

**DESARROLLO DE UNA HERRAMIENTA VIRTUAL PARA ENSEÑAR LOS ASPECTOS
MOLECULARES/EMBRIOLÓGICOS QUE FAVORECEN LA APARICIÓN DE LOS SIGNOS
CLÍNICOS DE FLUOROSIS DENTAL.**

**AMADO ARROYAVE SERGIO DAVID
PINZÓN ESTUPIÑAN CINDY CATHERINE**

**UNIVERSIDAD EL BOSQUE
PROGRAMA DE ODONTOLOGÍA - FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
BOGOTÁ DC - NOVIEMBRE 2018**

HOJA DE IDENTIFICACIÓN

Universidad	El Bosque
Facultad	Odontología
Programa	Odontología
Título	Desarrollo de una herramienta virtual para enseñar los aspectos moleculares/embriológicos que favorecen la aparición de los signos clínicos de Fluorosis dental.
Grupo de investigación	Unidad de Investigación en Caries- UNICA
Línea de investigación	Defectos del desarrollo del esmalte
Institución participante	Facultad de Odontología - Universidad El Bosque Unidad de Investigación en Caries- UNICA
Tipo de investigación	Pregrado
Estado	PROTOCOLO
Estudiantes/ residentes	Amado Arroyave Sergio David Pinzón Estupiñan Cindy Catherine
Asesor metodológico	Dr. Luis Fernando Gamboa
Asesor temático	Dra. Stefania Martignon Dr. Edgar Beltrán Dr. Wilson Mejía
Asesor estadístico	Dr. Luis Fernando Gamboa

DIRECTIVOS UNIVERSIDAD EL BOSQUE

HERNANDO MATIZ CAMACHO	Presidente del Claustro
JUAN CARLOS LOPEZ TRUJILLO	Presidente Consejo Directivo
MARIA CLARA RANGEL G.	Rector(a)
RITA CECILIA PLATA DE SILVA	Vicerrector(a) Académico
FRANCISCO FALLA	Vicerrector Administrativo
MIGUEL OTERO CADENA	Vicerrectoría de Investigaciones.
LUIS ARTURO RODRÍGUEZ	Secretario General
JUAN CARLOS SANCHEZ PARIS	División Postgrados
MARIA ROSA BUENAHORA	Decana Facultad de Odontología
MARTHA LILILIANA GOMEZ RANGEL	Secretaria Académica
DIANA ESCOBAR	Directora Área Bioclínica
MARIA CLARA GONZÁLEZ	Director Área comunitaria
FRANCISCO PEREIRA	Coordinador Área Psicosocial
INGRID ISABEL MORA DIAZ	Coordinador de Investigaciones Facultad de Odontología
IVAN ARMANDO SANTACRUZ CHAVES	Coordinador Postgrados Facultad de Odontología

“La Universidad El Bosque, no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”.

GUÍA DE CONTENIDO

Resumen

Abstract

	Pág.
1. Introducción	1
2. Marco teórico	2
3. Planteamiento del problema	7
4. Justificación	9
5. Objetivos	11
Objetivo general	11
Objetivos específicos	11
6. Metodología del Proyecto	12
Tipo de estudio	12
Población y muestra	12
7. Consideraciones éticas.	14
8. Resultados y discusión	15
9. Conclusiones	23
10. Tablas	24
11. Referencias bibliográficas	27

RESUMEN

DESARROLLO DE UNA HERRAMIENTA VIRTUAL PARA ENSEÑAR LOS ASPECTOS MOLECULARES/EMBRIOLÓGICOS QUE FAVORECEN LA APARICIÓN DE LOS SIGNOS CLÍNICOS DE FLUOROSIS DENTAL.

