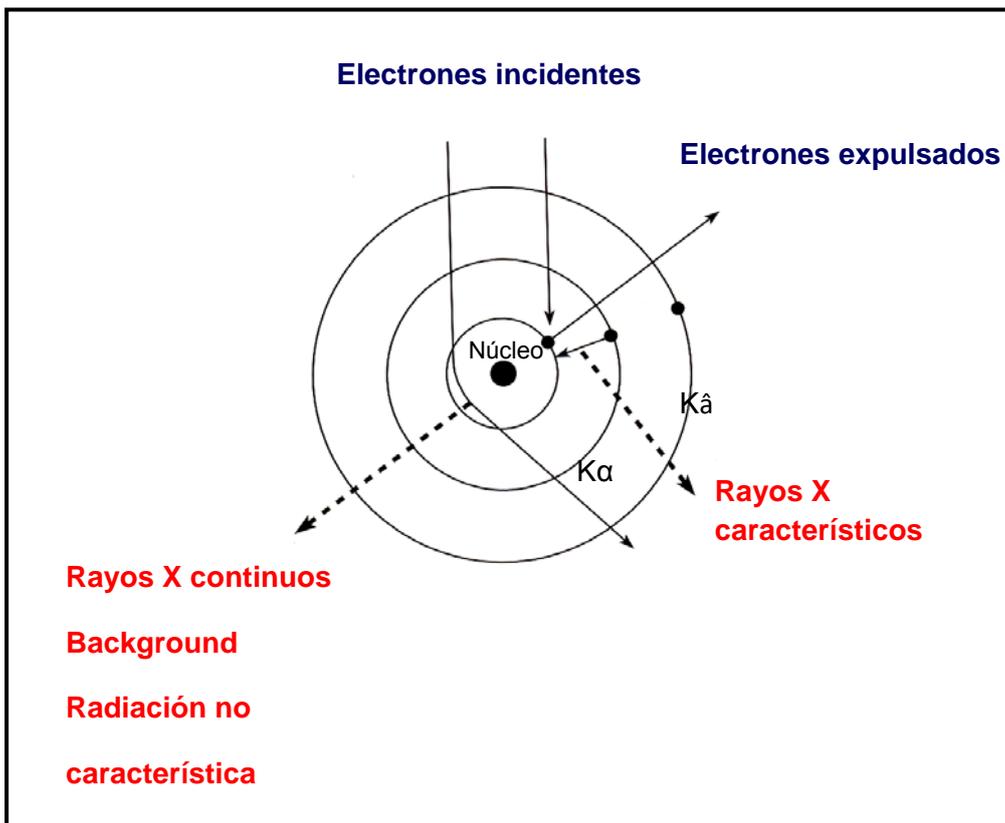


Fig. 3

El análisis de los Rayos X emitidos por la muestra origina un espectro (histograma de frecuencias) constituido por una serie de picos detectados para cada rango de energía, es decir, para cada elemento, de intensidad variable –rayos X característicos-, los cuales están superpuestos a un fondo continuo de menor intensidad (rayos X no característicos, radiación de fondo o background). Estos rayos X no son característicos de ningún elemento y la intensidad de estos fotones se incrementa con el número atómico del material diana y el potencial de aceleración (Kv) (Jenkins y De Vries, 1969).

Dicho espectro nos da, por tanto, una información acerca de la composición química de la muestra de carácter cualitativo. Dicha información es esencial para realizar el estudio cuantitativo de los elementos objeto de estudio, ya que el área que ocupa cada pico en el histograma es proporcional a la concentración del elemento en volumen irradiado por el haz de electrones (Morgan, 1985; Lyman y cols., 1990; Warley y Gupta, 1991; Warley, 1997) (Fig. 4).

Para realizar el estudio cuantitativo, se elaboran estándares de sales inorgánicas para cada uno de los elementos químicos y se aplica la metodología de Hall y la metodología de normalización pico/fondo, desarrollada y adaptada en nuestro Departamento para tejidos mineralizados, incluidas las piezas dentarias (Campos y cols., 1984, 1994,

1999, 2000; López-Escámez y cols., 1992 a-c, 1993 a-c; López-Escámez y Campos, 1994; Sánchez-Quevedo y cols., 1998, 2004-2007).

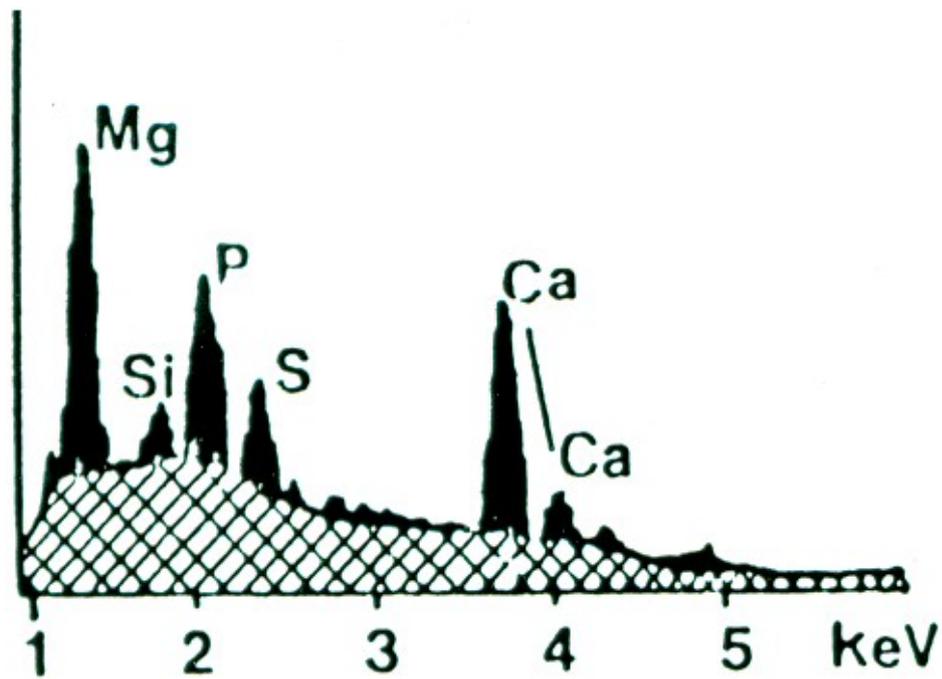


Fig. 4

La posibilidad de aplicar conjuntamente la técnica de microscopía electrónica de barrido con imágenes obtenidas a partir de electrones secundarios y electrones retrodispersos y las técnicas microanalíticas cuantitativas en piezas dentarias afectadas con fluorosis, puede contribuir a sistematizar los patrones de mineralización existentes en dicho proceso.

Por otra parte, la necesidad de aplicar nuevos protocolos terapéuticos de tipo sustitutivo vinculados a la Ingeniería Tisular en pacientes afectados con fluorosis, exige un conocimiento mas profundo de la distribución del componente mineral en el seno de dichas piezas dentarias (López-Escámez y cols., 1993; Sanchez-Quevedo y cols., 1992, 1988, 1998, 2001 a-c; Campos y cols., 2000; Nieto, 2003).

La oportunidad de estudiar piezas afectadas de fluorosis procedentes de zonas endémicas, utilizando la metodología arriba indicada, puede generar nuevos protocolos terapéuticos sustitutivos en patrones de mineralización estructural y químicamente sustentados en datos objetivos determinados tanto macro como microanalíticamente.

**OBJETIVOS**

Los objetivos de la tesis doctoral son, en consecuencia, los siguientes:

1. Establecer los patrones histológicos del esmalte fluorótico en piezas procedentes de zonas endémicas con Microscopía Óptica y Técnicas de Desgaste y Microscopía Electrónica de Barrido con electrones secundarios y retrodispersos.
2. Establecer patrones histoquímicos microanalíticos de mineralización en el esmalte fluorótico en piezas procedentes de zonas endémicas con Microscopía Electrónica Analítica Cuantitativa por energía dispersiva de Rayos-X.
3. Determinar la correlación de los patrones microscópicos y microanalíticos del esmalte fluorótico en piezas dentales procedentes de zonas endémicas, estableciendo los indicadores morfológicos y de mineralización para su posible utilización en protocolos terapéuticos.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

## **1. MATERIAL**

El material utilizado para este trabajo consiste en 10 dientes permanentes pertenecientes a pacientes diagnosticados de fluorosis dental, procedentes de zonas regionales endémicas, como son las localidades aledañas a la ciudad de Río IV (Argentina) y del Estado Portugués de Venezuela, donde la concentración de flúor en el agua de consumo es de 2,45mg/L. Para el grupo control se han utilizado 7 piezas dentarias permanentes, extraídas por indicación odontológica, de la ciudad de Granada (España), donde la concentración del agua de bebida era de 0.07 ppm.(Bravo y cols., 1996)

## **2. METODOLOGÍA**

### **2. 1. RECOGIDA DE MUESTRAS**

Los elementos dentarios fueron lavados con agua bidestilada, para eliminar los restos orgánicos y facilitar su posterior tratamiento.

### **2. 2. MÉTODO DE ESTUDIO CON MICROSCOPIA ÓPTICA**

Las piezas dentarias fueron incluidas en resina epóxica autopolimerizable-PMMA, marca Triples, de la casa Ivoclar, en una proporción 13 g polvo / 10 ml de monómero líquido.

A continuación, las muestras fueron cortadas en sentido vestíbulo-lingual en un microtomo, con disco de diamante a 700 revoluciones, marca Struers Accutrom-5, de Dinamarca, realizando cortes de 140 micras de espesor. Posteriormente, las láminas dentarias obtenidas, fueron pulidas con discos, de diferente granulometría, hasta obtener espesores de 50 micras. Las muestras así obtenidas se montaron en portaobjetos a fin de realizar el estudio con microscopía óptica.

Dicho estudio se realizó en un microscopio Letzt Wetzlar Germany provisto de una digitalizadora de imágenes software Leica 100.

### **2.3. MÉTODO DE ESTUDIO CON MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO**

Con independencia de las muestras utilizadas para microscopía óptica, otras láminas se utilizaron para microscopía electrónica de barrido, según la siguiente pauta metodológica:

#### **2.3.1. Fijación**

Se realiza la técnica de criofijación o criopreservación de las muestras, utilizando para ello el método de enfriamiento de los especímenes en líquidos criogénicos, mediante nitrógeno líquido.

#### **2.3.2. Congelación y desecación**

Una vez criofijadas las muestras, se procede a su congelación y desecación mediante la técnica de freeze-drying en vacío a baja temperatura. El instrumento de congelación-desecación es un sistema de criodesecación Emitech K775 (Fig.6), que se emplea con el objeto de extraer el agua de las muestras por sublimación desde la fase sólida. Dicho proceso se inicia a una temperatura de  $-100^{\circ}\text{C}$  y va aumentando progresivamente a lo largo de 24 horas hasta alcanzar a los  $25^{\circ}\text{C}$ . Las muestras permanecieron en la cámara del aparato de criodesecación hasta recuperar lentamente la temperatura ambiental para evitar la condensación del vapor de agua atmosférico sobre su superficie.



Fig. 6

### **2.3.3. Montaje**

Las muestras criofijadas y desecadas se montan en portamuestras de grafito.

### **2.3.4. Recubrimiento**

A continuación se procede al recubrimiento de las muestras, ya montadas, para asegurar la conductividad eléctrica que facilite el barrido del haz de electrones durante su observación microscópica. El recubrimiento de las muestras se realiza con oro durante 30 segundos, en una unidad de recubrimiento sputtering POLARON E 5000 empleándose argón ( $P=0.1$  Torr) (Fig. 7) (Sánchez Quevedo y cols., 1998).



Fig. 7

### **2.3.5. Observación**

El análisis microscópico y microanalítico de las muestras se realizó en un microscopio electrónico de barrido PHILIPS XL-30 (Fig.8) y FEI QUANTA 2000 provistos de un detector de electrones secundarios y retrodispersos

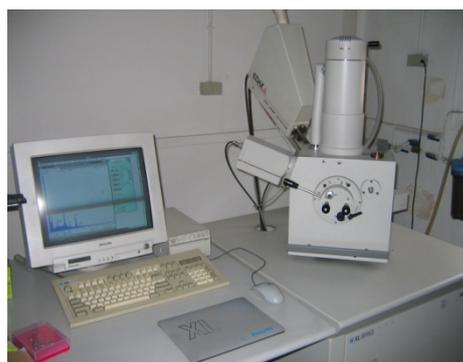


Fig.8

### **2.3.6. Técnica de Grabado Ácido**

Con posterioridad a cinco de las muestras procesadas, según la metodología anteriormente descrita, se les aplicó la técnica del grabado ácido con ácido fosfórico al 35% durante 30 segundos. A continuación, los especímenes se lavaron con agua bidestilada y se secaron al aire durante 1 hora. Tras el montaje de los mismos se recubrieron con oro, utilizando para ello una unidad de recubrimiento sputtering POLARON E 5000 y fueron visualizadas en un microscopio electrónico de barrido Philips XL-30 y en el microscopio electrónico ambiental FEI Quanta 200 provistos, ambos, de un detector de electrones secundarios y retrodispersos.

## **2.4. MÉTODO DE ESTUDIO CON MICROSCOPIA ELECTRÓNICA ANALÍTICA CUANTITATIVA POR ENERGÍA DISPERSIVA DE RAYOS-X**

Para el estudio con microscopía electrónica analítica cuantitativa, las muestras dentarias fueron procesadas siguiendo la siguiente pauta metodológica:

### **2.4.1. Fijación**

Se realiza la criofijación o criopreservación de las muestras utilizando para ello el método de enfriamiento de los especímenes en líquidos criogénicos, mediante nitrógeno líquido.

### **2.4.2. Congelación y desecación**

Una vez criofijadas las muestras, se procede a su congelación y desecación mediante la técnica de freeze-drying en vacío a baja temperatura. El instrumento de congelación-desecación es un sistema de criodesecación Emitech K775 (Fig. 6), que se emplea con el objeto de extraer el agua de las muestras por sublimación desde la fase sólida. Dicho proceso se inicia a una temperatura de  $-100^{\circ}\text{C}$  y va aumentando progresivamente a lo largo de 24 horas hasta alcanzar a los  $25^{\circ}\text{C}$ . Las muestras permanecieron en la cámara del aparato de criodesecación hasta recuperar lentamente la temperatura ambiental para evitar la condensación del vapor de agua atmosférico sobre su superficie.



Fig. 6

### **2.4.3. Montaje**

Las muestras criofijadas y desecadas se montan en portamuestras de grafito.

#### **2.4.4. Recubrimiento**

A continuación se procede al recubrimiento de las muestras, ya montadas, para asegurar la conductividad eléctrica que facilite el barrido del haz de electrones durante su observación microscópica y detección analítica. El recubrimiento de las muestras se realiza con carbón durante 30 segundos, según las pautas establecidas para su estudio microanalítico (Panessa, 1983), en una unidad de recubrimiento sputtering Emitech K775 empleándose argón ( $P=0.1$  Torr) (Sánchez Quevedo y cols., 1998).

#### **2.4.5. Observación**

El análisis microscópico y microanalítico de las muestras se realizó en un microscopio electrónico de barrido PHILIPS XL-30 provisto de un detector de energía dispersiva de rayos X (EDAX DX4) (Fig 8).

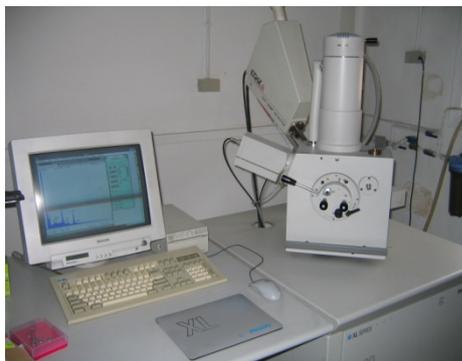


Fig.8

**a) Análisis microanalítico cualitativo**

Las constantes utilizadas para realizar el estudio microanalítico fueron las siguientes:

**Constantes del microscopio:**

- Voltaje 15 kV
- Aumentos 40.000
- Ángulo de superficie 35°
- Ángulo de percepción 52°
- Número de cuentas 1200 cps

***Constantes del detector:***

- Tiempo de acumulación de cuentas 50 segundos

Con las constantes indicadas se obtienen una serie de espectros de carácter cualitativo para cada una de las muestras estudiadas. En dichos espectros se seleccionan los niveles de calcio y fósforo en sus orbitales  $k_{\alpha}$ ,

contabilizándose las cuentas por segundo (CPS), el background (BKGD), fondo o radiaciones no características y el índice pico/fondo (P/B) (Fig. 9).

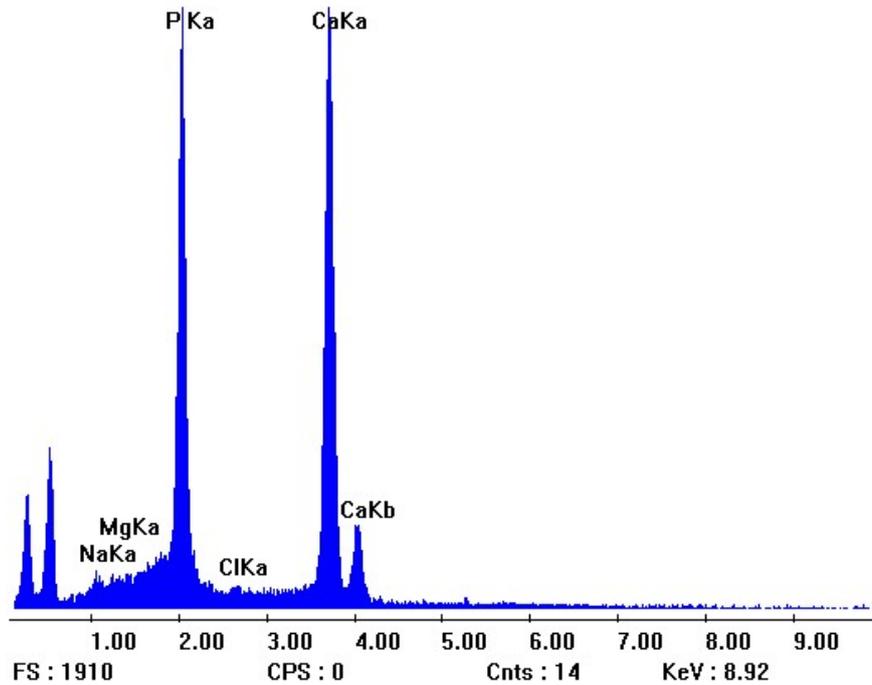


Fig. 9

El estudio microanalítico del calcio y el fósforo, en los dientes diagnosticados con fluorosis, se realizó analizando tres zonas en el esmalte:

- Zona LF: Lesión fluorótica del esmalte
- Zona ZI: Zona de esmalte más próxima a la dentina
- Zona ZE: Zona de esmalte más próxima a la superficie externa

El número de análisis realizados se llevó a cabo en 7 muestras, las cuales reunieron los requisitos idóneos para su estudio microanalítico, contabilizándose un total de 70 mediciones. El número de mediciones en las muestras control fueron, asimismo, 70.

**b) Análisis microanalítico cuantitativo**

Para el estudio cuantitativo, se utilizaron sales estándar de Ca y P las cuales siguieron las mismas pautas metodológicas (Campos y cols,1992, 1994, 2000; López-Escámez y cols.,1992-1994,1998; Sánchez Quevedo y cols., 1997, 1998, 2000, 2001 a-c, 2004-2007). Las sales utilizadas fueron las siguientes:

<b>CALCIO</b>	<b>FÓSFORO</b>
$C_{12}H_{21}O_{12} \cdot \frac{1}{2}Ca$	$K_2HPO_4$
$C_6H_{11}O_7 \cdot \frac{1}{2}Ca$	$CaHPO_4 \cdot 2H_2O$
$Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$	$Ca_3(PO_4)_2$
$Ca(H_2PO_4)_2$	$CaHPO_4$
$CaSO_4 \cdot 2H_2O$	$Ca_2P_2O_7$
$CaHPO_4 \cdot 2H_2O$	$Na_3P_3O_9$
$CaHPO_4$	
$Ca_2P_2O_7$	

Para la cuantificación de los elementos citados anteriormente (Ca y P) en fracción de peso utilizamos el método modificado de Hall,1973 y el método pico/fondo (P/B), propuesto por Statham y Pawley, 1978 y Small y cols., 1979. Dicho método ha sido revisado recientemente por Warley 1997.

Este método tiene en cuenta el background o radiación no característica en el mismo rango de energía que el pico característico, y asume que la absorción de energía generada es la misma para la radiación característica y continua en el volumen irradiado.

Las ventajas de este método son, en primer lugar, que es independiente de las variaciones en la intensidad de la corriente del haz y de los efectos en la superficie del espécimen y, en segundo lugar, que es aplicable al análisis cuantitativo de superficies rugosas en microscopía electrónica de barrido (Boekestein y cols., 1984; Armstrong, 1991; Warley 1997).