Antecedentes: La fluorosis dental es un defecto del desarrollo del esmalte tipo hipomineralización causado por la ingesta de fluoruro por encima del nivel óptimo de 2,9 -3,2 mg/día durante la formación dental. La evidencia sugiere que excesivos niveles de fluoruro pueden interferir con la formación dental y ocasionar defectos del esmalte como la fluorosis. A pesar de estas descripciones presentadas que relacionan de una manera dosis dependiente la ingesta de fluoruro bajo diferentes mecanismos, algunos mecanismos moleculares continúan siendo ampliamente desconocidos. Además, estos conceptos no han sido difundidos de manera efectiva entre los estudiantes de odontología, razón por la cual el vacío en el conocimiento de esta área es muy grande. **Objetivo:** Desarrollar una herramienta virtual para enseñar los aspectos moleculares/embriológicos que favorecen la aparición de los signos clínicos de Fluorosis dental. **Materiales y Métodos:** Estudio multietápico, fase 1: Revisión de la literatura; fase 2: Correlación clínico-teórico y fase 3: Investigación tecnológica. **Resultados y Discucion:** En esta parte, se ha venido trabajando con la parte de correlación clínico-teórico, el cual se han ido buscando imágenes que permitan explicar las diferentes clasificaciones de la fluorosis dental (Tabla 1). También se ha descrito el Índice de Thilstrup & Fejerskov, ya que evalúa la fluorosis dental en todos sus niveles de gravedad correlacionando características clínicas con las histológicas del esmalte afectado. En la parte clínica de acuerdo a la determinación de gravedad y severidad de la lesión determinará el tipo de tratamiento a realizar (Tabla 2). En este punto del proyecto de grado, se plasmó un diseño en PowerPoint donde se explican todos los procesos embriológicos desde la fecundación hasta la formación del diente, de una forma detallada y por medio de imágenes histológicas permitiendo así la explicación y asimilación de la información de una forma más sencilla y didáctica tanto para los estudiantes como para los docentes interesados en el tema.

Palabras claves: fluoruro, fluorosis, flúor, defectos del desarrollo del esmalte, enfermedades sistémicas, toxicidad.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF A VISUAL TOOL FOR INSTRUCTION OF MOLECULAR AND EMBRYOLOGIC ASPECTS WHICH FAVOUR THE APPARITION OF CLINICAL SIGNS OF DENTAL FLUOROSIS

Background: Dental fluorosis is a hypo-mineralisation-type defect of the enamel's development caused by an above-normal fluoride ingestion of the optimal level of 2.9 mg/day to 3.2 mg/day during dental formation. Evidence suggests that excessive fluoride levels may interfere with dental formation and cause enamel defects such as fluorosis. Some molecular mechanisms are still unknown even though there are descriptions which relate ingest-dependant dosage with different mechanisms. Additionally, these concepts have not been disseminated effectively among the dentistry student population, reason why the void is large regarding the knowledge of such area. **Objective:** to develop a virtual tool for instruction regarding the molecular and embryological aspects which favour the development of clinical signs of fluorosis. **Materials and methods:** Multiphase study; phase one: literature revision. Phase two: clinical-theoretical relation. Phase three: technological research. **Results and discussion:** This part has included work in the clinical-theoretical relation and images which may explain the different classifications have been researched (Table 1). Thilstrup & Fejerskov's index has also been described because it evaluates dental fluorosis in all its levels relating clinical and histological characteristics of the affected enamel. The treatment to be carried out will be determined during the clinical part depending on gravity and severity (Table 2). A PowerPoint design was developed during this stage of the graduate project in which the processes from fertilisation to tooth development are explained in a detailed manner with histological images, allowing assimilation of information in a simpler and didactic way for students and teachers interested in the topic.

Key words: fluoride, fluorosis, fluoride, enamel development defects, systemic diseases, toxicity.

Introducción

La fluorosis dental es un defecto del desarrollo del esmalte tipo hipomineralización causado por la ingesta de fluoruro por encima del nivel óptimo de 2,9 -3,2 mg/día durante la formación dental. Sin embargo, el uso de fluoruros juega un papel muy importante en la prevención y control de la caries dental, razón por la cual su uso se ha indicado a nivel individual y en las poblaciones como una estrategia en salud pública (Guía de Fluorosis Dental de Colombiana De Salud S.A, 2012).

La evidencia sugiere que excesivos niveles de fluoruro pueden interferir con la formación dental y ocasionar defectos del esmalte como la fluorosis (Chen 2006; Kubota 2005). La cantidad de fluoruro que se ingiere puede variar de 0.1mg en el caso de cremas dentales o enjuagues y más de 20 mg en el caso de geles fluorados aplicados por un profesional (Barnhart 1974; Ekstrand 1987; Lecompte 1987). Como resultado se generan afecciones que van desde estéticas, las cuales en principio son representan un problema en salud pública, pero pueden afectar el aspecto psicológico de una persona.

Marco teórico

La biomineralización del esmalte es un proceso que involucra proliferación celular y diferenciación a través de interacciones epitelio-mesenquimales secuenciales, secreción de proteínas de matriz, transporte de iones calcio y fluoruro, precipitación y alineamiento de cristales de esmalte a través de interacciones múltiples entre moléculas orgánicas e inorgánicas (Aoba and Moreno, 1987; Moreno and Aoba, 1987).

Algunas de las proteínas involucradas en la formación del esmalte son amelogeninas, ameloblastina, tuftelina, proteínas sulfatadas de alto peso molecular y enamulina (Simmer and Fincham, 1995; Fincham et al., 1999).

Las amelogeninas son los productos génicos mayoritarios de los ameloblastos, comprenden más del 90% de las proteínas secretadas por esas células. Se sugiere que las proteínas extracelulares del esmalte son degradadas por una gran diversidad de proteasas presentes dentro del esmalte en estadios específicos en el desarrollo (Zeichner-David et al., 1995; Bartlett and Simmer, 1999).

La enamelinina es secretada por los ameloblastos que se desarrollan del proceso de Tomes y se localiza de manera subyacente con las amelogeninas y otras proteínas de matriz (Fukae et al., 1998). El patrón de corte de la enamulina es óptimo a pH neutro (alrededor de 7.2) y alta concentración de iones calcio (Fukae et al., 1998). En contraste a la enamelinina, la actividad enzimática de EMSP1 es baja o ausente durante etapas tempranas del desarrollo del esmalte y se sobrerregula durante etapas tardías (Hu et al., 2000). Esto sugiere que EMSP1 juega un papel importante en la degradación de proteínas de la matriz de esmalte durante la transición a la etapa de maduración de los ameloblastos. Además, las exopeptidasas, endopeptidasas e inhibidores de proteinasas participan en la maduración del esmalte (Smid et al., 1990; Toyosawa et al., 1996) aunque sus papeles y significancia funcional no se conocen completamente.

Procesamiento enzimático post-secretor de proteínas de matriz del esmalte

El hallazgo más distintivo de amelogénesis, en contraste a la dentinogénesis y osteogénesis, es que las proteínas de matriz secretoria del esmalte deben ser degradadas in situ y removidas casi completamente del tejido durante la etapa secretoria a través de las etapas de maduración. La población heterogénea resultante de los productos de clivaje proteolítico permanece relativamente estable durante la formación del grosor del esmalte completo (Aoba et al., 1987b; Brookes et al., 1995). Después de que termina la secreción de proteínas de matriz, sus productos se clivan. Esto permite que la capa de esmalte alcance su alto grado de mineralización previo a la erupción dental. Este parece ser llevado a cabo por clases separadas de proteasas como la enamelisina y EMSP1, las cuales podrían tener funciones sobrelapantes.

El procesamiento post secretorio de las amelogeninas ocurre de la siguiente manera:

1. Las amelogeninas tienen segmentos hidrofóbicos e hidrofílicos en las regiones terminales N y C respectivamente (Aoba et al., 1992; Brookes et al., 1994).
2. El segmento hidrofóbico en la región C expone una fase líquida externa (Lau et al., 1987; Aoba et al., 1990)
3. En el segmento hidrofílico ocurre el clivaje inicial de la amelogenina por proteasas (Aoba et al., 1991)
4. Finalmente el producto es degradado, ya que la amelogenina carece de la región terminal C (Aoba et al., 1992; Brookes et al., 1994).

Captación de fluoruro (F⁻) en el esmalte en desarrollo.