La concentración del elemento (x) en la muestra ( $C_{x\ sp}$ ) fue calculada mediante la siguiente fórmula de acuerdo con las pautas establecidas al respecto (Warley y Gupta, 1991; Campos y cols., 1992; López-Escámez y cols., 1993 a-c; Warley 1993; López-Escámez y Campos, 1994; Warley,1997; Campos y cols., 2000; Sánchez Quevedo y cols., 1998, 2000, 2001 a,b, 2004, 2007).

$$C_{x\ sp} = \frac{(P/B)_{x\ sp} \cdot \overline{Z^2 / A}_{sp}}{(P/B)_{x\ std} \cdot \overline{Z^2 / A}_{sp}} \cdot C_{x\ std}$$

$C_x$  = concentración del elemento en fracción de peso.

$(P/B)_x$  = razón pico/fondo para cada elemento.

$sp$  = espécimen.

$std$  = sal estándar.

$Z^2 / A$  = valor medio del cuadrado del número atómico dividido por el peso atómico de la muestra.

## 2.5. Análisis estadístico

Para la comparación de concentraciones medias de calcio y fósforo entre los distintos grupos de estudio (dientes control, lesión fluorótica, zona externa y zona interna de dientes fluoróticos), se utilizó el test no paramétrico U de Mann-Whitney, considerándose significativos aquellos valores de significación p menores del 5% ( $p < 0,05$ ). Todos los tests estadísticos se realizaron para dos colas.

## **RESULTADOS**

## **1. RESULTADOS MORFOLÓGICOS**

El aspecto macroscópico de las piezas dentarias afectadas con fluorosis presenta una tonalidad marrón en la que se observan áreas opacas. Se observan, así mismo, pérdidas focales del tejido adamantino superficial. Por otra parte, se aprecian depresiones en la superficie del esmalte.

## **2. RESULTADOS HISTOLÓGICOS CON MICROSCOPIA ÓPTICA Y TÉCNICA DE DESGASTE**

Nuestros resultados con microscopía óptica ponen de relieve la presencia de tres regiones o zonas en el espesor del esmalte: zona externa, zona subsuperficial y zona interna. Así mismo se observan periquimatías y líneas de imbricación de Pickerill en la superficie del esmalte fluorótico. También se observan Estrías de Retzius acentuadas, de disposición regular que parecen delimitar la zona o región subsuperficial (Figs. 10-13). En la zona externa, se aprecian microfisuras del esmalte con la típica morfología de letra V (Fig. 14).

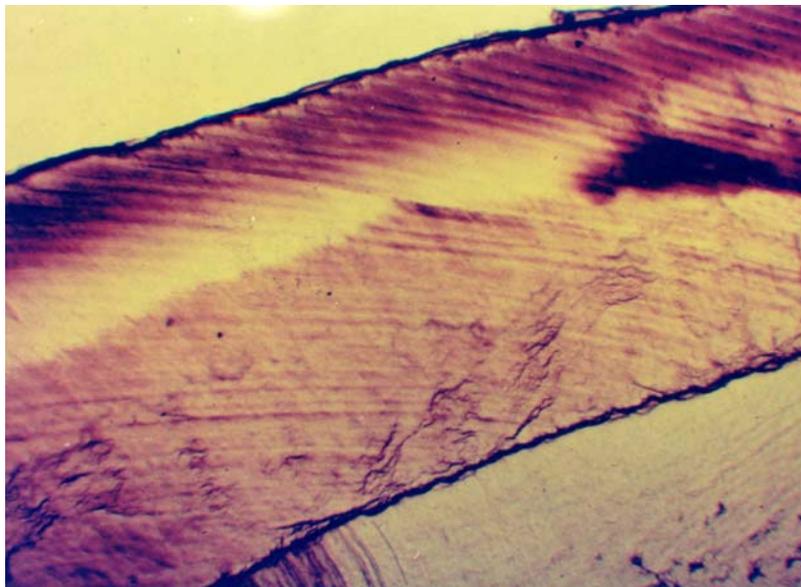


Fig. 10



Fig. 11

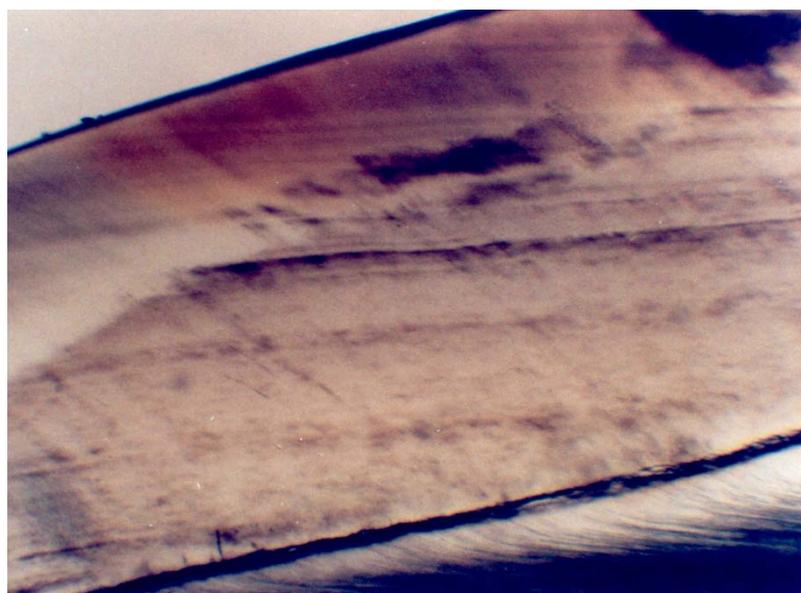


Fig. 12



Fig. 13



Fig. 14

### 3. RESULTADOS HISTOLÓGICOS CON MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO CON ELECTRONES SECUNDARIOS Y ELECTRONES RETRODISPERSOS

Para describir los resultados obtenidos, realizaremos en primer lugar una descripción general y en segundo lugar una descripción específica de las distintas zonas existentes en el esmalte de las piezas fluoróticas.

#### 3.1. DESCRIPCIÓN GENERAL

Nuestros resultados con Microscopía Electrónica de Barrido con electrones secundarios y con electrones retrodispersos nos permiten distinguir en el esmalte fluorótico la existencia de distintas zonas: una superficial o externa de pequeño espesor, una región subsuperficial o intermedia de espesor y longitud variable y una región interna, próxima a la unión amelodentinaria. La región subsuperficial o intermedia ofrece diferentes patrones microscópicos que permiten caracterizar la patología que estamos considerando. Dichos patrones son: patrón en banda, patrón macular y patrón estrellado.

- A. **Patrón en banda.** Se caracteriza por estar formado por una banda densa que se distribuye en general en paralelo a la superficie del esmalte, aunque en ocasiones comienza en la propia superficie y posteriormente se dispone en paralelo (Fig. 15). Dicho patrón ofrece en ocasiones bandas internas (Fig. 16) que a veces se bifurcan en Y (Figs. 17 y 18).

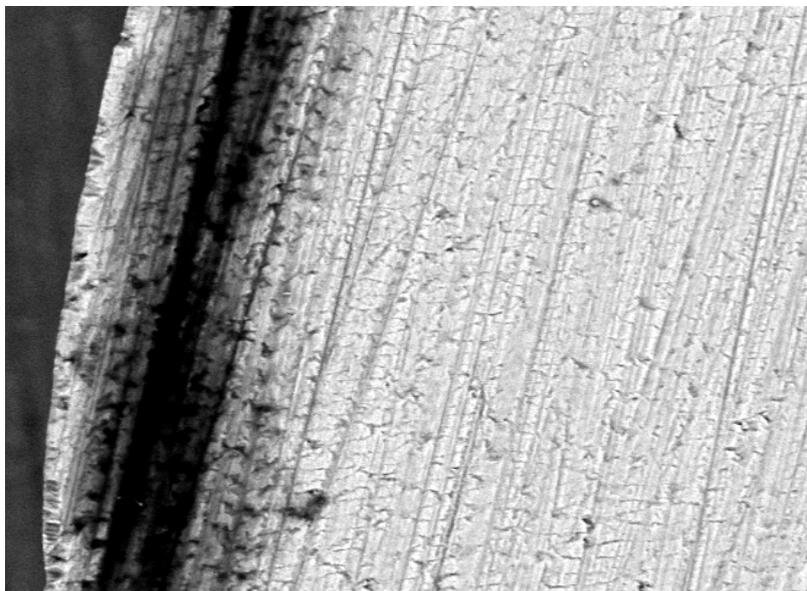


Fig. 15

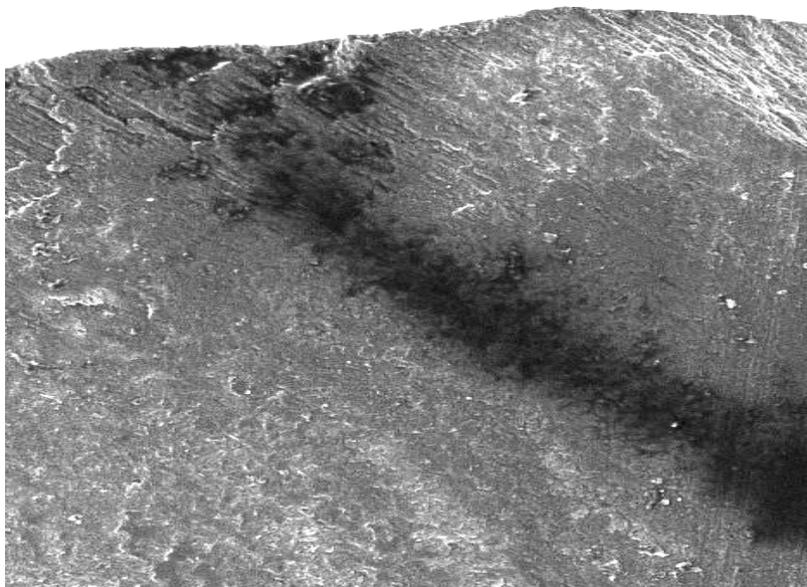


Fig. 16

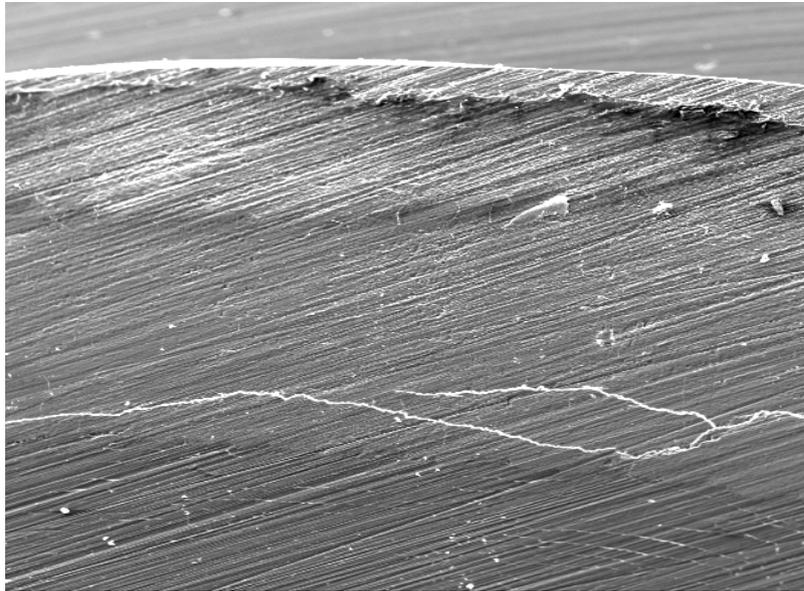


Fig. 17

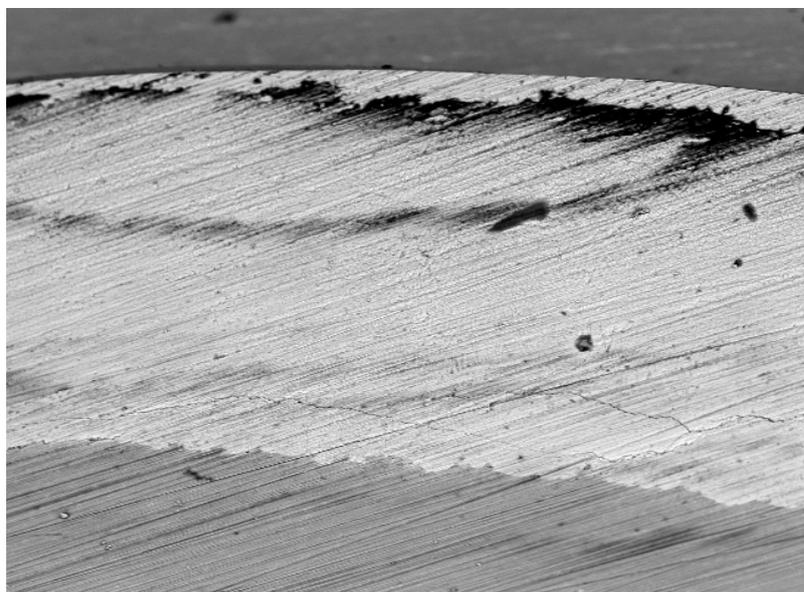


Fig. 18

B. **Patrón macular.** Se caracteriza por áreas irregularmente circulares y ovoideas que se disponen de modo aislado (Figs. 19-21) o en grupos de tamaños variables que se extienden en el espesor del esmalte a distintos niveles de profundidad (Figs. 21 y 22). Los bordes de la áreas maculares son en general de carácter regular.

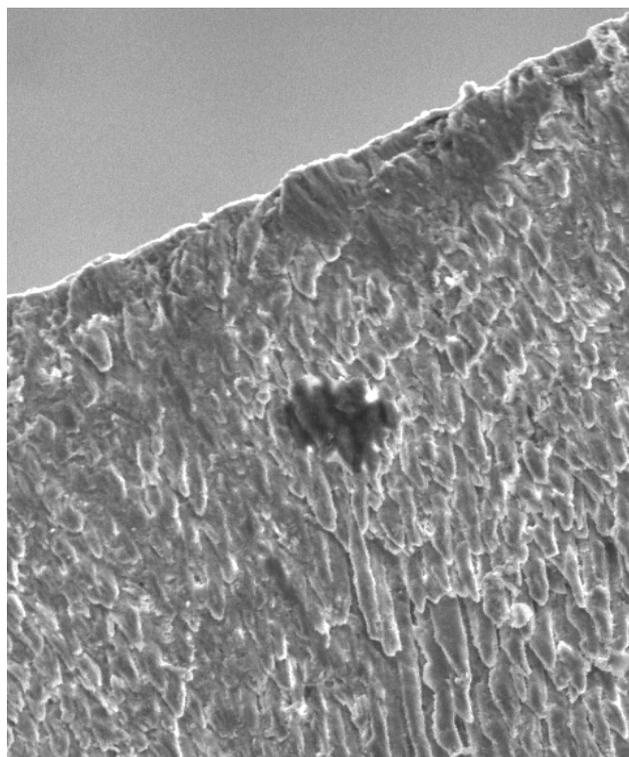


Fig. 19

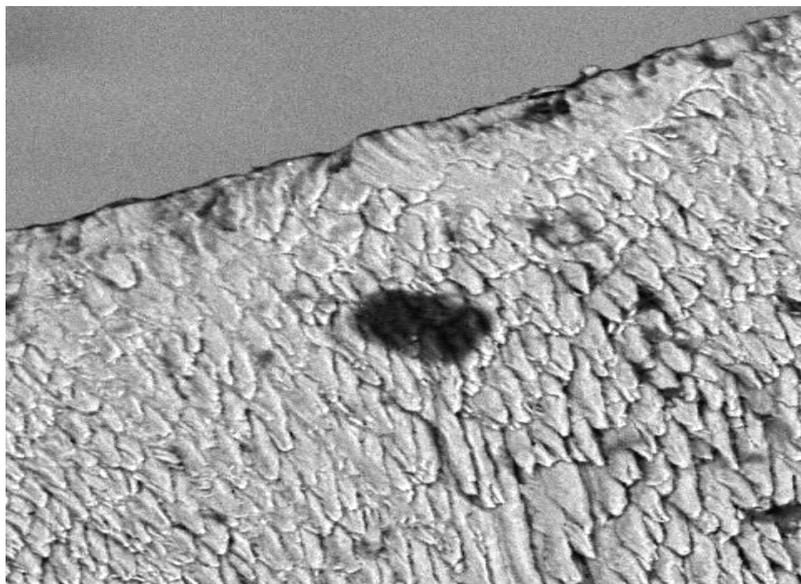


Fig. 20

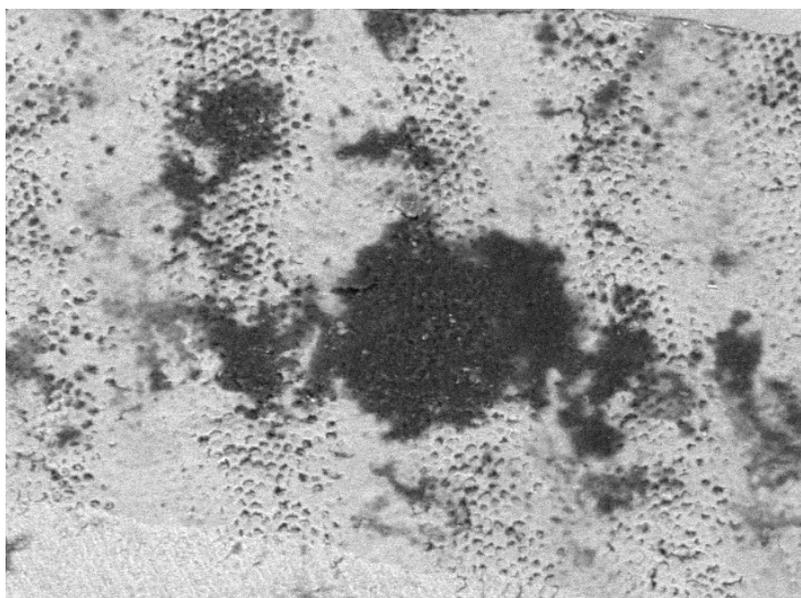


Fig. 21

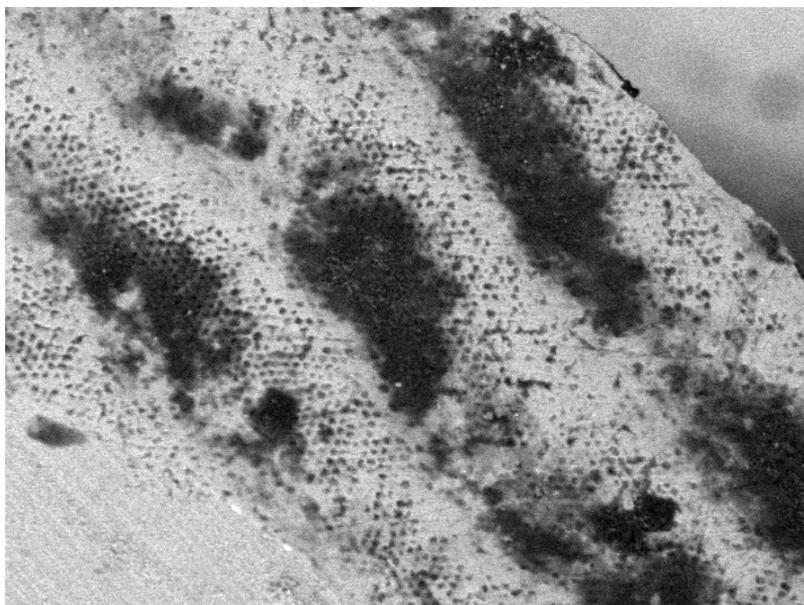


Fig. 22

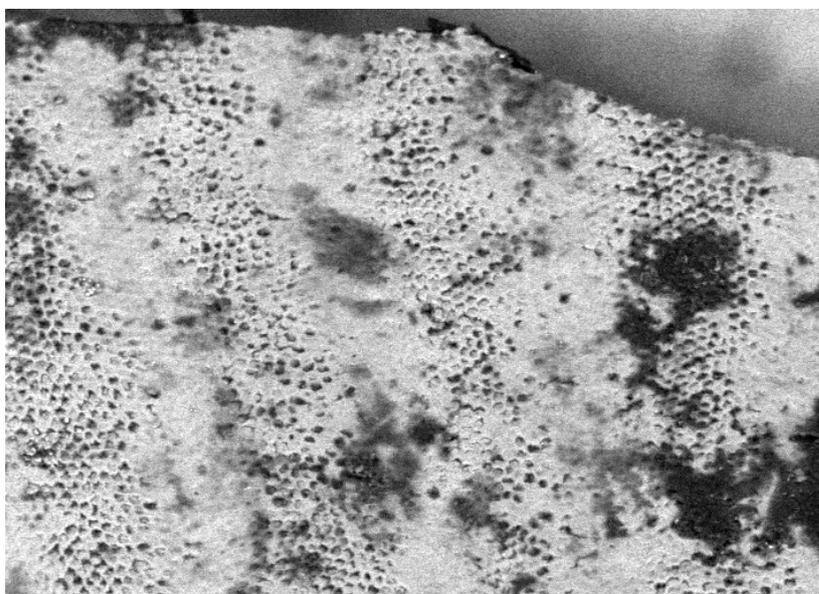


Fig. 23

C. **Patrón estrellado.** Se caracteriza por un área irregular en la que los bordes ofrecen un aspecto estrellado. Dichas áreas pueden existir de forma aislada o en grupos que se distribuyen en el espesor del esmalte. Es un patrón poco frecuente (Fig. 24).

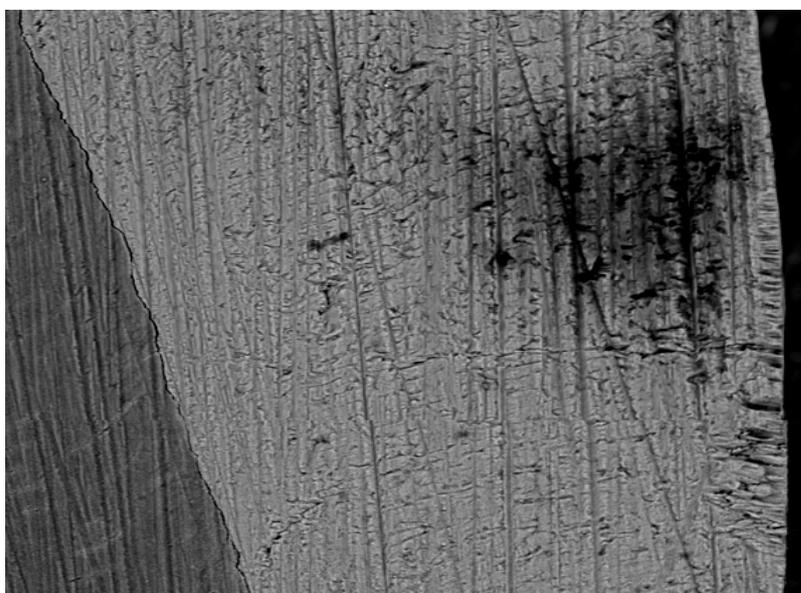


Fig. 24

### **3.2. DESCRIPCIÓN DE LAS ZONAS**

#### **3.2.1. ZONA SUPERFICIAL O EXTERNA**

En la zona superficial o externa se observan tanto con electrones secundarios como con electrones retrodispersos:

- A. **Microfisuras** del esmalte con la típica morfología de letra V (Figs. 25 y 26).

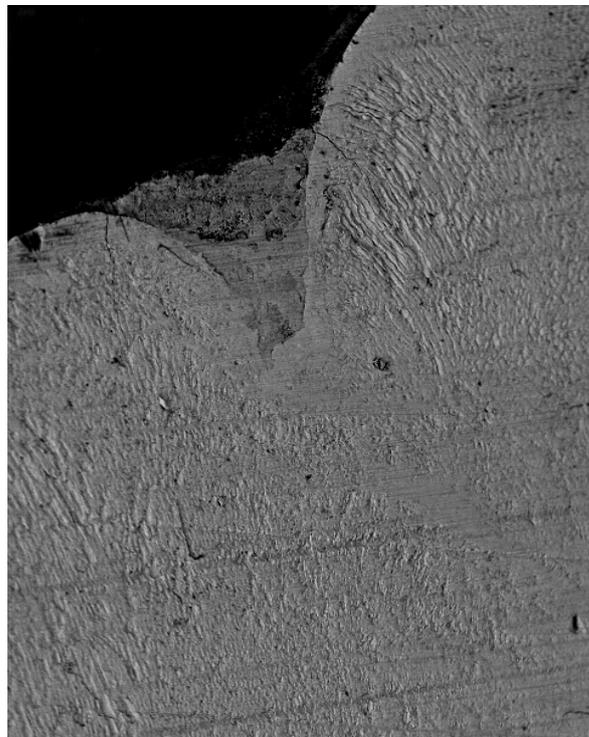


Fig. 25

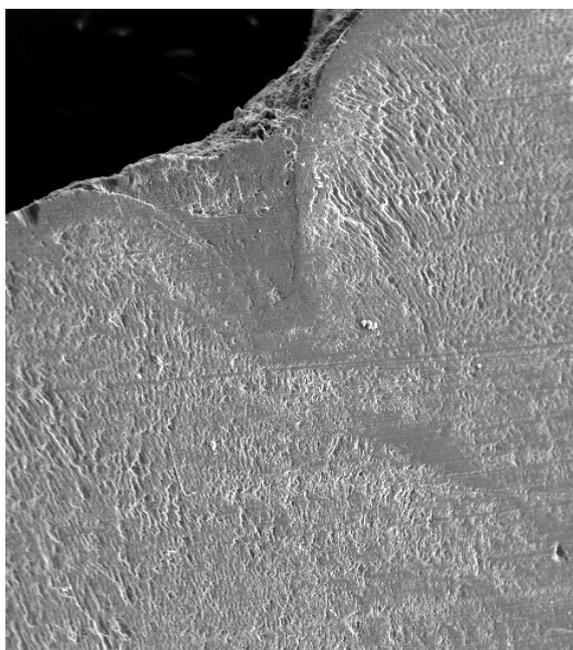


Fig. 26

- B. Presencia de **fisuras o laminillas** del esmalte que se extiende desde la superficie del esmalte hasta el interior del mismo, pudiendo llegar a alcanzar la unión amelodentinaria (Figs. 27-29). Dichas laminillas no cruzan las zonas de la lesión fluorótica.

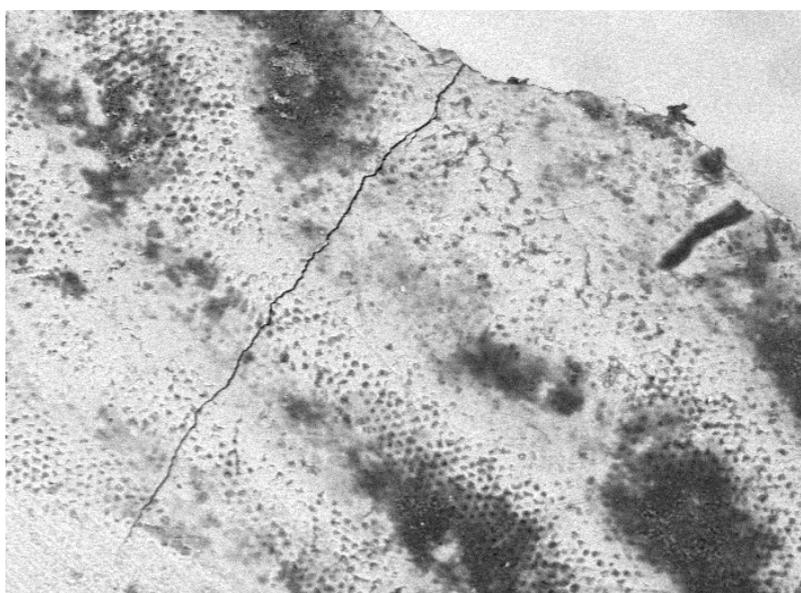


Fig. 27

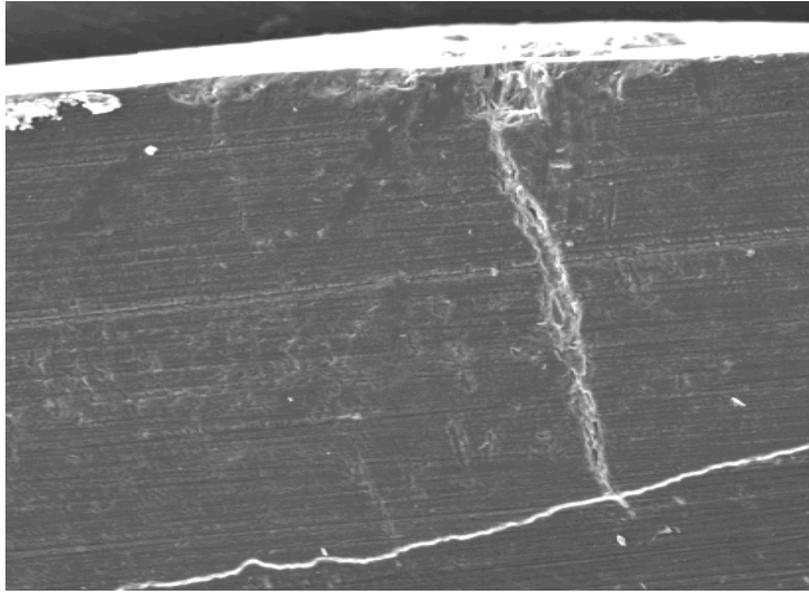


Fig. 28

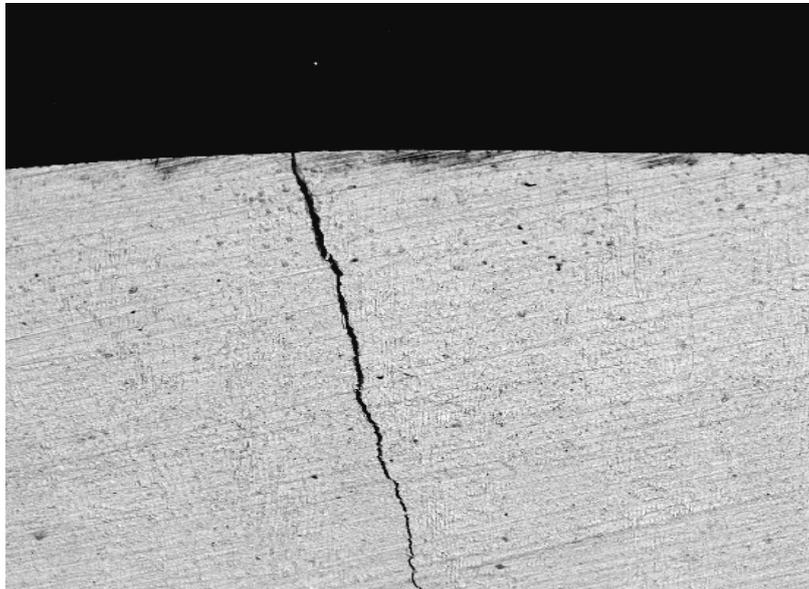


Fig. 29

- C. En dicha zona superficial o externa, es frecuente observar un **esmalte aprismático**, que en algunas regiones alcanza un espesor elevado (Figs. 30-33).

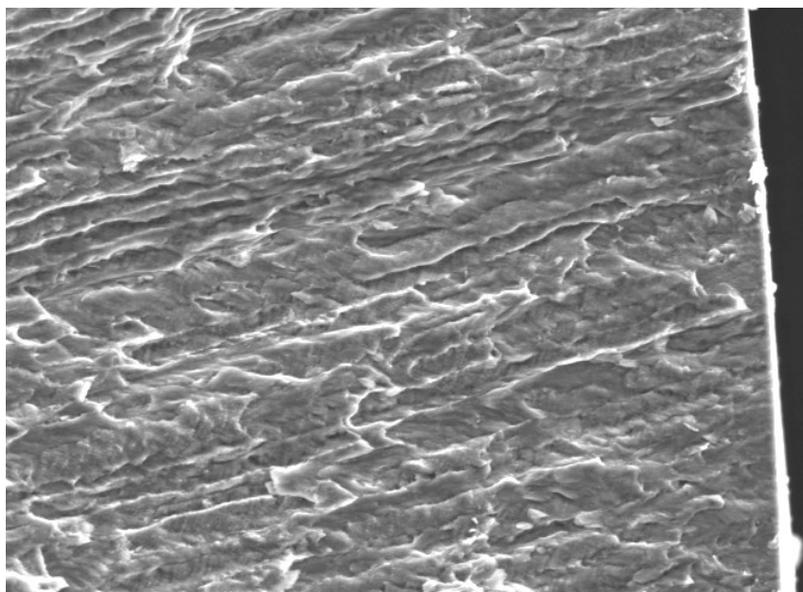


Fig. 30

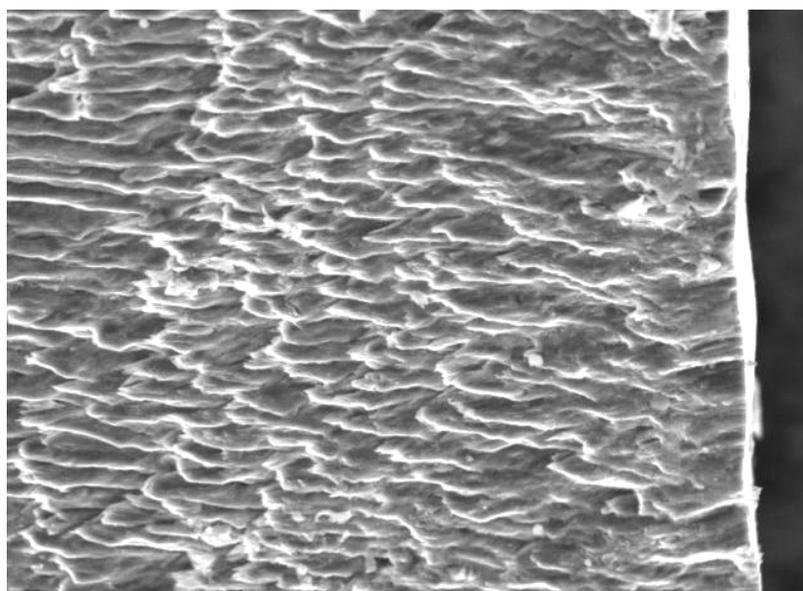


Fig. 31

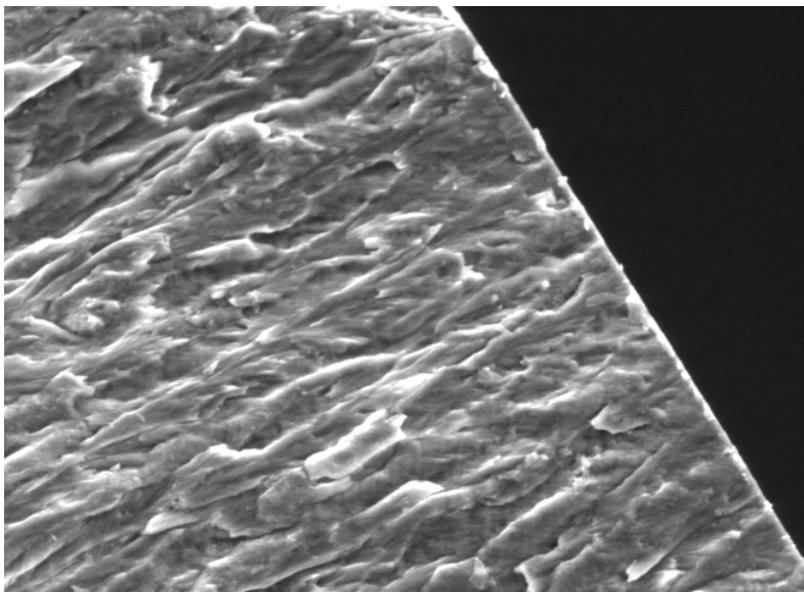


Fig. 32

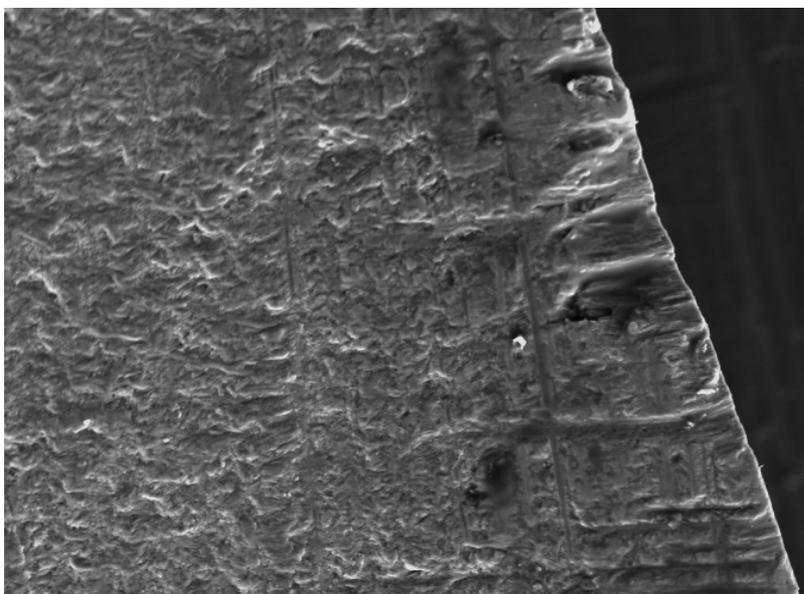


Fig. 33

### **3.2.2. ZONA SUBSUPERFICIAL O INTERMEDIA**

En dicha región, nuestros resultados con microscopía electrónica de barrido con electrones retrodispersos, ponen de relieve la existencia de:

- A. Gran cantidad de **poros** que se entrecruzan con los prismas del esmalte (Fig. 34) o bien se disponen formando una serie de bandas alternas (Fig. 35).

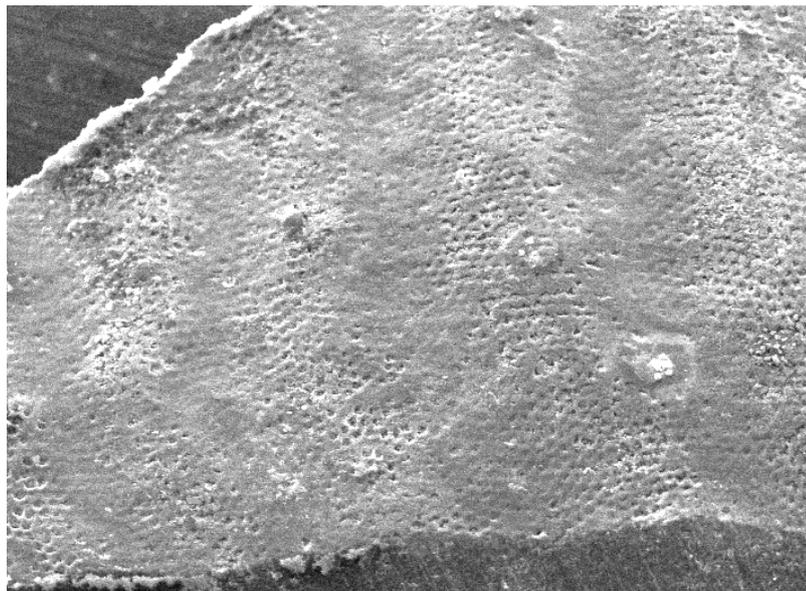


Fig. 34



Fig. 35

- B. En dicha zona se observan, también, **áreas**, correspondientes a la lesión, **carentes de prismas** con presencia de poros y delimitadas por prismas de morfología irregular (Figs. 36 y 37)

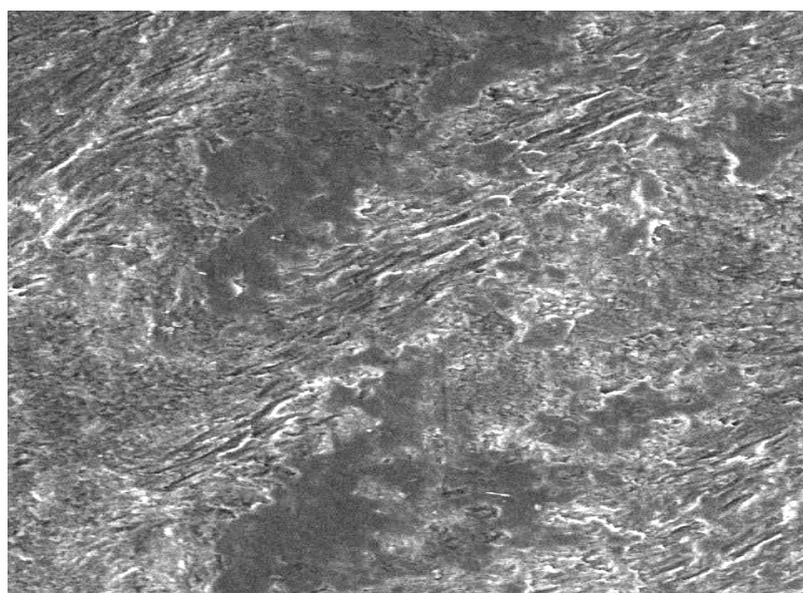


Fig. 36

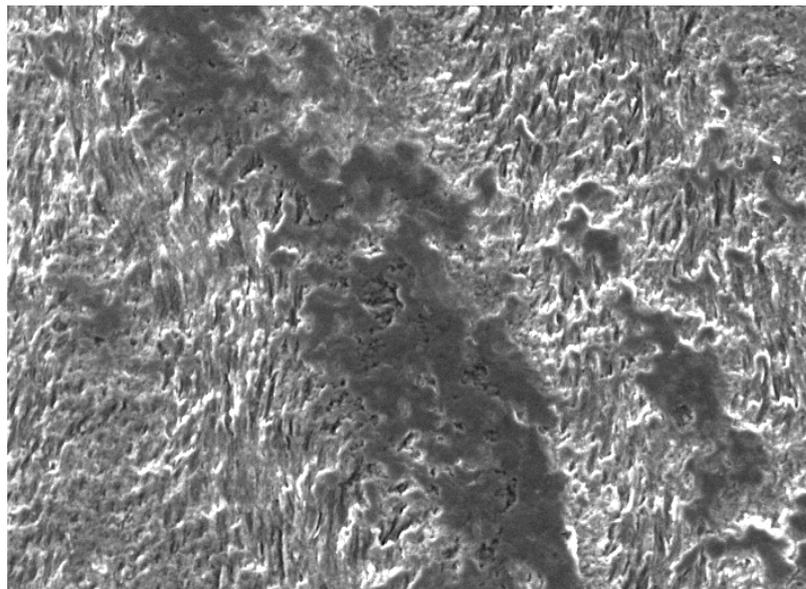


Fig. 37

En relación con la **morfología de los prismas** del esmalte fluorótico, los resultados ponen de relieve la existencia de:

- C. Un patrón prismático muy **variable** con prismas de disposición paralela y diámetro irregular (Figs. 38-40).