El flúor pertenece al grupo de los halógenos con un número atómico de 9. Su electronegatividad es su principal característica que lo predispone a combinarse con otros elementos (Gómez et al., 2002) que se puede incorporar a los sitios reticulares de los cristales de hidroxiapatita en formación tanto del esmalte como de la dentina (Elliott, 1994); una vez se completa la formación del diente, la absorción de fluoruro es despreciable durante las primeras etapas de formación (Weatherell et al., 1975).

La captación de fluoruro es independiente de la captación de calcio el cual no es controlado por los ameloblastos (Aoba y Moreno, 1987). En el fluido del esmalte la concentración de fluoruro está en el rango de 10^{-6} mol / L. Los niveles de flúor en el esmalte en desarrollo están directamente relacionados con los niveles de fluoruro en plasma (Speirs, 1986). A fecha, no ha habido evidencia sólida de la unión del flúor con proteínas, excepto en el espacio extracelular (Lussi et al., 1988).

La mayor parte del fluoruro transportado en formas iónicas puede ser fácilmente incorporado a los cristales de esmalte en crecimiento. El exceso de fluoruro se precipita a la estructura en formación y ejerce una función inhibitoria con las proteínas de matriz (Speirs, 1986).

El fluoruro tiene propiedades únicas como regulador de la proliferación y el crecimiento de sales de fosfato de calcio in vivo (Aoba, 1997). Este ion sustituye con gran avidez los grupos hidroxilos de la estructura de la apatita, generando a una reducción del volumen del cristal (Elliot, 1994) y un incremento concomitante en la estabilidad química y estructural (o disminuyendo la solubilidad termodinámica) de los cristales de apatita resultantes (Moreno et al., 1974; Margolis and Moreno, 1990; Johnsson and Nancollas, 1992). Para cada fase de fosfato de calcio, el grado de saturación se puede expresar como el radio del producto de actividad iónico de la red de constituyentes en solución al producto de solubilidad del sólido. Así el fluoruro actúa como un acelerador de la precipitación de la apatita por el efecto de disminución de los valores de solubilidad, dependiendo de la incorporación del fluoruro en los cristales de apatita en precipitación (Varughese and Moreno, 1981).

La severidad de la fluorosis aparentemente es por la exposición prolongada a bajas dosis de fluoruro durante la fase de formación y maduración (Larsen et al., 1986; Suckling et al., 1988; Richards, 1990). Las alteraciones por hipomineralización del esmalte fluorótico se deben a efectos in situ del fluoruro ingerido en el medio ambiente local. El esmalte fluorótico retiene relativamente mayor proporción de proteínas de matriz inmaduras con alto contenido de prolina, soportando la idea de que una incompleta remoción de amelogeninas bajo la ingesta excesiva de fluoruro durante el desarrollo favorece la

fluorosis. Adicionalmente parece que la inhibición de la degradación enzimática de amelogenina, podría retardar su remoción del esmalte en desarrollo y su impacto en el crecimiento del cristal. Se han propuesto varias explicaciones acerca de la retención de fragmentos derivados de amelogeninas debido a la presencia de fluoruro en el esmalte maduro (DenBesten and Crenshaw, 1984; Eastoe and Fejerskov, 1984)

- (i) Eventos intracelulares, entre los cuales se incluyen: expresión génica, síntesis, tráfico y secreción de proteínas, resorción y degradación de los productos proteicos una vez secretados
- (ii) Eventos extracelulares que constituyen interacciones multivariadas entre proteínas de matriz, proteasas, cristales, y otros constituyentes de fluidos de matriz mineralizante, particularmente los iones fluoruro y calcio.

Efectos dosis-dependientes del fluoruro: eventos intracelulares

El fluoruro a nivel milimolar en medio acuoso afecta múltiples actividades enzimáticas en el citoplasma de diversos tipos celulares, como la inhibición de la enzima lactado deshidrogenasa o activando la adenilato ciclasa (Hodge and Smith, 1965). Sin embargo la relevancia de estos hallazgos como efectos en dosis crónicas bajas de fluoruro es cuestionable, ya que no hay evidencia de que estos niveles de fluoruro alteren las actividades enzimáticas in vivo (Kaminsky et al., 1990).

Hay poca información de los efectos dosis-dependientes del fluoruro sobre la proliferación y diferenciación de las células epiteliales del órgano del esmalte o de la vía de transducción de señales desencadenadas por el fluoruro.

Los dos posibles modelos de afección de las vías de señalización por fluoruro incluyen:

1. Inhibición de una única fosfotirosin fosfatasa en osteoblastos, lo cual resulta en un incremento sostenido del nivel de fosforilación de la tirosina de proteínas de señalización clave de la vía de transducción de señales activadas por mitógenos (MAPK) (Lau and Baylink, 1998).

2. El fluoruro actúa con el aluminio para formar fluoruro aluminado (AlF_4) el cual activa una proteína G en membrana celular ósea, esto conduce a la activación de tirosin kinasas citoplasmáticas como Src, Pyk2 y Fak, que estimula la fosforilación de tirosinas y proteínas de señalización involucradas en la vía MAPK (Caverzasio et al., 1998; Susa, 1999).

Al respecto se ha observado que en los ameloblastos secretores, el tratamiento con NaF⁻ (Fluoruro de sodio), favorece su unión a las membranas del retículo endoplásmico rugoso y Golgi bloqueando el tráfico de proteínas del retículo endoplásmico al aparato de Golgi, favoreciendo la desorganización del aparato de Golgi y la acumulación de vesículas de transporte, indicando un posible disturbio en el tráfico intracelular de estas células (el agua suministrada en agua fue de 100 ppm F o una inyección simple de 2% NaF). Sin embargo no es claro si estos niveles milimolares pueden afectar las células bajo condiciones fisiológicas humanas (Matsuo et al., 1998).

A pesar de estas descripciones presentadas que relacionan de una manera dosis dependiente la ingesta de fluoruro bajo diferentes mecanismos, algunos mecanismos moleculares continúan siendo ampliamente desconocidos. Además, estos conceptos no han sido difundidos de manera efectiva entre los estudiantes de odontología, razón por la cual el vacío en el conocimiento de esta área es muy grande. Por tal razón en el presente trabajo nos propusimos evaluar los aspectos moleculares del metabolismo del fluoruro que se administra de manera tópica y sistémica y que favorecen su incorporación masiva a las estructuras tisulares blandas y duras en formación.

Planteamiento del problema

La fluorosis dental se conoce como un defecto del desarrollo del esmalte tipo hipomineralización que ocurre por la ingesta excesiva de fluoruro durante la formación dental. Dando como resultado cambios en la estructura y apariencia de los dientes, y su severidad es variable, pues depende de la cronicidad y la concentración de la ingesta de este elemento (Bronckers et al., 2009; DenBesten and Li, 2011).

Investigaciones recientes han propuesto que el desarrollo de la fluorosis tiene un componente genético importante (Jiang et al., 2015; Jiao et al., 2013; Wen et al., 2012). Entre los genes involucrados se pueden mencionar: el receptor de estrógeno (Ba et al., 2009; Ba et al., 2011), el receptor de la calcitonina (Jiang et al., 2015), de ameloblastina (Jiao et al., 2013) y de mieloperoxidasa (Zhang et al., 2013), principalmente en poblaciones de áreas endémicas de fluorosis.

Además, se sabe que el fluoruro se incorpora a la estructura de los dientes en formación e inhibe la remoción de algunas proteínas; de esta manera estas quedan atrapadas en la matriz del esmalte que se está calcificando, y ocasionan cambios en su arquitectura (DenBesten et al., 2002; DenBesten, 1986).

Al respecto, se ha reportado que bajo condiciones fisiológicas, genes codificantes para metaloproteinasas de matriz (MMPs) e inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs), también participan en la formación de los tejidos dentales y que favorecen la histomorfogénesis y en la citodiferenciación. El exceso de fluoruro puede perturbar el balance de MMP/TIMP, lo cual conduce a un retardo en la hidrólisis y remoción de las amelogeninas y en la mineralización del esmalte y de esta forma favorece la presencia de FD (Hannas et al., 2007; Yoshida et al., 2003).