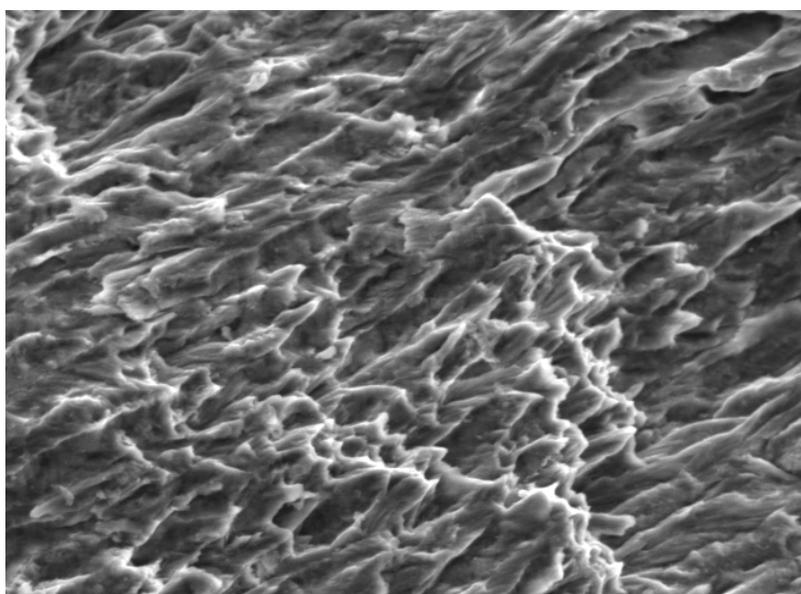


Fig. 38

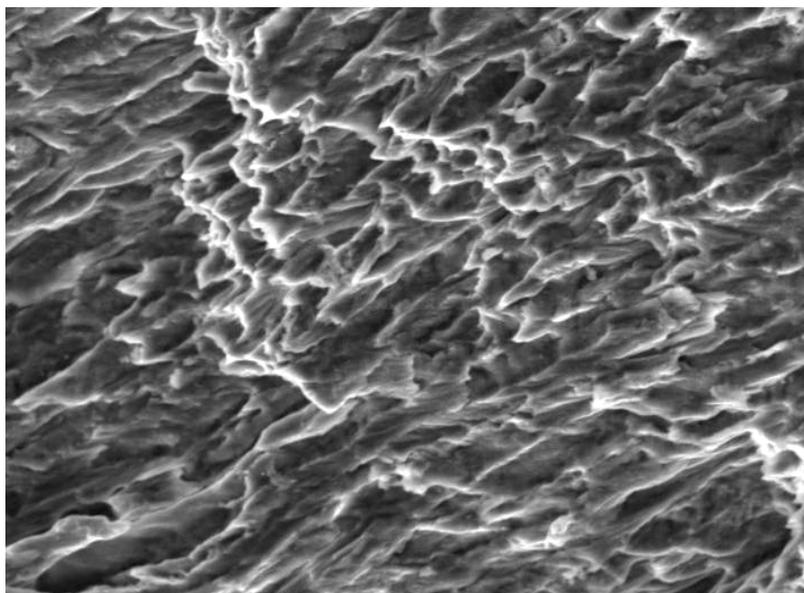


Fig. 39

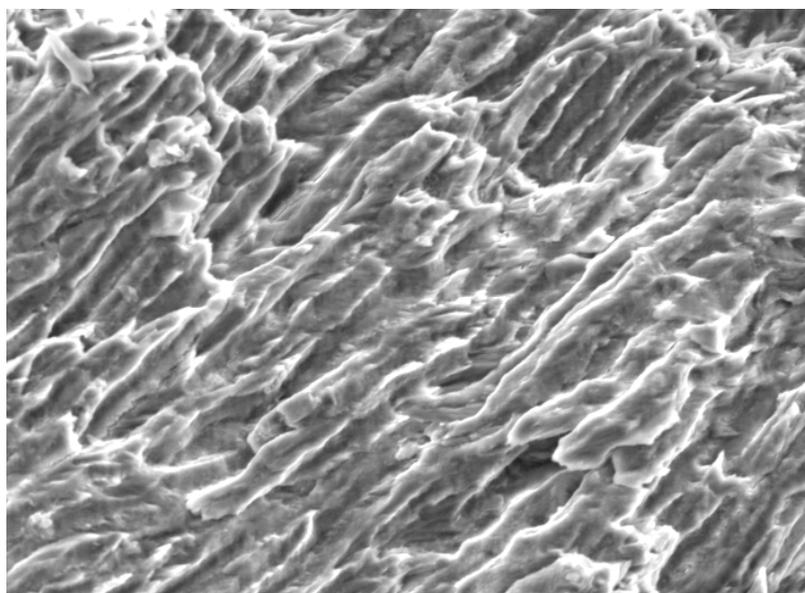


Fig. 40

- D. Un patrón prismático **filamentoso** de diámetro variable y presencia de **áreas interprismáticas** (Fig. 41-45). En dichas áreas se observa la presencia de material orgánico (Fig. 46). Además, se pone de manifiesto la trayectoria ondulada de los prismas (Fig. 47).

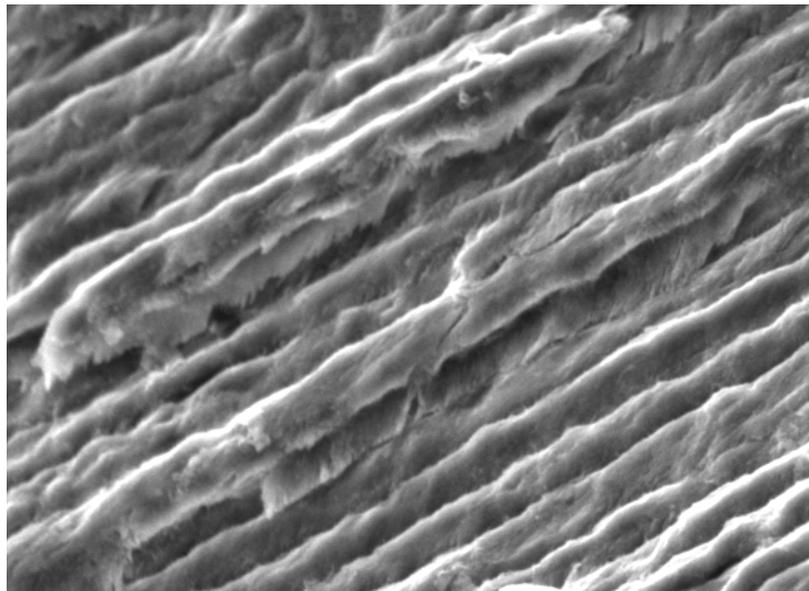


Fig. 41

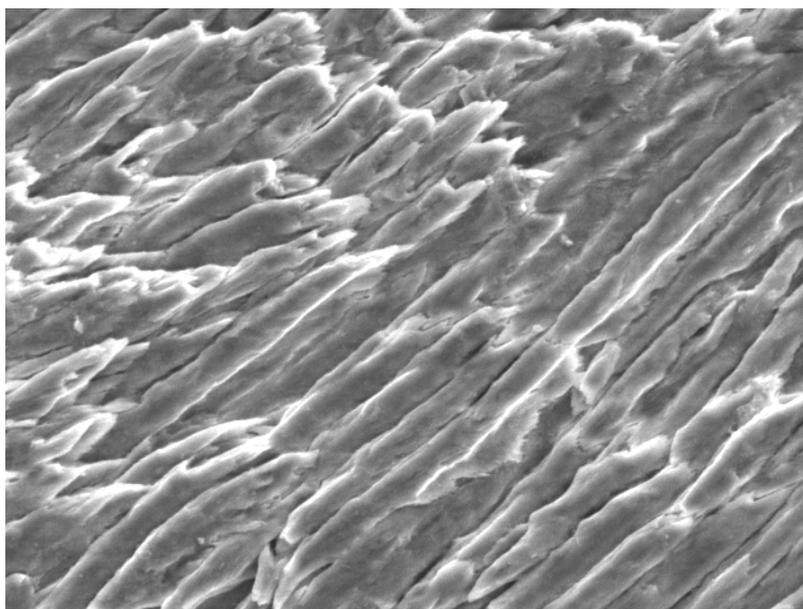


Fig. 42

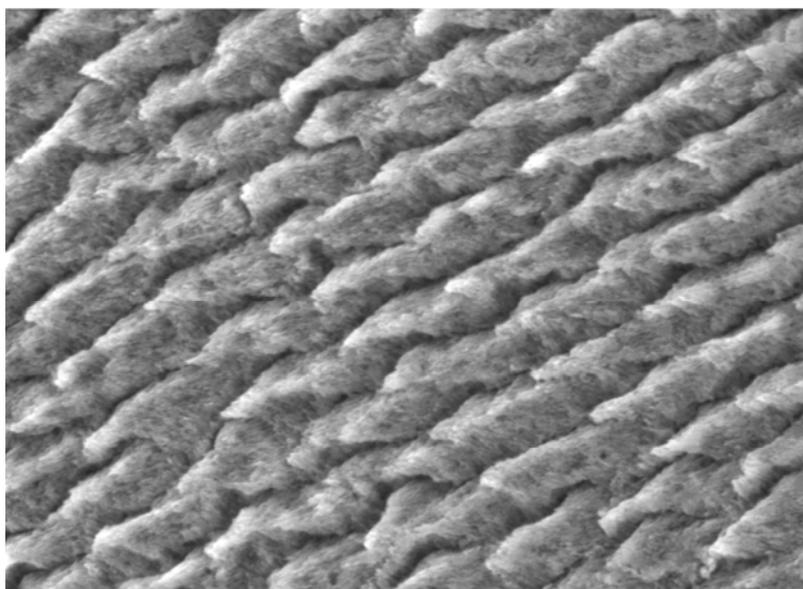


Fig. 43

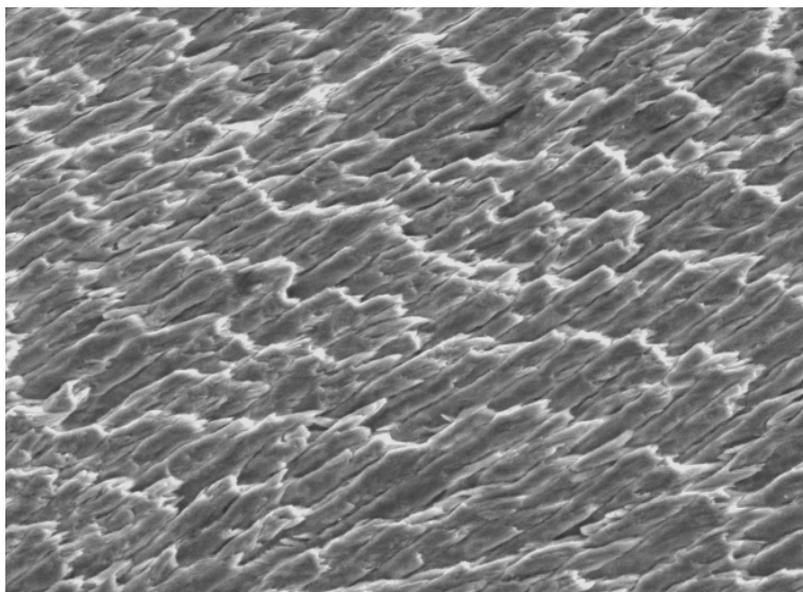


Fig. 44

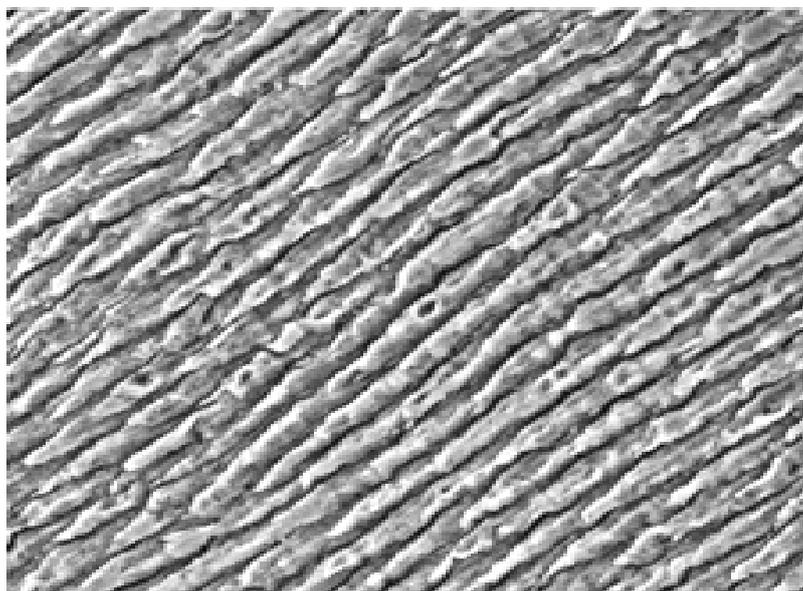


Fig. 45

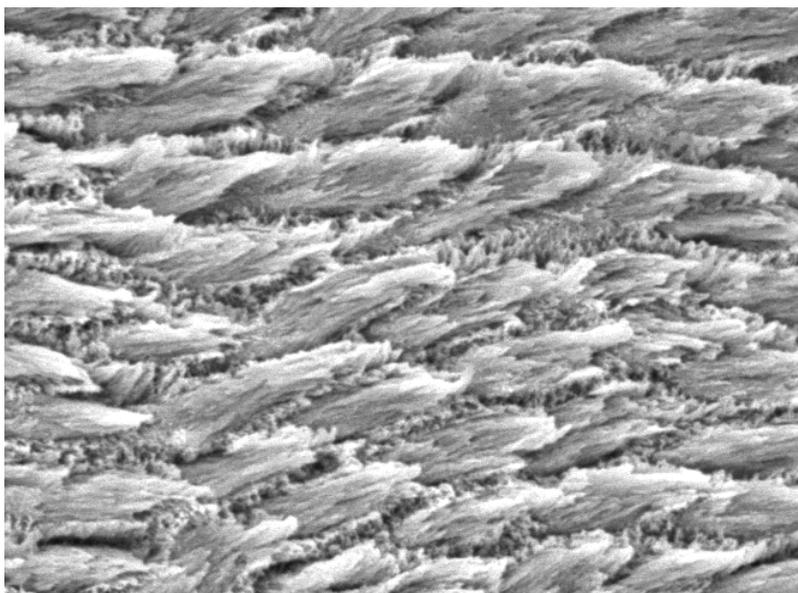


Fig. 46

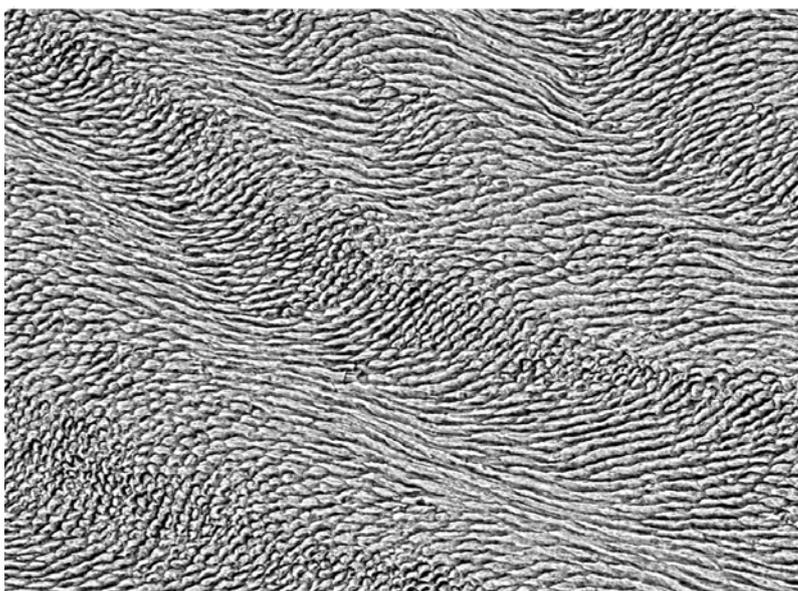


Fig. 47

### 3.2.3. ZONA INTERNA

En dicha zona se aprecian, mediante la microscopía electrónica de barrido con electrones retrodispersos la existencia de:

Áreas, claras y oscuras, de anchura variable y límites imprecisos, que corresponden a las **bandas de Hunter-Schereger**. En dichas bandas, que en ocasiones se continúan con la lesión fluorótica, existe una pérdida de la estructura prismática (Figs. 48 y 49).

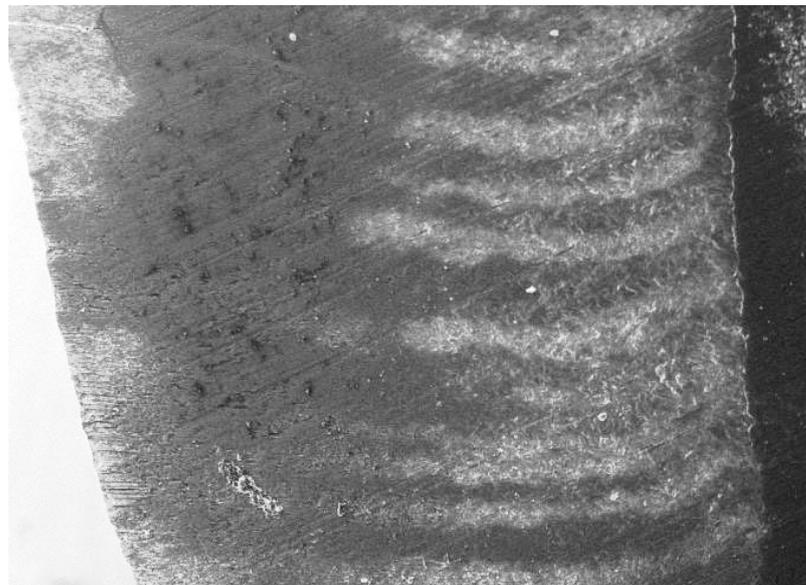


Fig. 48

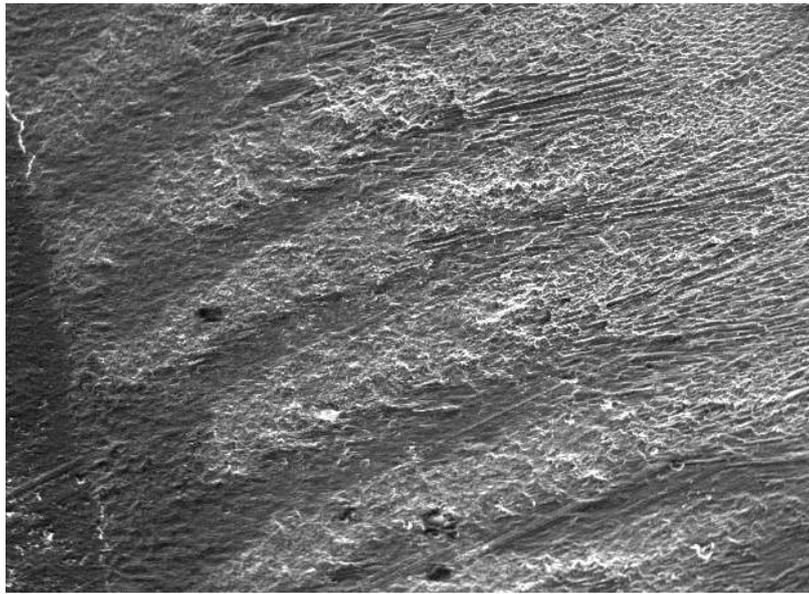


Fig. 49

Nuestros resultados, tras aplicar la técnica del grabado ácido, ponen de manifiesto la presencia de patrones tipo I y II (Figs. 50-54).