Por otro lado, el exceso de fluoruro no solo afecta la formación dental, además otros órganos pueden verse alterados por esta razón, sin embargo, los mecanismos que favorecen esta situación continúan siendo desconocidos. Al respecto, en algunas partes del mundo se han encontrado frecuentemente variantes genéticas en las regiones codificantes

para los factores de transcripción DLX1 (Distal-Less Homeobox 1) y DLX2 (Distal-Less Homeobox 2), y se han asociado con las formas más severas de DF en la población. Durante la fase secretoria de la amelogénesis, DLX2 es silenciada transitoriamente y la expresión de DLX1 se sobre regula, controlando la formación del esmalte induciendo de una sobreproducción de amelogenina en los ameloblastos.

Este comportamiento génico se ha asociado a afecciones en el desarrollo y función de diferentes órganos y tejidos, por esta razón se ha generado un debate adicional por la administración de fluoruro en agua y alimentos, así como también en su aplicación como medida preventiva para la caries dental. Sin embargo para todos los aspectos planteados anteriormente, no hay soporte ni evidencias concluyentes.

En conjunto los aspectos planteados dejan en evidencia el amplio desconocimiento de algunos aspectos moleculares que se relacionan con patologías inducidas en la formación de las estructuras mineralizadas como las dentales y otros tejidos duros y blandos, para ayudar a afrontar y responder con propiedad los mitos y realidades tejidos alrededor del efecto de fluoruros sobre los tejidos humanos.

Por tal razón en este trabajo proponemos desarrollar una herramienta virtual que permita comprender y enseñar los aspectos moleculares que favorecen desde las etapas embriológicas a la aparición de los signos clínicos de Fluorosis, en diferentes niveles:

- Defectos en el desarrollo del esmalte dental y defectos en el desarrollo de otros tejidos.
- Sesiones teóricas y de discusión.
- Establecimiento de correlación clínica en la cual se identifiquen y diagnostiquen manera adecuada las lesiones de fluorosis en teoría (revisiones bibliográficas) y práctica.

Generar una conciencia crítica al respecto del efecto potencial de fluoruros a nivel de cavidad oral y sistémica.

Justificación

Diferentes debates han suscitado la necesidad de argumentos robustos acerca de la aceptación del impacto de la administración de fluoruros tópicos o sistémicos en la formación de las estructuras mineralizadas orales tales como el esmalte dental y otros tejidos duros y blandos humanos.

En gran parte, estos debates se han generado debido a que algunos reportes de la literatura han propuesto que la administración de fluoruro en agua o sal de mesa, se incorporan a diferentes estructuras tisulares en formación, induciendo a la formación de defectos del desarrollo de múltiples estructuras, incluso vitales para la fisiología humana (Álvarez et al., 2009; Martignon et al., 2017).

Al respecto, por ejemplo, se ha asegurado que la ingesta de agua con altos contenidos de fluoruro en los periodos embrionarios causa efectos tóxicos en diferentes tejidos y que en consecuencia, su administración por parte de odontólogos como medida preventiva para la caries deba ser manejada con un sentido más crítico y justificado con evidencia científica comprobada (Christie DP, 1980).

Sin embargo, el fluoruro ha sido incorporado a diferentes vehículos sistémicos tales como agua, sal, azúcar, leche y suplementos de uso tópico como pastas dentales, geles, enjuagues orales y barnices (Cardozo, 2015). Por tales razones se puede inferir que el organismo humano está amplia y constantemente expuesto a fluoruros (Buzalaf et al., 2013).

En consecuencia, niveles intermedios y altos fluoruros se ha relacionado con defectos en el desarrollo dental como la fluorosis y también alteraciones esqueléticas (DeBesten et al., 2013), razón por la cual es sumamente importante conocer los efectos biológicos de su uso a nivel tisular.

Por tales razones, son pertinentes estudios que permitan conocer los aspectos metabólicos del fluoruro en Odontología y su efecto potencial sobre los tejidos en formación, dosis tóxicas y efectividad de la administración, generando análisis exhaustivos que permitan asociar/descartar las relaciones reales con patologías dentales y sistémicas. Todo esto en el

marco de la formación de la comunidad universitaria pues hoy en día un número creciente de estudiantes y profesionales que ejercen la profesión de Odontología y de ellos se espera que su formación en los aspectos moleculares que expliquen el desarrollo de patologías, sea óptimo.