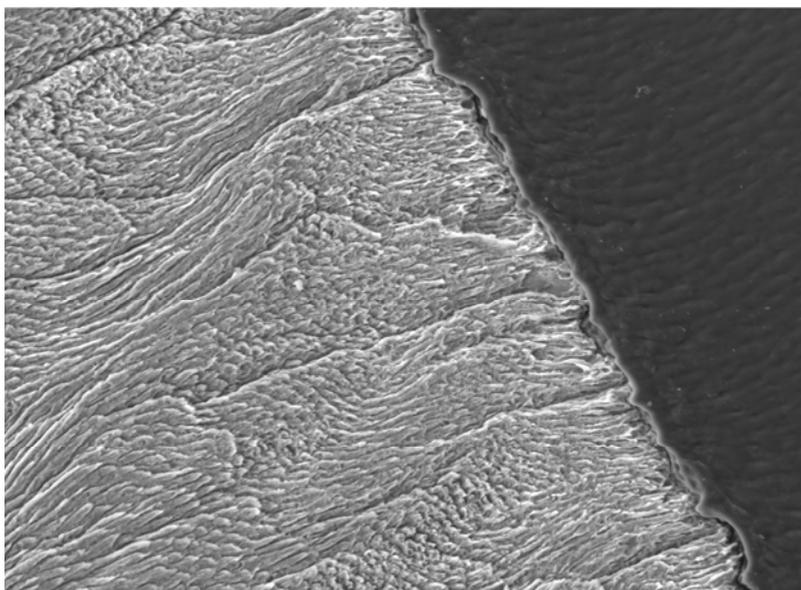


Fig. 50

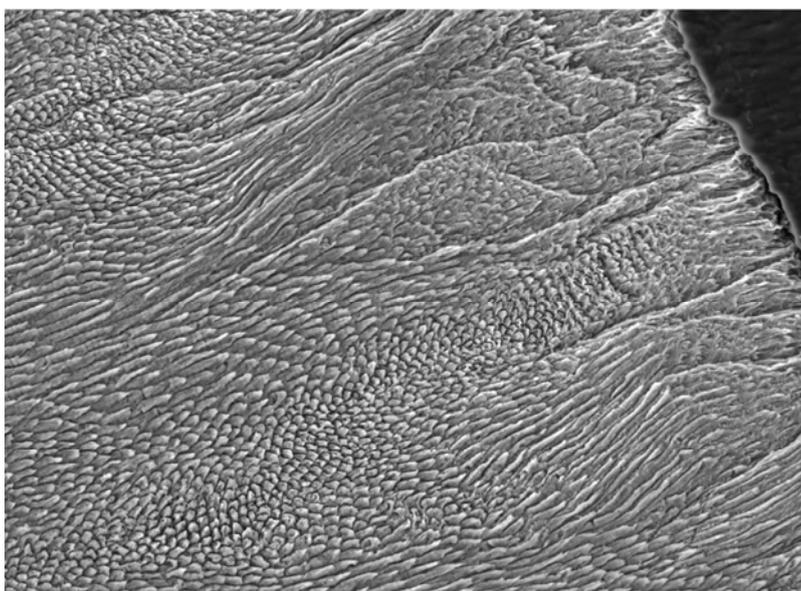


Fig. 51

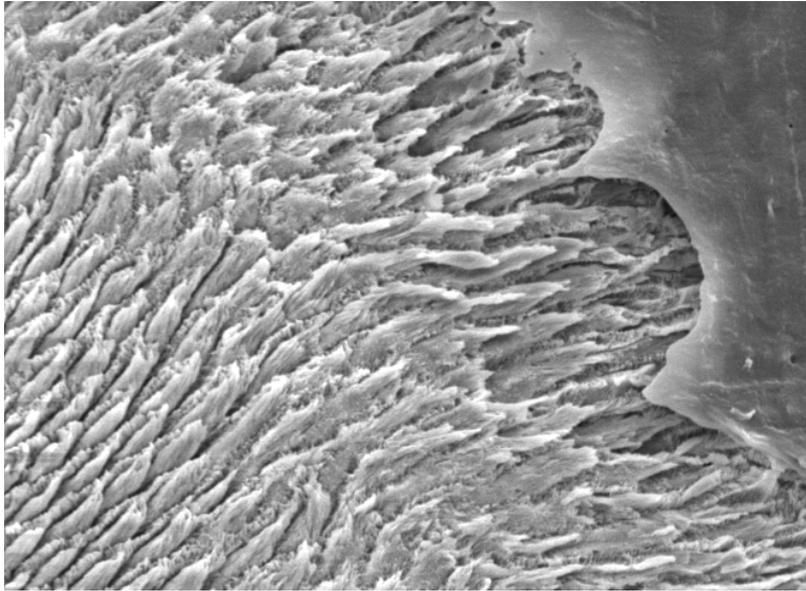


Fig. 52

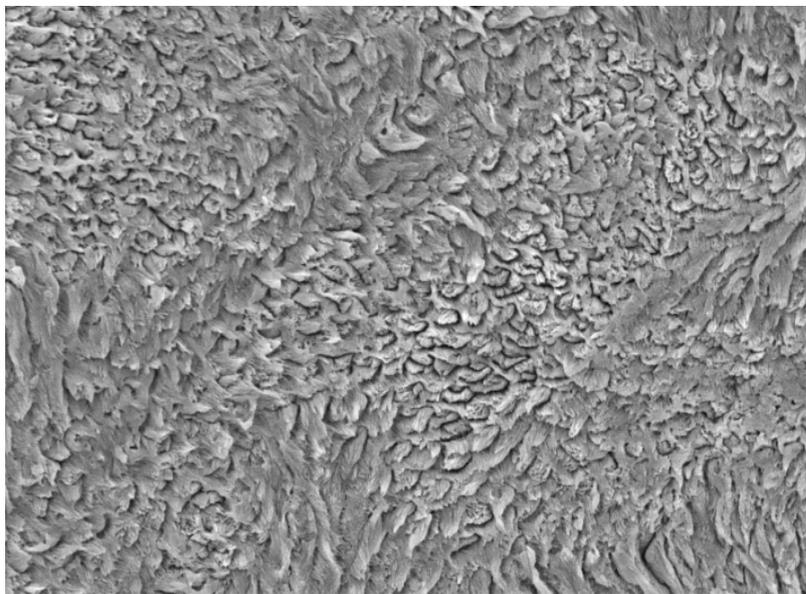


Fig. 53

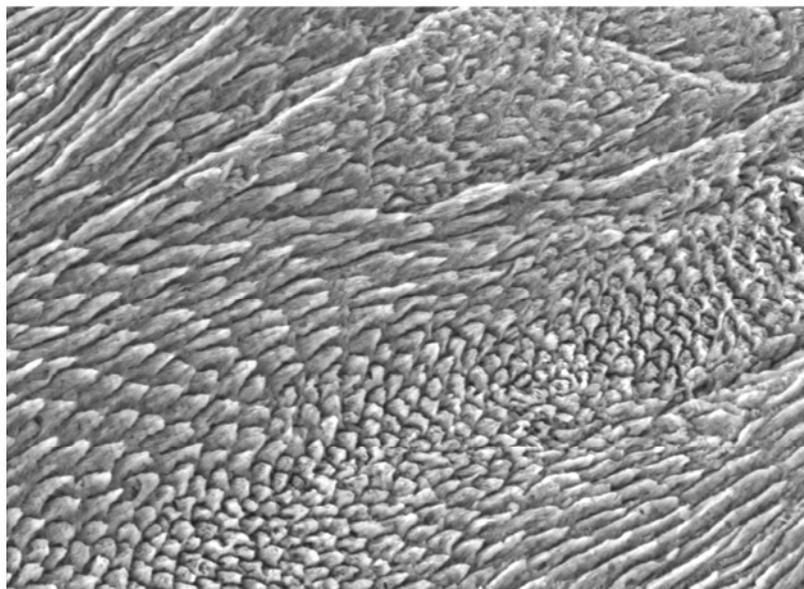


Fig. 54

#### **4. RESULTADOS CON MICOSCOPIA ELECTRÓNICA ANALÍTICA CUANTITATIVA POR ENERGIA DISPERSIVA DE RAYOS-X**

Los resultados microanalíticos cuantitativos procedentes de las piezas estudiadas, tanto fluoróticas (DF) como controles (DC), se expresan sucesivamente en diferentes tablas. En las tablas 1-14 se recogen los valores para las muestras fluoróticas y en las tablas 15-21 para las piezas dentarias controles.

En las tablas correspondientes a las piezas fluoróticas se indican, sucesivamente, los valores de fósforo y calcio, en fracción de peso, en cada una de las zonas analizadas - lesión fluorótica, zona externa, zona interna- de acuerdo con la metodología descrita en el apartado correspondiente. Cada tabla incluye las 10 mediciones.

En las tablas correspondientes a las muestras control se indican, la fracción de peso de fósforo y calcio correspondiente a las mediciones realizadas en distintas regiones del esmalte, de acuerdo con la metodología descrita en el apartado correspondiente. Cada tabla, incluye las 10 mediciones.

Las tablas 22-28 expresan los valores medios de la fracción de peso de fósforo y calcio, para cada uno de las muestras fluoróticas, en cada una de las regiones del esmalte que han sido analizadas.

La tabla 29, expresa, los valores medios de la fracción de peso de fósforo y calcio para cada una de las muestras controles estudiadas.

En la tabla 30 se expresa la concentración media y desviación estándar de las piezas dentarias fluoróticas en las tres regiones analizadas (lesión fluorótica, zona externa, zona interna), así como el valor global medio de los dientes controles.

En las figuras 55 y 56 se hallan reflejados, en forma de histograma, los valores de concentración media de fósforo y calcio, respectivamente, correspondientes a cada una de las tres regiones analizadas (lesión fluorótica, zona externa, zona interna), de las piezas fluoróticas, y también la concentración media de cada elemento para las piezas control.

Los resultados estadísticos comparativos se expresan en las tablas 31-36. Las tablas 31-33 recogen las comparaciones estadísticas para el fósforo y calcio en el esmalte entre los dientes controles y dientes fluoróticos.

Los resultados estadísticos comparativos para el fósforo y calcio entre las distintas zonas de las piezas fluoróticas se recogen en las tablas 34 a 36.

En las tablas 37-38 se reflejan un resumen de los datos estadísticos comparativos indicados anteriormente

**4.1. RESULTADOS MICROANALÍTICOS CUANTITATIVOS:  
DIENTES FLUORÓTICOS**

TABLA 1. Fracción de Peso de Fósforo en Esmalte DF1

	LESIÓN FLUORÓTICA	ZONA EXTERNA	ZONA INTERNA
1	8,59	13,31	21,55
2	14,35	22,44	12,26
3	13,05	23,22	19,02
4	10,83	20,56	9,71
5	11,43	13,33	19,68
6	14,03	11,96	22,81
7	16,35	13,92	13,22
8	9,90	23,49	15,01
9	16,57	17,05	21,88
10	17,72	21,55	20,51

TABLA 2. Fracción de Peso de Calcio en Esmalte DF2

	LESIÓN FLUORÓTICA	ZONA EXTERNA	ZONA INTERNA
1	17,16	26,00	24,90
2	21,80	37,28	25,57
3	17,89	31,15	23,12
4	20,97	20,45	29,27
5	17,13	24,69	33,77
6	21,20	31,38	33,46
7	25,81	32,31	23,23
8	20,34	35,98	28,30
9	21,27	22,08	23,87
10	23,84	28,11	30,94

TABLA 3. Fracción de Peso de Fósforo en Esmalte DF3

	LESIÓN FLUORÓTICA	ZONA EXTERNA	ZONA INTERNA
1	10,11	25,37	15,67
2	14,85	25,75	20,07
3	15,36	22,39	27,33
4	12,75	23,16	15,69
5	13,45	26,85	14,08
6	16,52	26,57	24,30
7	19,25	19,70	24,86
8	19,51	15,39	16,93
9	20,86	15,56	16,39
10	16,89	17,67	27,65

TABLA 4. Fracción de Peso de Calcio en Esmalte DF4

	LESIÓN LUORÓTICA	ZONA EXTERNA	ZONA INTERNA
1	21,04	30,53	31,88
2	19,67	29,26	27,07
3	21,94	28,35	38,19
4	25,71	41,40	30,27
5	21,00	41,02	38,47
6	25,99	34,14	33,32
7	31,64	34,30	36,17
8	26,08	23,71	34,67
9	29,23	28,48	39,61
10	26,73	34,70	44,11

TABLA 5. Fracción de Peso de Fósforo en Esmalte DF5

	LESIÓN FLUORÓTICA	ZONA EXTERNA	ZONA INTERNA
1	17,55	19,17	20,28
2	15,03	19,02	19,91
3	12,11	19,79	21,14
4	17,38	18,40	29,11
5	9,82	20,13	20,07
6	17,57	19,73	20,08
7	16,20	19,65	19,70
8	17,35	21,28	31,68
9	13,42	20,41	19,68
10	16,54	19,10	26,77

TABLA 6. Fracción de Peso de Calcio en Esmalte DF6

	LESIÓN FLUORÓTICA	ZONA EXTERNA	ZONA INTERNA
1	33,97	37,35	39,24
2	31,48	35,19	32,37
3	35,07	36,38	39,46
4	30,97	36,32	38,65
5	27,17	39,90	41,01
6	32,44	36,79	34,78
7	32,20	35,87	36,36
8	32,81	36,51	38,75
9	24,54	40,05	36,19
10	29,65	34,83	34,21

TABLA 7. Fracción de peso de Fósforo en Esmalte DF7

	LESIÓN FLUORÓTICA	ZONA EXTERNA	ZONA INTERNA
1	12,77	17,23	15,86
2	16,51	17,96	16,76
3	8,34	16,74	16,69
4	14,91	24,19	38,67
5	14,76	26,91	17,34
6	13,76	17,56	11,10
7	11,40	16,72	16,80
8	14,05	22,74	16,29
9	14,74	15,80	16,23
10	8,35	16,91	16,16

TABLA 8. Fracción de Peso de Calcio en Esmalte DF8

	LESIÓN FLUORÓTICA	ZONA EXTERNA	ZONA INTERNA
1	25,68	32,01	26,63
2	33,24	32,18	30,01
3	22,16	29,66	29,26
4	27,71	53,10	48,04
5	25,26	31,61	32,67
6	26,26	32,91	26,71
7	20,02	29,52	29,67
8	24,18	27,90	30,46
9	26,76	26,38	28,41
10	22,80	26,40	28,70

TABLA 9. Fracción de Peso de Fósforo en Esmalte DF9

	LESIÓN FLUORÓTICA	ZONA EXTERNA	ZONA INTERNA
1	15,89	18,04	17,88
2	21,04	18,93	23,70
3	24,25	18,43	20,49
4	16,15	13,20	15,23
5	13,91	28,80	13,01
6	26,19	15,16	19,31
7	22,88	17,48	24,45
8	13,61	17,46	10,09
9	16,22	18,43	17,00
10	13,05	18,04	17,01

TABLA 10. Fracción de Peso de Calcio en esmalte DF10

	LESIÓN FLUORÓTICA	ZONA EXTERNA	ZONA INTERNA
1	26,67	38,27	41,07
2	26,28	34,83	41,09
3	28,59	39,26	43,28
4	34,54	35,56	30,53
5	24,34	34,30	24,45
6	30,01	44,47	30,15
7	24,39	35,31	33,18
8	25,43	36,94	32,00
9	26,50	30,86	31,78
10	21,70	38,27	27,75

TABLA 11. Fracción de Peso de Fósforo en Esmalte DF11

	LESIÓN FLUORÓTICA	ZONA EXTERNA	ZONA INTERNA
1	16,17	25,10	23,94
2	12,42	20,69	20,55
3	21,03	18,78	20,08
4	12,43	22,52	20,74
5	16,35	18,40	20,21
6	10,98	21,26	21,47
7	12,03	18,83	18,44
8	18,71	18,26	15,68
9	10,57	17,97	12,66
10	13,41	20,49	14,28

TABLA 12. Fracción de Peso de Calcio en Esmalte DF12

	LESIÓN FLUORÓTICA	ZONA EXTERNA	ZONA INTERNA
1	25,28	39,53	35,25
2	20,24	40,10	30,97
3	25,42	34,97	33,16
4	24,57	36,21	39,73
5	24,80	29,85	35,59
6	16,82	35,63	40,69
7	21,03	35,41	26,31
8	20,86	32,76	33,69
9	23,87	31,40	31,69
10	23,39	34,10	36,45

TABLA 13. Fracción de Peso de Fósforo en Esmalte DF13

	LESIÓN FLUORÓTICA	ZONA EXTERNA	ZONA INTERNA
1	16,12	21,70	18,66
2	8,18	21,10	19,88
3	14,32	20,55	11,68
4	14,30	22,71	22,64
5	16,29	18,21	22,49
6	13,25	20,41	13,22
7	11,24	19,33	20,33
8	13,98	17,93	12,00
9	14,56	14,38	17,88
10	16,61	23,01	13,24

TABLA 14. Fracción de Peso de Calcio en Esmalte DF14

	LESIÓN FLUORÓTICA	ZONA EXTERNA	ZONA INTERNA
1	27,09	34,55	33,93
2	20,77	41,86	32,49
3	24,75	38,33	40,28
4	27,21	40,69	41,87
5	26,08	32,37	40,33
6	27,41	39,55	41,42
7	19,12	30,46	34,41
8	24,44	32,96	39,50
9	27,06	32,83	30,16
10	25,92	34,82	33,15

**4.2. RESULTADOS MICROANALÍTICOS CUANTITATIVOS :**  
**DIENTES CONTROL**

TABLA 15. Fracción de Peso de Fósforo y Calcio en Esmalte DC1

	P	Ca
1	12,86	30,25
2	18,72	29,55
3	12,63	30,25
4	17,50	31,68
5	14,28	28,54
6	13,91	30,41
7	13,17	27,64
8	14,14	28,56
9	13,37	28,04
10	18,99	28,94

TABLA 16. Fracción de Peso de Fósforo y Calcio en Esmalte DC2

	P	Ca
1	19,22	32,90
2	16,42	31,47
3	13,88	29,09
4	14,57	31,87
5	19,69	29,83
6	13,63	32,38
7	14,27	29,57
8	18,26	28,31
9	14,50	29,52
10	14,12	30,89

TABLA 17. Fracción de Peso de Fósforo y Calcio en Esmalte DC3

	P	Ca
1	17,47	33,98
2	19,05	37,19
3	14,75	30,81
4	14,83	37,90
5	16,10	35,60
6	22,10	37,28
7	22,86	34,02
8	18,32	32,62
9	17,08	34,12
10	17,53	34,10

TABLA 18. Fracción de Peso de Fósforo y Calcio en Esmalte DC4

	P	Ca
1	17,34	30,60
2	16,34	39,21
3	19,10	63,74
4	19,26	31,61
5	18,40	35,37
6	17,90	38,11
7	17,28	33,20
8	19,69	35,58
9	17,32	27,36
10	15,58	35,55

TABLA 19. Fracción de Peso de Fósforo y Calcio en Esmalte DC5

	P	Ca
1	18,60	35,81
2	18,96	37,49
3	16,97	34,90
4	16,98	31,83
5	18,05	29,53
6	23,65	32,21
7	16,92	29,64
8	19,28	34,21
9	17,58	34,35
10	16,66	32,09

TABLA 20. Fracción de Peso de Fósforo y Calcio en Esmalte DC6

	P	Ca
1	17,30	36,74
2	17,38	33,32
3	23,10	31,43
4	18,82	40,91
5	23,83	38,61
6	19,52	30,95
7	17,87	32,97
8	20,94	32,71
9	22,51	39,88
10	15,15	30,85

TABLA 21. Fracción de Peso de Fósforo y Calcio en Esmalte DC7

	P	Ca
1	13,90	29,30
2	15,00	30,03
3	14,18	30,37
4	18,66	28,61
5	18,73	28,72
6	13,48	29,10
7	19,74	28,75
8	12,56	29,18
9	13,89	28,40
10	12,96	29,72

TABLA 22. Fracción de Peso Media de Fósforo y Calcio en Esmalte DF1

	<b>P</b>	<b>Ca</b>
<b>LESIÓN FLUORÓTICA</b>	13,28 ± 3,07	20,74 ± 2,81
<b>ZONA EXTERNA</b>	18,08 ± 4,64	28,94 ± 5,66
<b>ZONA INTERNA</b>	17,56 ± 4,62	27,64 ± 4,10

TABLA 23. Fracción de Peso Media de Fósforo y Calcio en Esmalte DF2

	<b>P</b>	<b>Ca</b>
<b>LESIÓN FLUORÓTICA</b>	15,96 ± 3,35	24,90 ± 3,90
<b>ZONA EXTERNA</b>	21,84 ± 4,48	32,59 ± 5,65
<b>ZONA INTERNA</b>	20,30 ± 5,25	35,38 ± 4,99

TABLA 24. Fracción de Peso Media de Fósforo y Calcio en Esmalte DF3

	<b>P</b>	<b>Ca</b>
<b>LESIÓN FLUORÓTICA</b>	15,30 ± 2,69	31,03 ± 3,17
<b>ZONA EXTERNA</b>	19,67 ± 0,82	36,92 ± 1,77
<b>ZONA INTERNA</b>	22,84 ± 4,55	37,10 ± 2,75

TABLA 25. Fracción de Peso Media de Fósforo y Calcio en Esmalte DF4

	<b>P</b>	<b>Ca</b>
<b>LESIÓN FLUORÓTICA</b>	12,96 ± 2,78	25,41 ± 3,61
<b>ZONA EXTERNA</b>	19,28 ± 3,86	32,17 ± 7,73
<b>ZONA INTERNA</b>	18,19 ± 7,41	31,06 ± 6,22

TABLA 26. Fracción de Peso Media de Fósforo y Calcio en Esmalte DF5

	<b>P</b>	<b>Ca</b>
<b>LESIÓN FLUORÓTICA</b>	18,32 ± 4,83	26,84 ± 3,55
<b>ZONA EXTERNA</b>	16,40 ± 4,05	36,81 ± 3,63
<b>ZONA INTERNA</b>	17,82 ± 4,46	33,53 ± 6,24

TABLA 27. Fracción de Peso Media de Fósforo y Calcio en Esmalte DF6

	<b>P</b>	<b>Ca</b>
<b>LESIÓN FLUORÓTICA</b>	14,41 ± 3,50	22,63 ± 2,80
<b>ZONA EXTERNA</b>	20,23 ± 2,28	35,00 ± 3,23
<b>ZONA INTERNA</b>	18,81 ± 3,53	34,35 ± 4,23

TABLA 28. Fracción de Peso Media de Fósforo y Calcio en Esmalte DF7

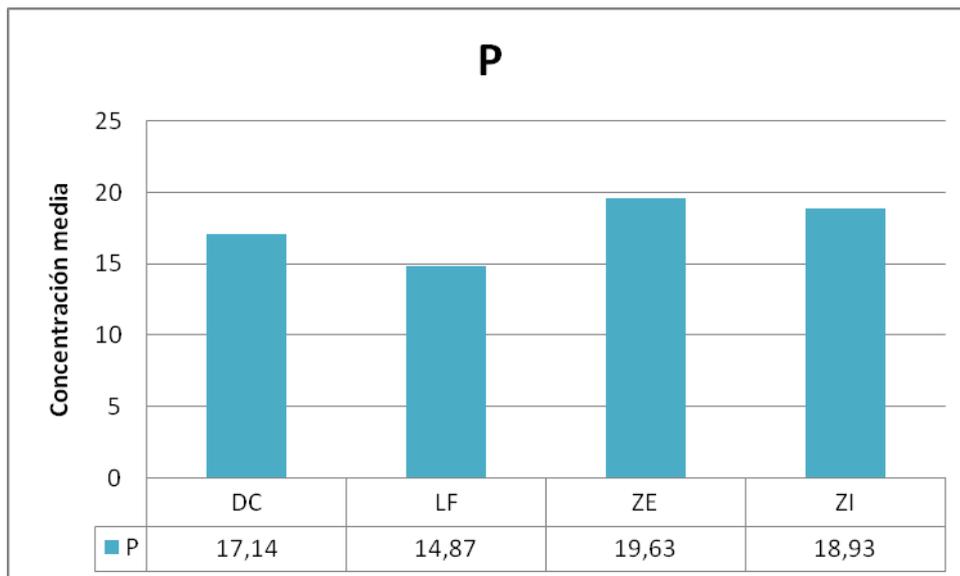
	<b>P</b>	<b>Ca</b>
<b>LESIÓN FLUORÓTICA</b>	13,89 ± 2,56	24,99 ± 2,87
<b>ZONA EXTERNA</b>	19,93 ± 2,59	35,84 ± 3,95
<b>ZONA INTERNA</b>	17,20 ± 4,30	36,75 ± 4,33

TABLA 29. Fracción de Peso Media de Fósforo y Calcio en Esmalte DC

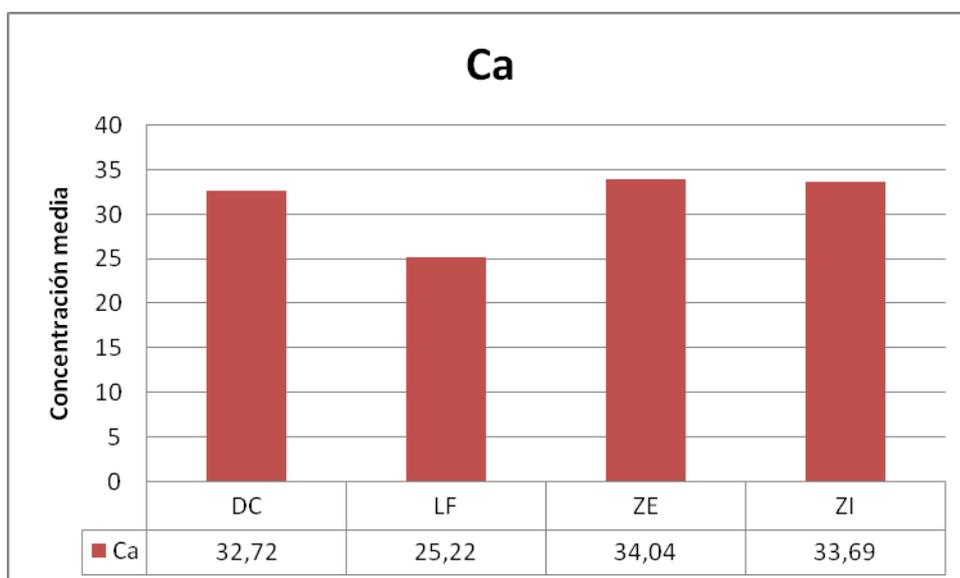
	P	Ca
1	15,31 ± 2,67	29,22 ± 0,65
2	15,86 ± 2,36	30,58 ± 1,54
3	14,96 ± 2,46	29,39 ± 1,26
4	18,01 ± 2,73	34,76 ± 2,24
5	17,82 ± 1,31	37,03 ± 10,03
6	18,37 ± 2,08	33,21 ± 2,60
7	19,64 ± 2,87	34,84 ± 3,85

**Tabla 30. Concentración media (MEDIA) y desviación estándar (SD), de dientes fluoróticos (DF): lesión fluorótica (LF), zona externa (ZE), zona interna (ZI) y dientes control (DC)**

MEDIA ± SD			
DIENTE	ZONAS	P	Ca
DF	LF	14,87 ± 3,62	25,22 ± 4,35
	ZE	19,63 ± 3,54	34,04 ± 5,40
	ZI	18,93 ± 5,13	33,69 ± 5,58
DC	DC	17,14 ± 2,83	32,72 ± 5,02



**Fig 55.** Concentración media de fósforo para dientes control (DC) y lesión fluorótica (LF), zona externa (ZE) y zona interna (ZI) de dientes fluoróticos.



**Fig 56.** Concentración media de calcio para dientes control (DC) y lesión fluorótica (LF), zona externa (ZE) y zona interna (ZI) de dientes fluoróticos.

**4.3. RESULTADOS ESTADÍSTICOS COMPARATIVOS**

**Tabla 31. Comparación estadística Grupo Control frente a Grupo Lesión Fluorótica**

	P	Ca
U de Mann-Whitney	1.150,000	140,000
W de Wilcoxon	3.635,000	2.625,000
Z	-5,418	-9,627
Sig. asintót. (bilateral)	6,02766E-08	6,13321E-22

**Tabla 32. Comparación estadística Grupo Control frente a Grupo Zona Interna**

	P	Ca
U de Mann-Whitney	2.228,000	2156,000
W de Wilcoxon	4.173,000	4.641,000
Z	-0,925	-1,225
Sig. asintót. (bilateral)	0,35486	0,22047

Tabla 33. Comparación estadística Grupo Control frente a Grupo Zona Externa

	P	Ca
U de Mann-Whitney	1.844,000	2.417,000
W de Wilcoxon	4.329,000	4.902,000
Z	-2,526	-0,138
Sig. asintót. (bilateral)	0,01155	0,89061

Tabla 34. Comparación estadística Grupo Lesión Fluorótica frente a Grupo Zona Interna

	P	Ca
U de Mann-Whitney	1.172,000	477,500
W de Wilcoxon	3.657,000	2.962,500
Z	-5,326	-8,221
Sig. asintót. (bilateral)	1,00233E-07	2,02326E-16

**Tabla 35. Comparación estadística Grupo Lesión Fluorótica frente a Grupo Zona Externa**

	P	Ca
U de Mann-Whitney	750,000	494,500
W de Wilcoxon	3.235,000	2.979,500
Z	-7,085	-8,150
Sig. asintót. (bilateral)	1,38979E-12	3,64335E-16

**Tabla 36. Comparación estadística Grupo Zona Interna frente a Grupo Zona Externa**

	P	Ca
U de Mann-Whitney	2.124,000	2.268,000
W de Wilcoxon	4.609,000	4.753,000
Z	-1,359	-0,759
Sig. asintót. (bilateral)	0,17424	0,44814

**Tabla 37. Resumen comparaciones estadísticas para el Fósforo Grupo Control, Grupo Lesión Fluorótica (LF), Grupo Zona Externa (ZE), y Grupo Zona Interna (ZI)**

P				
	C	LF	ZE	ZI
C	-	6,02E-08	0,01155	0,35486
LF	6,02E-08	-	1,38E-12	1,00E-07
ZE	0,01155	1,38E-12	-	0,17424
ZI	0,35486	1,00E-07	0,17424	-

**Tabla 38. Resumen comparaciones estadísticas para el Calcio Grupo Control (C), Grupo Lesión Fluorótica (LF), Grupo Zona Externa (ZE), y Grupo Zona Interna (ZI).**

Ca				
	C	LF	ZE	ZI
C	-	6,13E-22	0,89061	0,22047
LF	6,13E-22	-	3,64E-16	2,02E-16
ZE	0,89061	3,64E-16	-	0,44814
ZI	0,22047	2,02E-16	0,44814	-

## **DISCUSIÓN**

La discusión de la presente tesis doctoral vamos a subdividirla en tres apartados. En primer lugar, consideraremos la metodología utilizada y su pertinencia en relación con el objeto de estudio. En segundo lugar, abordaremos la discusión de los resultados obtenidos a partir del estudio con microscopía electrónica de barrido, tanto con electrones retrodispersos como con electrones secundarios. Finalmente, en tercer lugar, nos ocuparemos, en la presente discusión, de la mineralización del esmalte en las piezas de fluorosis estudiadas procedentes de las zonas endémicas. Con carácter previo, es importante resaltar que estudiar piezas dentarias con fluorosis procedentes de comunidades endémicas nos va a permitir definir estructural y microanalíticamente patrones que son imposibles de sistematizar en nuestro medio, en el que los estudios de piezas fluoróticas se han realizado con niveles significativamente más bajos de flúor en el medio (0,7-0,8mg/ml) (De Torres, 1976; Mazarrasa, 1986; Gómez y cols., 1987; Bravo y Sard, 1992; Marín Camaches y cols, 1998; Rioboo, 2000; Hardisson y cols., 2001; Gómez Santos y cols., 2008).

En relación con la utilización de la microscopía electrónica, tanto con electrones secundarios y retrodispersos, se ha aplicado, en nuestro estudio, las pautas establecidas previamente en nuestro grupo de investigación que han mostrado resultados óptimos tanto en la identificación de patrones estructurales como de las unidades estructurales individualmente consideradas. Asimismo, las pautas indicadas en el capítulo de material y métodos son las que corresponden a los niveles de grises que permiten establecer los niveles de

densidad mineral (Crespo y cols., 1987, 1996; Campos y cols., 1987, 1999, 2000; Sánchez-Quevedo y cols., 1987a, 1998, 2001a, 2004, 2006).

En relación con el primer apartado, estudios realizados por nuestro grupo de investigación avalan la utilización de la técnica de criofijación y el posterior proceso de congelación-deseccación (Freeze-drying). El proceso de criofijación tiene como objetivo la solidificación del agua o solutos en un estado microcristalino (Müller y Moor, 1984). Para ello es necesario realizar un enfriamiento de las muestras, a una temperatura  $< -150^{\circ}\text{C}$  a fin de prevenir la formación de cristales de hielo superiores a los 10 ó 15nm. Estas pautas no generan alteraciones estructurales. Recientemente, Warley, 1997, Fernández-Segura y Warley, 2008, indican que la criofijación preserva la composición y compartimentalización de los distintos elementos a nivel celular y tisular, como consecuencia de la solidificación de las muestras por congelación. Este hecho es de gran relevancia para el estudio microanalítico de las muestras biológicas, si bien tiene menor incidencia cuando estos están mineralizados.

En la presente tesis doctoral hemos realizado la criofijación mediante inmersión utilizando como agente criogénico el nitrógeno líquido. Su utilización se ha debido a su carácter no tóxico, a que carece de impurezas y al hecho de presentar un carácter inerte. Es el criofijador mas utilizado independientemente del tipo de muestra biológica (Seveus, 1980; Warley y cols., 1994; Oh y cols., 2005; Ware y Baran, 2007; Kakodkar y cols., 2008; Mroginski y cols., 2008).

Aunque se ha discutido la efectividad o no de utilizar la criofijación y la congelación-desección en tejido duros, los estudios que se han realizado en nuestro grupo de investigación han demostrado que, con independencia de otras circunstancias, como la existencia o no de material biológico asociado, los resultados con criofijación y congelación-desección resultan ser los mas idóneos teniendo en cuenta que, además, proporcionan un grado muy aceptable de resolución morfológica (Roomans, 1991; Warley y Gupta, 1991).

La utilización de cualquier fijador o incluso la utilización de muestras desecadas, puede generar más artefactos que cuando se utiliza la criofijación y la congelación-desección, como se ha demostrado en piezas dentarias (Gupta y Hall, 1978; Zs-Nagy, 1983; Roomans, 1988,1991). Por otra parte, Morgan ya demostró que la congelación-desección evita la transformación del mineral amorfo en mineral apatítico, una transformación que ocurre cuando algunos fluidos se utilizan en la preparación de muestras mineralizadas (Morgan,1979 ; López Escámez,1992 a).

Las técnicas cuantitativas que hemos utilizado en la presente tesis doctoral, se basan en el método de la razón pico/fondo (P/B), que fue propuesto por Statham y Pawley, 1978 y Small y cols., 1979. Dicho método presenta una serie de ventajas respecto al inicialmente desarrollado por Hall y cols.1973, ya que mide la señal de fondo o background entre los mismos niveles de energía que la señal característica (Statham, 1979). Por otra

parte, es importante también indicar que el método de la razón pico/fondo es independiente de las fluctuaciones en la intensidad de corriente del haz de electrones y de los efectos de la superficie de la muestra, hecho este que permite el análisis cuantitativo de superficies rugosas mediante microscopía electrónica de barrido (Boekestein y cols., 1984; Armstrong, 1991; Warley , 1997).

Dicho método se basa en que la concentración de un elemento en el área de análisis en la muestra es proporcional al número de cuentas netas de la señal característica de dicho elemento, dividido por el fondo debajo del pico. La constante de proporcionalidad es característica para cada elemento y configuración instrumental, de aquí que la calibración del sistema de detección requiera la utilización de estándares (Warley,1990,1997). En el estudio de los tejidos mineralizados, se han utilizado diversos tipos de estándares, que consisten en sales minerales que contienen los elementos Ca y P, los cuales son objeto de investigación microanalítica en la presente tesis doctoral (Jannosy y cols., 1976; Ali y cols.,1977; Roomans, 1979; Russ, 1980; Warley, 1990; Nieto, 2003).

En nuestro estudio, hemos utilizado estándares constituidos por sales minerales puras con composición química conocida y estables bajo el haz de electrones, de acuerdo con lo establecido por Roomans, 1979; Warley, 1997, y por los trabajos realizados por nuestro grupo de investigación en piezas dentarias y en otros tejidos mineralizados (Campos y cols., 1984,1992, 2000;

Crespo y cols., 1987, 1996; García y cols., 1990; Sánchez-Quevedo y cols., 1987, 1992, 2001, 2004; Carranza y cols., 2006)

Una vez discutidos algunos de los criterios utilizados en la metodología abordaremos, en segundo lugar, la discusión relativa a los patrones morfológicos observados en las piezas fluoróticas procedentes de los dos núcleos endémicos estudiados.

Con microscopía óptica y técnica de desgaste, todas las piezas dentarias muestran una triple región que es característica de los dientes fluoróticos (Thylstrup y Fejerskov, 1979; Nikolishin 1989; Suckling y cols., 1989; Fejerskov y cols., 1994; Rojas-Sánchez y cols., 2007). Asimismo, se observan periquimatías, líneas de imbricación y las estrías de Retzius correspondientes (Kierdorf y cols., 1993; Fejerskov y cols., 1994; Kierdorf, 2000). Estas primeras observaciones indican que, en los dientes fluoróticos de ambas regiones, el proceso de amelogénesis no conduce a alteraciones significativas de los patrones de configuración periférica de la superficie del esmalte y que, por tanto, el proceso fluorótico afecta, básicamente, a otros niveles de la estructura dentaria.

La microscopía electrónica de barrido con electrones secundarios y retrodispersos pone, sin embargo, de relieve que la denominada región subsuperficial, característica de las piezas dentales fluoróticas, (Giambro y cols., 1995; Al-Sugair y Akpata, 1999; Kierdorf y cols., 1996, 2004; Vieira y cols., 2005; Rojas-Sánchez y cols., 2007), ofrece patrones diferentes que en

general no han sido sistematizados en las investigaciones existentes al respecto. Las descripciones hacen referencia a dicha región sin determinar las características morfológicas que la configuran desde una perspectiva topográfica.

Nuestros resultados demuestran la existencia de tres patrones: en banda, en mácula y estrellado, que difieren entre sí y que se caracterizan por presentar en todos y en cada uno de ellos la densidad de grises que corresponde a la lesión fluorótica.

Es difícil establecer secuencias entre los patrones, si bien la relación entre el patrón macular y el estrellado pudiera ser secuencial.

Hay que señalar, por otra parte, que con independencia de dichos patrones, las zonas periféricas a los mismos pueden a veces estar afectadas de lesiones sin que la microscopia electrónica con electrones retrodispersos detecte el nivel de gris correspondiente.

Cuando se analiza la región subsuperficial en los distintos elementos que la configuran, se encuentra una gran heterogeneidad microscópica que va desde la desaparición del componente prismático a la existencia de prismas con poros que alternan con áreas de prismas bien constituídos. Así mismo, el grabado ácido demuestra la existencia de una materia orgánica abundante que indicaría que las alteraciones más significativas en el proceso de amelogénesis se evidencian inicialmente en esta región (Richards y cols., 1989; Kierdorf y Kierdorf, 1997; Kierdorf y cols., 1997; Al-Sugair y Akpata, 1999).

La presencia de poros, que ha sido descrita por distintos autores (Shearer y cols.,1978; Thylstrup y Fejerskov, 1979; Kardos y cols.,1989; Susheela y Bhatnagar, 1993; Fejerskov y cols., 1994; Kierdorf H y Kierdorf U, 1997; Susheela y cols, 1999; Robinson y cols., 2004; Bartlett y cols.,2005) se extiende a zonas, como anteriormente se indicó, periféricas a la región estructuralmente identificada como lesión fluorótica por la microscopía electrónica de barrido con electrones retrodispersos. Ello indica que la región subsuperficial no está delimitada de forma clara y que, en consecuencia, la lesión fluorótica constituye un proceso continuo entre las distintas regiones del diente. La denominada zona subsuperficial es, por tanto, un núcleo de concentración lesiva en la que los efectos de la fluorosis convergen y determinan los patrones arriba indicados.

En la región superficial, los prismas están, en general, bien constituídos, preservándose además un esmalte aprismático, que varía en espesor de unas zonas a otras. Es importante señalar la existencia de cracks y microfisuras que han sido interpretadas como formas secundarias y no primarias de la afectación fluorótica (Thylstrup y Fejerskov, 1979). Es importante señalar que las laminillas que se dirigen desde la superficie hacia el interior no cruzan la lesión fluorótica, lo que indica que su constitución es independiente de la lesión.

En relación con la región interna, es fácil evidenciar las bandas de Hunter-Schreger, bandas que no parecen afectadas por la lesión fluorótica,

hecho este que se pone de relieve con la utilización del grabado ácido, que permite determinar la existencia de patrones I y II a dicho nivel. La unión amelodentinaria también está bien establecida en estas piezas dentarias.

El estudio microanalítico constituye el tercer objetivo de la discusión que hemos planteado.

Como hemos comentado en la introducción, estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación han puesto de relieve la idoneidad de esta metodología para el estudio cuantitativo de los elementos químicos implicados en el proceso de mineralización. Dichos estudios se han realizado fundamentalmente en las otoconias del sistema vestibular (Campos y cols., 1984, 1987, 1990, 1999; Anniko y cols., 1984, 1985, 1987; García, 1990; Cañizares y cols., 1990 a, b; Crespo y cols., 1996) y en piezas dentarias normales y afectadas de distinta patología (Kockapan y Wetzel, 1990; Fukuta y cols., 2001; Sánchez- Quevedo y cols., 2001 a-c, 2004, 2006; Rojas-Sánchez y cols., 2007).

La aplicación, en esta tesis doctoral, de dicha metodología a piezas dentarias fluoróticas de zonas endémicas nos puede permitir establecer, al igual que en los casos estudiados con anterioridad, no solo los patrones de mineralización de unas piezas determinadas, sino la existencia o no de una homogeneidad en la afectación de las piezas fluoróticas con independencia de su origen.

Nuestros resultados ponen de relieve, en primer lugar, que en las zonas subsuperficiales, en las que se detectan las alteraciones que hemos

indicado con anterioridad, los niveles de Ca y P son significativamente inferiores a los existentes en las muestras control, lo cual pone de relieve y confirma el carácter hipomineralizado de dicha región (Shinoda y Ogura, 1982; Nelson, 1990; Giambro y cols., 1995; Kierdorf y cols., 1996; Kierdorf y Kierdorf, 1997; Kierdorf y cols., 1997, 2000; Jälevik y cols., 2001; Aoba y Fejerskov, 2002; Kierdorf y cols., 2004) y que ello ocurre en los tres patrones microscópicos observados en esta región. Nuestros datos cuantitativos revelan que dicha hipomineralización está más intensamente relacionada con los valores de calcio y es menos evidente en relación con los valores de fósforo.

Por lo que respecta a los valores de calcio y fósforo existentes en las zonas externas e internas de las piezas fluoróticas, es importante reseñar que nuestros valores no muestran diferencias significativas con los valores control, a excepción de los valores de fósforo, que son marginalmente significativos en la zona externa. Los valores obtenidos cuantitativamente en nuestro estudio no revelan, por tanto, la hipermineralización que postulan diferentes autores (Yanagisawa y cols., 1989; Lyaruu y cols., 1989; Wöltgens y cols., 1995). A nuestro juicio, ello es debido a que nuestra metodología es más precisa al ser cuantitativa y a que, como hemos descrito, con microscopía electrónica de barrido con electrones secundarios y retrodispersos las lesiones fluoróticas no puedan limitarse a las zonas estructuralmente definidas en la zona subsuperficial.

Cuando comparamos los valores existentes en la zona subsuperficial y las existentes en las zonas externa e interna de los dientes fluoróticos, nuestros resultados demuestran diferencias estadísticamente significativas tanto en las concentraciones de calcio como de fósforo, observándose, por tanto, que las zonas externa e interna están más hipermineralizadas que la región subsuperficial.

Aunque, como ya hemos indicado, no existen diferencias significativas entre los valores de calcio entre las zonas externa e interna y los controles si hay que señalar que son valores más elevados que los de las piezas ortóticas. Los valores mas elevados del fósforo, también detectados a ese nivel, que sólo en la zona externa son marginalmente significativos, en relación con los controles, hay que relacionarlos con la presencia de fosfoserina-16 en la amelogenina (Takagi y cols., 1998), un componente de la materia orgánica que estaría presente en un proceso alterado de la amelogénesis, que es lo que específicamente ocurre en la fluorosis (Aoba y Fejerskov, 2002).

Resulta, sin embargo, paradójico que cuando las lesiones fluoróticas ya están constituidas en la zona subsuperficial los niveles de fósforo disminuyen, sin que podamos hasta el momento encontrar una explicación satisfactoria. Ello es posiblemente debido a que el componente mineral, propiamente dicho, ha disminuido y con ello los valores de fósforo, o a que se ha instaurado un proceso degenerativo de la amelogénesis una vez

instaurada la lesión fluorótica (Matsuo y cols.,1996; Kierdorf y cols., 1997; Nikolishin y cols., 1999; Vieira y cols., 2005).

Finalmente, nuestros resultados microanalíticos ponen de relieve que entre los valores de calcio y fósforo de las zonas externas e internas de las piezas fluoróticas no existen diferencias estadísticamente significativas, lo que es compatible básicamente con los patrones estructurales descritos en nuestro estudio morfológico.

Estos datos difieren con los reseñados en la literatura (Lyaruu y cols., 1989; Yanagisawa y cols., 1989; Wöltgens y cols., 1995) dado que en los mismos se determinó la hipermineralización de la zona externa, que en nuestro caso no hemos podido evidenciar ni en relación con los controles, ni en relación con la zona interna del propio diente fluorótico.

La sistematización de patrones estructurales y microanalíticos que hemos establecido, en la presente tesis doctoral, en dientes fluoróticos puede constituir la base de investigación necesaria para el desarrollo de futuras estrategias reparativas en dientes cuyo sustrato estructural y mineral sea compatible con lo estudiado en la presente tesis doctoral.

## **CONCLUSIONES**

El estudio de las piezas fluoróticas analizadas en la presente tesis doctoral, procedentes de zonas endémicas de Venezuela y Argentina, nos permite establecer las siguientes conclusiones:

1. El estudio con microscopía óptica de luz no revela diferencias microscópicas respecto de las piezas control, a nivel del esmalte, en relación con la presencia de las periquimatías y las estrías de Retzius.
2. El estudio con microscopía electrónica de barrido con electrones secundarios y con electrones retrodispersos nos permite sistematizar la existencia de tres patrones morfoestructurales distintos en la región subsuperficial del esmalte. Dichos patrones se identifican como patrón en banda, patrón macular y patrón estrellado.
3. El estudio con microscopía electrónica de barrido mediante electrones retrodispersos no detecta alteraciones en las zonas periféricas de los patrones morfoestructurales observados en la región subsuperficial del esmalte de las piezas dentarias fluoróticas, aunque existen lesiones que se evidencian con microscopía electrónica de barrido por electrones secundarios.

4. El estudio con microscopia electrónica de barrido con electrones secundarios permite identificar alteraciones significativas de los patrones de amelogénesis, preferentemente en la región subsuperficial del esmalte.
5. Los estudios microanalíticos cuantitativos permiten determinar y cuantificar, a nivel de las distintas regiones topográficas del esmalte fluorótico, los elementos indicadores básicos de mineralización sin que se generen resultados artefactuales significativos.
6. Las muestras afectadas con fluorosis dental presentan, en la región subsuperficial, niveles cuantitativos de calcio y fósforo significativamente inferiores a los existentes en las muestras control, lo que determina un patrón de mineralización hipomineralizado.
7. La microscopia electrónica analítica cuantitativa no revela diferencias significativas en los niveles de calcio y fósforo en las zonas periféricas externa e interna a la región subsuperficial cuando se compara con los valores control. Ello determina que en dichas zonas existe un patrón de mineralización ortotípico.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Aasenden R, Peebles TC (1974). Effects of fluoride supplementation from birth of human deciduous and permanent teeth. *Arch. Oral Biol.* 19: 321-326.
- Aasenden R, Peebles TC (1978). Effects of fluoride supplementation from birth on dental caries and fluorosis in teenaged children. *Arch. Oral Biol.* 23: 111-115.
- Ainsworth NJ (1933). Mottled teeth. *Br. Dent. J.* 55: 233-250.
- Ali SY, Gray JC, Wisley A, Philips M (1977). Preparation of thin cryosections for electron probe analysis of calcifying cartilage. *J. Microsc.* 111: 65-76.
- Al- Sugair M, Akpata E (1999). Effect of fluorosis on etching of human enamel. *J. Oral Rehabilitation* 26: 521-528.
- Anniko M, Ylikoshi J, Wroblewski R (1984). Microprobe analysis of human otoconia. *Acta Otolaryngol. (Stockh)* 97: 283-289.
- Anniko M, Lim D, Sobin A, Wroblewski R (1985). Applications of SEM and SEM-X-ray microanalysis in the inner ear pathology. *Scanning Microsc.* 1: 345-355.
- Anniko M, Wikström SO, Wroblewski R (1987). X-ray microanalytic studies on developing otoconia. *Acta Otolaryngol. (Stockh)* 104: 285-289.
- Aoba T, Fejerskov O (2002). Dental fluorosis: chemistry and biology. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 13:155-170.
- Armstrong JY (1991). Quantitative elemental analysis of individual microparticles with electron beam instruments. En: *Electron probe quantitation*. Heinrich KFJ, Newbury DE (eds.). Plenum Press. New York. pp: 261-315.
- Bartlett JD, Dwyer SE, Beniash E, Skobe Z, Payne-Ferreira TL (2005). Fluorosis: a new model and new insights. *J. Dent. Res.* 84: 832-836.

- Black GV, McKay F (1916) Mottled teeth: an Endemic developmental imperfection of the enamel heretofore unknown in the literature of dentistry. *Dental Cosmos* 58: 129-156.
- Boekestein A, Thiel F, Stols ALH, Bouw E, Stadhouders A (1984). Surface roughness and the use of peak-to-background-ratio in the X-ray microanalysis of bulk bio-organic samples. *J. Microsc.* 134: 327-334.
- Bravo M, Osorio E, García-Anllo I, LLodra JC, Baca P (1996). The influence of dft index on sealant success: a 48-month survival analysis. *J. Dent. Res.* 75: 768-774.
- Bravo M, Sard J (1992). Fluoración artificial del agua de bebida en España: situación actual y perspectivas futuras. *Arch. Odontoestomatología Prev. y Com.* 4: 45-50.
- Burger P, Cleaton-Jones P, du Plessis J, de Vries J (1987). Comparison of two fluorosis indices in the primary dentition of Tswana children. *Community Dent. Oral Epidemiol.* 15: 95-97.
- Campos A, Ciges M, Cañizares FJ, Crespo PV (1984). Mineralization in the newborn rat statoconia. An EDAX study. *Acta Otolaryngol.* (Stockh) 97: 475-478.
- Campos A, Revelles F, Cañizares FJ, Sánchez-Quevedo MC (1987). Biología celular del aparato vestibular. *Anales de Otorrinolaringología. II:* 85-90.
- Campos A, Cañizares FJ, Sánchez-Quevedo MC, Romero PJ (1990). Otoconial degeneration in the aged utricle and saccule. *Advances in Oto-Rhino- Laryngology* 45: 143-153.
- Campos A, López- Escámez JA, Crespo PV (1992). Electron probe x-ray microanálisis of Ca and K distributions in the otolithic membrane. *Micron. Micros. Acta* 23: 349-350.

- Campos A, González-Jaranay M, Moreu G, Sánchez-Quevedo MC (1993). Electron microprobe analysis in periodontal guided tissue regeneration. *Cell Biology International* 17: 695-696.
- Campos A, Crespo PV, García JM, Sánchez-Quevedo MC, Ciges M (1999). The crystalline pattern of calcium in different topographical regions of the otoconial membrane. An electron probe and spectroscopic diffraction study. *Acta Otolaryngol. (Stockh)* 119: 203-206.
- Campos A, Rodríguez IA, Sánchez-Quevedo MC, García JM, Nieto-Albano OH, Gómez de Ferraris ME (2000). Mineralization of human premolar occlusal fissures. A quantitative histochemical microanalysis. *Histol. Histopathol.* 15: 499-502.
- Cañizares FJ, Baeyens JM, Gonzalez MR, Campos A (1990a). Ototoxicity caused by gentamycin in the otolithic membrane of saccule. *Advances in Oto-Rhino-Laryngology* 45: 94-98.
- Cañizares FJ, Baeyens JM, Gonzalez MR, Campos A (1990b). Effects of long-term administration of gentamicin in the vestibular macula. *Advances in Oto-Rhino-Laryngology* 45: 103-105.
- Carranza ML, Carda C, Simbron A, Sánchez-Quevedo MC, Celaya G, Gómez de Ferraris ME (2006). Morphology of the lateral pterygoid muscle associated to the mandibular condyle in the human prenatal stage. *Acta Odontologica Latinoamericana* 19: 29-36.
- Castaing R (1951). Applications des sondes electroniques a une methode d'analyse ponctuelle chimique et cristallographique. *These Doctoral d'Etat. Onera, ed. Paris.*
- Clark DC (1994). Trends in prevalence of dental fluorosis in North America. *Community Dentistry and Oral Epidemiology* 22:148-52.

- Crespo PV, Cañizares FJ, García JM, Revelles F y Campos A (1985). Estudio microscópico y microanalítico de la remineralización dentaria. *Histol. Med.* 1: 85-92.
- Crespo PV, Sánchez-Quevedo MC, Cubero MA, Collado MA (1987). Digital analytical electron microscopy of diaphysary bone tissue. *Cell Biology Reviews* S2: 278.
- Crespo PV, Fernández-Segura E, Ciges M, Campos A (1990). X-ray microanalysis of cis-platin ototoxicity in the cochlea. *Advances in Oto-Rhino-Laryngology* 45: 129-132.
- Crespo PV, López-Escámez JA, Cañizares FJ, Campos A (1993). X-ray Microanalytical Determination of P,S and K Concentrations in the Gelatinous Membrane of the Utricle. *Acta Otolaryngol.(Stockh)* 113:176-180.
- Crespo PV, García JM, Sánchez-Quevedo MC, Campos A (1996). Elemental distribution of Ca and S in the process of otoconial biomineralization. *The International Journal of Developmental Biology* 1: 267-268.
- Dean HT (1934). Classification of mottled enamel diagnosis. *J. Am. Dent. Assoc.* 21:1421-1426.
- Dempster DW, Elder HY, Smith DA (1979). Scanning electron microscopy of rachitic rat bone. *Scan. Electron. Microsc.* 2: 513-520.
- Den Besten PK (1994). Dental fluorosis: its use as a biomarker. *Adv. Dent. Res.* 8:105-110.
- De Torres RM (1976). Dental fluorosis. *Bol. Inf. Dent. (Madr.)* 36: 43-46.
- Everett ET, McHenry Ma, Reynolds N, Eggerston H, Sullivan J, Kantmann C, Martinez-Mier EA, Warrick JM, Stookey GK (2002). Dental fluorosis: variability among different inbred mouse strains. *J. Dent. Res.* 81: 794-798.

- Fejerskov O, Silverstone LM, Melsen B, Moller IJ (1975). Histological features of fluorosed human dental enamel. *Caries. Res.* 9: 190-210.
- Fejerskov O, Thylstrup A, Larsen MJ (1977). Clinical and Structural Features and Possible Pathogenic Mechanisms of Dental Fluorosis, *Scand. J. Dent. Res.* 85: 510-534.
- Fejerskov O, Larsen MJ, Josephsen K, Thylstrup A (1979). Effect of long-term administration of fluoride on plasma fluoride and calcium in relation to forming enamel and dentin in rats. *Scand. J. Dent. Res.* 87:98-104.
- Fejerskov O, Richards A, Josephsen K (1983). Pathogenesis and Biochemical Findings of Dental Fluorosis in Various Species. In: *Fluoride. Effects on Vegetation, Animals and Humans*, Shupe JL, Peterson HB, and Leone NC, Eds. Salt Lake City: Paragon Press, 305-317.
- Fejerskov O, Larsen MJ, Richards A, Baelum V (1994). Dental Tissue effects of Fluoride. *Adv. Dent. Res.* 8: 15-31.
- Fernández-Segura E, García JM, Sánchez- Quevedo MC, Campos A. (1988a). Scanning electron microscopy in the backscattered imaging (BEI) mode of human natural killer cells. *Inst. Phys. Conf. Ser.* 93: 227-228.
- Fernández-Segura E, Cañizares FJ, Cubero MA, Revelles F, Campos A (1997). Backscattered electron imaging of cultured cells: application to electron probe X-ray microanalysis using a scanning electron microscope. *J. Microsc.* 188: 72-78.
- Fernández-Segura E, Cañizares FJ, Cubero MA, Warley A, Campos A (1999a). A procedure to prepare cultured cells in suspension for electron probe x-ray microanalysis: application to scanning and transmission electron microscope. *Exp. Cell. Res.* 253: 454-462.

- Fernández-Segura E, Cañizares FJ, Cubero MA , Warley A, Campos A (1999b). Changes in elemental content during apoptotic cell death studied by electron probe X-ray microanalysis. *Exp. Cell. Res.* 253: 454-462.
- Fernández-Segura E, Warley A (2008). Electron probe X-ray microanalysis for the study of cell physiology. *Methods Cell. Biol.* 88:19-43.
- Forrest JR (1956). Caries incidence and enamel defects in areas with different levels of fluoride in drinking water. *Br. Dent T.* 100: 195-200.
- Fukuta Y, Totsuka M, Fukuta Y, Takeda Y, Yoshida Y, Niitsu J, Yamamoto H (2001). Histological and analytical studies of a tooth in a patient with cleidocranial dysostosis. *J. Oral Sci.* 43: 85-89.
- García JM, Cañizares JM, Sánchez-Quevedo MC, Campos A (1990). X-Ray microanalytical comparison of different procedures for otoconial mineralization. *Advances in Oto-Rhino-Laryngology* 45: 136-139.
- Giambro NJ, Prostack K, Den Besten PK (1995). Characterization of fluorosed enamel by color reflectance, ultrastructure, and elemental composition. *Caries Res.* 29: 251-257.
- Goldstein JI, Roming AD, Newbury DE, Lyman CE, Echlin P, Fioro C, Joy DC, Lifshin E. (1992). Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis. *Plenum Press*, New York.
- Gómez A, Sierra A, Doreste J, González R, Alvarez R, Hardisson A, Chiscano R (1987) Dental caries in the population of a zone of endemic fluorosis (Municipality of La Guancha, Santa Cruz de Tenerife) *Rev. Sanid. Hig. Publica (Madr).*61: 63-74.
- Gómez-Santos G, González-Sierra MA, Vázquez-García-Machiñena J (2008). Evolution of caries and fluorosis in schoolchildren of the Canary

- Islands (Spain): 1991, 1998, 2006. *Med. Oral. Patol. Oral Cir Bucal.* 13: 599-608.
- Gómez de Ferraris ME, Campos A (2000). *Histología y Embriología Bucodental.* Madrid 2ªed. Editorial Médica Panamericana.
  - Gupta BL, Hall TA. (1978). Electron probe microanalysis of calcium. *Ann. NY Acad. Sci.* 307: 28-51.
  - Hall TA, Anderson HC, Appleton TC (1973). The use of thin specimens for X-ray microanalysis in biology. *J. Microsc.* 99: 177-182.
  - Hardisson A, Rodríguez MI, Burgos A, Flores LD, Gutiérrez R, Várela H (2001). Fluoride levels in publicly supplied and bottled drinking water in the Island of Tenerife, Spain. *Bull Environ. Contam. Toxicol.* 67: 163-170.
  - Heinrich K (1981). Electron beam X-ray microanalysis. *Van Nostrand Reinhold.* New York.
  - Jalevik B, Odelius H, Dietz W, Noren J (2001). Secondary ion mass spectrometry and X-ray microanalysis of hypomineralized enamel in human permanent first molars. *Arch. Oral Biol.* 46: 239-247.
  - Janossy AGS, Neumann D (1976). Quantitative X-ray microanalysis: microcrystal standards and excessive background. *Micron.*7: 225-229.
  - Jenkins R, De Vries NJ (1969). Practical X-ray spectrometry. *Springer-Verlag.* NY. 2-50.
  - Kakodkar R, Nundy S, Soin AS (2008). Use of banked cryopreserved veins from explanted recipient livers in living donor liver transplantation. *Surgery* 144: 93-95.
  - Kardos TB, Hunter AR, Hubbard MJ (1989). Scanning electron microscopy of trypsin-treated enamel from fluorosed rat molars. *Adv. Dent. Res.* 3: 183-187.
  - 
  -

- Kierdorf U, Kierdorf H, Fejerskov O (1993). Fluoride- induced developmental changes in enamel and dentine of European roe deer (*Capreolus capreolus* L) as a result of environmental pollution. *Arch. Oral Biol.* 38: 1071-1081.
- Kierdorf U, Kierdorf H, Sedlacek F, Fejerskov O (1996). Structural changes in fluorosed dental enamel of red deer (*Cervus elaphus* L) from a region with severe environmental pollution by fluorides. *J. Anat.* 188: 183-195.
- Kierdorf H, Kierdorf U, Boyde A (1997). A quantitative backscattered electron imaging study of hypomineralization and hypoplasia in fluorosed dental enamel of deer. *Ann. Anat.* 179: 405-412.
- Kierdorf H, Kierdorf U (1997). Disturbances of the secretory stage of amelogenesis in fluorosed deer teeth: a scanning electron-microscopic study. *Cell. Tissue Res.* 289: 125-135.
- Kierdorf H, Kierdorf U, Richards A, Sedlacek F (2000). Disturbed Enamel Formation in Wild Boars (*Sus scrofa* L.) From Fluoride Polluted Areas in Central Europe. *The Anatomical Record* 259: 12-24.
- Kierdorf H, Kierdorf U, Richards A, Josephsen K (2004). Fluoride-induced alterations of enamel structure: an experimental study in the miniature pig. *Anat. Embryol.* 207: 463-474.
- Koçkapan C, Wetzel WE (1990). SEM study and clinical observations of "Turner teeth". *Dtsch. Z. Mund Kiefer Gesichtschir* 14: 395-400.
- Larsen MJ, Kirkegaard E, Fejerskov O, Poulsen S (1985a). Prevalence of dental fluorosis after fluoride gel treatments in a low- fluoride area. *J. Dent. Res.* 64: 1076-1079.

- Larsen MJ, Kirkegaard E, Poulsen S, Fejerskov O (1986). Enamel fluoride, dental f and dental caries among inmigrants and permanent residents of five Danish fluoride areas. *Caries Res.* 20: 349-355.
- Latham MC, Grech P (1967). The effects of excessive fluoride intake. *Am. J. Public. Health* 57: 651-660.
- Lewis H, Chikte U (1995). Prevalence and severity of fluorosis in the primary and permanent dentition using the TSIF. *J. Dent. Assoc. S. Afr.* 50: 467-471.
- López-Escámez JA, Cañizares FJ, Crespo PV, Campos A (1992a). Electron probe microanalysis of the otolithic membrane. A metodological and quantitative study. *Scanning Microsc.* 6: 765-772.
- López-Escámez JA, Crespo PV, Cañizares FJ, Campos A (1992b). Dependence between saccule and utricle in Ca and K concentrations determined by electron probe X-ray microanalysis. *Micron. and Microsc. Acta* 23: 367-368.
- López-Escámez JA, Crespo PV, Cañizares FJ, Campos A (1992c). Quantitative electron probe X-ray analysis of K and P in the gelatinous membrane of the vestibular receptor in the utricle. *Electron Microscopy* 1: 357-358.
- López-Escámez JA, Crespo PV, Cañizares FJ, Campos A (1993a). Standards for quantification of element in the otolithic membrane by electron probe x-ray microanalysis: calibration curves and electron beam sensitivity. *J. Microsc.* 171: 215-222.
- López-Escámez JA, Crespo PV, Cañizares FJ, Campos A (1993b). Quantitative histochemistry of phosphorus in the vestibular gelatinous membrane: an electron probe x-ray microanalytical study. *Histol. Histopathol.* 8: 113-118.
-

- López-Escámez JA, Crespo PV, Cañizares FJ, Sánchez-Quevedo MC, Campos A (1993c). Un método con microscopía electrónica analítica para la cuantificación de calcio en tejidos duros. *Patología* 26: 213-216.
- López-Escámez JA, Campos A (1994). Standards for x-ray microanalysis of calcified structures. *Scanning Microscopy*. 8:171-185.
- Lyaruu DM, Tros GH, Bronckers AL, Wbltgens JH (1990). Micro-PIXE (proton-induced x-ray emission) study of the effects of fluoride on mineral distribution patterns in enamel and dentin in the developing hamster tooth germ. *Scan. Microsc.* 4: 315-322.
- Lyman CE, Newbury DE, Goldstein JI, Williams DB, Roming AD, Armstrong JT, Echlin P, Fiori CE, Joy DC, Lifshin E, Peters KR (1990). Scanning electron microscopy, X-ray microanalysis and analytical electron microscopy: a laboratory workbook. *Plenum Press*. New York.
- Maciejewska I, Spodnik JH, Domaradzka-Pytel B, Sidor-Kaczmarek J, Bereznowski Z (2006). Fluoride alters type I collagen expression in the early stages of odontogenesis. *Folia Morphol.* 65: 359–366.
- Manji F, Baelum V, Fejerskov O, Gemert W (1986a). Enamel changes in two low- fluoride areas of Kenya. *Caries Res.* 20: 371-380.
- Manji F, Baelum V, Fejerskov O (1986b). Dental fluorosis in an area of Kenya with 2 ppm fluoride in the drinking water. *J. Dent. Res.* 65: 659-662.
- Mann J, Mahmoud W, Ernest M, Sgan-Cohen H, Shoshan N, Gedalia I (1990). Fluorosis and dental caries in 6-8-year-old children in a 5 ppm fluoride area. *Community Dent. Oral Epidemiol.* 18:77-79.
- Marín Camaches MD, Pacheco MF, Martínez GR, Gómez CE, Gutiérrez MC(1998). La fluoración de aguas en la región de Murcia. *Rev. Esp. Salud Pública* 72 (2).

- Mascarenhas AK (2000). Risk factors for dental fluorosis: a review of the recent literature. *Pediatr. Dent.* 22: 268-277.
- Matsuo S, Inai T, Kurisu K, Kiyomiya K, Kurebe M (1996). Influence of fluoride on secretory pathway of the secretory ameloblast in rat incisors tooth germs exposed to sodium fluoride. *Arch. Toxicol.* 70: 420-429.
- Mazarrasa Mowinckel O (1986). Fluorosis caused by mineral water in Spain. *Med. Clin. (Barc.)*.86: 781.
- McInnes P, Richardson B, Cleaton-Jones P (1982). Comparison of dental fluorosis and caries in primary teeth of preschool-children living in arid high and low fluoride villages. *Community Dent. Oral Epidemiol.* 10: 182-186.
- Milan AM, Waddington RJ, Embery G (2001). Fluoride alters casein kinase II and alkaline phosphatase activity in vitro with potential implications for dentine mineralization. *Arch. Oral Biol.* 46: 343-351.
- Milhaud GE, Charles E, Loubiere ML, Kolf-Clauw M, Joubert C (1992). Effects of fluoride on secretory and postsecretory phases of enamel formation in sheep molars. *Am. J. Vet. Res.* 53:1241–1247.
- Milsom K, Woodward M, Haran D, Lennon M (1996). Enamel defects in the deciduous dentition as a potential predictor of defects in the permanent dentition of 8 and 9 year old children in fluoridated Cheshire, England. *J. Dent. Res.*75: 1015-1018.
- Moller IJ (1965). Dental fluorose f caries. En oversigt over litteraturen samt nogle epidemiologiske undersøgelser af danske born. Thesis. *Rhodos International Sciene*, Copenhagen.

- Moller IJ, Pindborg JJ, Gedalia I, Roed- Petersen B (1970). The prevalence of dental fluorosis in the people of Uganda. *Arch. Oral Biol.* 15: 215-225.
- Morgan AJ (1979). Non-freezing techniques of preparing biological specimens for electron microprobe X-ray microanalysis. *Scan. Electron. Microsc.* 2: 635-648.
- Morgan AJ (1985). X-ray microanalysis in electron microscopy for biologist. *Royal Microscopical Society: handbook 5*. Oxford University Press. Oxford.
- Mosely H (1913). The high frequency spectra of elements. *Phil. Mag.* 26: 1024-1031.
- Mroginski LA, Sansberro PA, Scocchi AM, Luna C, Rey HY(2008). Cryopreservation protocol for immature zygotic embryos of species of *Ilex* (Aquifoliaceae). *Biocell.* 32: 33-39.
- Müller M, Moor H (1984). Cryofixation of thick specimens by high pressure freezing. En: *The science of biological specimen preparation for microscopy and microanalysis*. Revel JP, Barnard T, Haggis GH (eds.). SEM. Inc. AMF O'hare 131-138.
- Murray JJ, Rugg Gunn AJ, Jenkins GN (1991). Epidemiology and measurement of dental fluorosis. In: *Fluoride in caries prevention*. Oxford: Wright 222-261.
- Nelson DG (1990). Backscattered electron imaging of partially-demineralized enamel. *Scanning Microsc.* 4:31-41; discussion 42.
- Ng'ang'a PM, Øgaard B, Cruz R, Chindia ML, Aasrum E (1992). Tensile strength of orthodontic brackets bonded directly to fluorotic and non-fluorotic teeth: an in vitro comparative study. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* 102: 244-250.

- Ng'ang'a PM , Valderhaug J (1993). Prevalence and severity of dental fluorosis in primary schoolchildren in Nairobi, Kenya. *Community Dent. Oral Epidemiol.* 21: 15-18.
- Nieto, Oscar H. (2003). Microscopía Electrónica Analítica del Esmalte Humano afectado por fluorosis. Correlación clínico-histológica. Tesis Doctoral.
- Nikolishin AK, Borovskii EV, Poziukova EV (1989). The Ca and P content of various layers of human dental enamel in differing manifestations of fluorosis. *Stomatologija (Mosk)* 68: 21-24.
- Oh YH, Che ZM, Hong JC, Lee EJ, Lee SJ, Kim J (2005). Cryopreservation of human teeth for future organization of a tooth bank-- a preliminary study. *Cryobiology.* 51: 322-329.
- Opinya G, Valderhaug J, Birkeland J, Lokken P (1991). Fluorosis of deciduous teeth and first permanent molars in a rural Kenyan community. *Acta Odontol. Scand.* 49: 197-202.
- Osuji OO, Leake JL, Chipman ML, Nikiforuk G, Locker D, Levine N (1988). Risk factors for dental fluorosis in fluoridated community. *J.Dent. Res.* 67: 1488-1492.
- Panessa BJ (1983). Basic biological x-ray microanalysis. *Scan. Electron Microscopy* 4: 713-723.
- Pendrys DG (2000). Risk of enamel fluorosis in nonfluoridated and optimally fluoridated populations: considerations for the dental professional. *J. Am. Dent. Assoc.* 131: 746-55.
- Poulsen S, Moller IJ (1974). Gingivitis and dental plaque in relation to dental fluorosis in man in Morocco. *Arch. Oral Biol.* 19: 781-792.

- Richards A, Kragstrup J, Josephsen K, Fejerskov O (1986). Dental fluorosis developed in post secretory enamel. *J. Dent. Res.* 65: 1406-1409.
- Richards A, Fejerskov O, Baelum V (1989). Enamel fluoride in relation to severity of human dental fluorosis. *Adv. Dent. Res.* 3: 147-153.
- Rioboo García, R (2000). *Odontología Preventiva y Odontología Comunitaria*. Tomo I. Ediciones Avances.
- Robinson C, Connell S, Kirkham J, Brookes SJ, Shore RC, Smith AM (2004). The effect of fluoride on the Developing Tooth. *Caries Res.* 38: 268-276.
- Roholm K (1937) Fluoride intoxication, a clinical-hygienic study. *London; Lewis.*
- Rojas-Sánchez F, Alaminos M, Campos A, Rivera H, Sánchez- Quevedo MC (2007). Dentin in Severe Fluorosis: a Quantitative Histochemical Study. *J. Dent. Res.* 86: 857-861.
- Roomans GM (1979). Standards for X-ray microanalysis of biological specimens. *Scann. Electron Microsc.* II: 345-356.
- Roomans GM, Ceder O, Kollberg H (1981). Electrolyte redistribution in cystic fibrosis fibroblast studied by electron probe X-ray microanalysis. *Ultrastruct. Pathol.* 2: 53-58.
- Roomans GM (1988). Quantitative X-ray microanalysis of biological specimens. *J. Electron Microsc. Tech.* 9: 19-43.
- Roomans GM (1991). Cryopreparation of tissue for clinical application of X-ray microanalysis. *Scanning Microsc.* 5: 95-107.
- Russ JC (1980). Standarization technique for quantitative biological microanalysis. *Scann. Electron Microsc.* IV: 139-146.

- Sánchez-Quevedo MC, Crespo PV, Fernández-Segura E, Campos A (1987a). Analytic electron microscopy of the biomineralization of the epiphysis. *Cell Biol. Rev.* S2: 265.
- Sánchez-Quevedo MC, Crespo PV, Fernández-Segura E, Campos A (1987b). Estudio microanalítico de las regiones circumpulpar y del manto de la dentina. *Histol. Med.* 3: 139-144.
- Sánchez-Quevedo MC, Crespo PV, Fernández-Segura E, Campos A (1988). X-ray microanalytical and mapping histology of dental tissues. *Inst. Phys. Conf. Ser.* 93: 197-198.
- Sánchez-Quevedo MC, Nieto Albano OH, García JM, Campos A (1989). X-Ray microanalytical histochemistry of human circumpulpar and mantle dentine. *Bone Mineral.* 6: 323-329.
- Sánchez-Quevedo MC, Crespo PV, García JM, Campos A (1992). X-ray histochemistry of zinc in dental tissues. *European Archives of Biology* 103: 47-49.
- Sánchez-Quevedo MC, Nieto Albano OH, García JM, Gómez de Ferraris ME, Campos A (1998). Electron probe microanalysis of permanent human enamel and dentine. A methodological and quantitative study. *Histol. Histopathol.* 13: 109-113.
- Sánchez-Quevedo MC, Ceballos G, García JM, Rodríguez IA, Gómez de Ferraris ME, Campos A (2001a). Scanning electron microscopy and calcification in amelogenesis imperfecta in anterior and posterior human teeth. *Histol. Histopathol.* 16: 827-832.
- Sánchez-Quevedo MC, Ceballos G, García JM, Gómez de Ferraris ME, Rodríguez IA, Campos A (2001b). Quantitative analytical electron microscopy of calcium in hypomineralized amelogenesis imperfecta. *Scanning* 23: 152-153.

- Sánchez-Quevedo MC; Ceballos G, Rodríguez IA, García JM, Campos A (2001c). Quantitative X-ray microanalytical and histochemical patterns of calcium and phosphorus in enamel in human amelogenesis imperfecta. *International Journal of Developmental Biology* 45: 115-116.
- Sánchez-Quevedo MC, Ceballos G, García JM, Luna JD, Rodríguez JA, Campos A (2004). Dentine structure and mineralization in hypocalcified amelogenesis imperfecta: a quantitative x-ray histochemical study. *Oral Dis.* 10: 94-98.
- Sánchez-Quevedo MC, Carda C, Gómez S, Suárez D, Peydró A, García JM (2005). Backscattered electron imaging and quantitative electron probe X-ray microanalysis of regenerated bone. A quality control approach. *Histol.Histopathol.* 1: 46-48.
- Sánchez-Quevedo MC, Ceballos G, Rodríguez IA, García JM, Alaminos M (2006). Acid-etching effects in hypomineralized amelogenesis imperfecta. A microscopic and microanalytical study. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal* 11: 40-43.
- Sánchez-Quevedo MC, Moreu G, García JM, Campos A (2007). GTR & electron microprobe analysis. *European Journal of Dentistry* 1: 27-31.
- Seveus L (1980). Cryoultramicrotomy as a preparation method for X-ray microanalysis. *Scan. Electron Microsc.* 4: 161-170.
- Shearer TR, Kolstad DL, Suttie JW (1978). Electron probe microanalysis of fluorotic bovine teeth. *Am. J. Vet. Res.* 39: 1393-1398.
- Shinoda H, Ogura H (1982). Experimental studies on the ultrastructure and chemical composition of enamel in dental fluorosis. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 80: 209-220.

- Shinoda H (1983). Effects of long-term administration of fluoride on the enamel formation in rats. In: Suga S (ed.) Mechanisms of tooth enamel formation. *Quintessence*, Tokyo 273–284.
- Small JA, Heinrich KFJ, Newbury DE, Myklebust RL (1979). Progress in the development of the peak-to-background method for the quantitative analysis of single particles with the electron probe. *Scan. Electron Microsc. II*: 807-816.
- Statham PJ, Pawley JB (1978). A new method for particle x-ray microanalysis on peak to background measurements. *Scan. Electron Microsc. I*: 469-478.
- Statham PJ (1979). Measurements and use of peak-to-background-ratio in X-ray microanalysis to biological specimens. *Mikrochim. Acta (Viena)* 8: 229-242.
- Suckling G, Thurley DC (1984) Histological, macroscopic and microhardness observations of fluoride-induced changes in the enamel organ and enamel of sheep incisor teeth. *Arch. Oral Biol.* 29: 165–177.
- Suckling G, Thurley DC, Nelson DG (1988). The macroscopic and scanning electron-microscopic appearance and microhardness of the enamel, and the related histological changes in the enamel organ of erupting sheep incisors resulting from a prolonged low daily dose of fluoride. *Arch. Oral Biol.* 33: 361-373.
- Suckling G, Nelson DG, Patel MJ (1989). Macroscopic and scanning electron microscopic appearance and hardness values of developmental defects in human permanent tooth enamel. *Adv. Dent. Res.* 3: 219-233.
- Susheela A, Bhatnagar M (1993). Fluoride toxicity: abiochemical and scanning electron microscopic study of enamel surface of rabbit teeth. *Arch. Toxicol.* 67: 573-579.

- Susheela A, Bhatnagar M, Gnanasundram N, Saraswathy TR (1999). Structural aberrations in fluorosed human teeth: biochemical and scanning electron microscopic studies. *Curr. Sci.* 77: 1677-1681.
- Takagi Y, Fujita H, Katano H, Shimokawa H, Kuroda T (1998). Immunochemical and biochemical characteristics of enamel proteins in hypocalcified amelogenesis imperfecta. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 85: 424-430.
- Thylstrup A, Fejerskov O (1978). Clinical appearance of dental fluorosis in permanent teeth in relation to histologic changes. *Community Dent. Oral Epidemiol.* 6: 315-328.
- Thylstrup A (1978). Distribution of dental fluorosis in the primary dentition. *Community Dent. Oral Epidemiol.* 6: 329-337.
- Thylstrup A, Fejerskov O (1979). A scanning electron microscopic and microradiographic study of pits in fluorosed human enamel. *Scand. J. Dent. Res.* 87: 105–114.
- Tratman EK (1940). Mottled enamel as evidence of endemic fluorosis in the Sabak area of the Sg Bernam, Kuala Selenger. *J Malaya Branch, Br. Med. Assoc.* 4: 181-183.
- Vieira A, Hanncock R, Dumitriu M, Schwartz M, Limeback H, Grynpas M (2005). How does fluoride affect dentin microhardness and mineralization? *J. Dent. Res.* 84: 951-957.
- Vieira APGF, Hanncock R, Dumitriu M, Limeback H, Grynpas MD (2006). Fluoride's effect on human dentin ultrasound velocity (elastic modulus) and tubule size. *Eur. J. Oral Sci.* 114: 83-88.
- Ware CB, Baran SW (2007). A controlled-cooling protocol for cryopreservation of human and non-human primate embryonic stem cells. *Methods Mol. Biol.* 407: 43-49.

- Warley A (1990). Standards for the application of X-ray microanalysis to biological specimens. *J. Microsc.* 157: 135-147.
- Warley A, Gupta BL (1991). Quantitative biological x-ray microanalysis. pp 243-281, en J.R. Harris, ed. *Electron Microscopy of Tissues, Cells and Organelles: A Practical Approach*. IRL Oxford University Press, Oxford.
- Warley A (1993). Quantitative X-ray microanalysis of thin sections in biology: appraisal and interpretation of results. pp: 47-57, en: Sigee DC, Morgan AJ, Summer AT, Warley A. Eds. *X-ray microanalysis in biology. Experimental techniques and applications*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Warley A, Cracknell KPB, Cammish HB, Twort CHC, Ward JPT, Hirst SJ (1994). Preparation of cultured airway smooth muscle for study of intracellular element concentration by X-ray microanalysis: comparison of whole cells with cryosections. *J. Microsc.*175: 143-153.
- Warley A (1997). *X-Ray microanalysis for biologists*. Portland Press, London, UK.
- Wöltgens JH, Lyaruu DM, Bronckers AL, Bervoets TJ, Van Duin M (1995). Biomineralization during early stages of the developing tooth in vitro with special reference to secretory stage of amelogenesis. *Int. J. Dev. Biol.*39: 203-212.
- Yanagisawa T, Takuma S, Tohda H, Fejerskov O, Fearnhead RW (1989). High resolution electron microscopy of enamel crystals in cases of human dental fluorosis. *J. Electron Microsc.* (Tokyo) 38: 441-448.
- Zs-Nagy I (1983). Energy dispersive X ray microanalysis of biological bulk specimens: a review of the method and its application to experimental gerontology and cancer research. *Scan. Electron Microsc.* III: 1255-1268.