Entonces nos hemos planteado consolidar una línea de investigación en defectos en el desarrollo del esmalte en la cual participen Docentes y estudiantes para favorecer al fortalecimiento de diferentes aspectos teóricos químicos, biológicos y fisiológicos del flúor y el fluoruro, y relacionarlos con eventos embriológicos ocurridos durante la formación fetal y dental. Y por otro lado pretendemos incorporar todos estos conocimientos para el beneficio clínico de nuestros estudiantes, para que puedan identificar las lesiones ocasionadas por el fluoruro y además establecer correctos diagnósticos diferenciales, lo cual en conjunto tendría una repercusión importante a la hora de plantear planes de tratamiento en sus pacientes.

Se espera que, a través del establecimiento de plataformas virtuales, este conocimiento generado en gran parte por los estudiantes mediante búsquedas en la literatura, pueda ser multiplicado y divulgado a otros estudiantes y otras generaciones, pues sería un producto de pertenencia del grupo de investigación y por supuesto de la Universidad El Bosque.

De esta manera se busca favorecer la postura crítica frente al efecto del fluoruro y demás compuestos fluorados, en los siguientes niveles:

- Entendimiento de manera crítica los aspectos moleculares que afectan el desarrollo del esmalte dental y otros tejidos debido a la poca, mediana y alta incorporación de flúor/fluoruro.
- Establecimiento de la correlación entre los aspectos moleculares evaluados y la aparición clínica de lesiones asociadas al flúor en dientes e incluso conocer otras de interés sistémico de importancia en los estudiantes de pregrado.

Establecer las formas adecuadas de identificar y diagnosticar lesiones de fluorosis y otras malformaciones debido al flúor/fluoruro.

Objetivos

Objetivo general

Desarrollar una herramienta virtual para enseñar los aspectos moleculares/embriológicos que favorecen la aparición de los signos clínicos de Fluorosis dental.

Objetivos específicos del proyecto

- Fortalecer y estimular el conocimiento de los eventos moleculares/embriológicos que favorecen la incorporación de fluoruro a las estructuras dentales en formación.
- Correlacionar los eventos moleculares con la identificación de signos clínicos de fluorosis y establecer el diagnóstico diferencial.
- Diseñar e implementar una herramienta virtual para enseñar la integración de los aspectos moleculares (teóricos)/embriológicos y clínicos involucrados en la etiopatogenia de la Fluorosis.

Metodología del proyecto

Tipo de estudio: Estudio multietápico

- Fase 1: Revisión de la literatura
- Fase 2: Correlación clínico-teórico
- Fase 3: Investigación tecnológica

Población y muestra

- **FASE 1: Revisión de la literatura:** Se realizarán sesiones en las cuales se enseñe a los estudiantes a realizar búsquedas dinámicas en el área de interés en PUBMED que incluyan las palabras: (Fluorosis, Fluorine, Fluoride, Enamel Development Defect, Systemic Disease, Toxicity). Posteriormente se aplicarán los siguientes criterios de inclusión (Artículos en inglés y español, Hasta diez años a partir de la fecha de publicación, Artículos en texto completo en PDF, Ensayos in vitro e in vivo). En cada una de las sesiones se realizarán exposiciones por parte de los estudiantes dando a conocer lo investigado con anterioridad permitiendo generar el espacio para desarrollar habilidades investigativas y a la vez reunir la información necesaria para el desarrollo de la herramienta virtual. Los estudiantes utilizarán diferentes implementos de uso de oficina y didácticos para intentar plasmar los diferentes procesos que permitan ser representados y producidos como material base de la herramienta virtual. A la vez se realizarán controles de lectura, exámenes teóricos entre otros.
- **FASE 2: Correlación clínico-teórico:** Se obtendrán dientes para realizar prácticas a partir del banco de dientes de UNICA para poder observar diferentes grados de fluorosis y de cómo se puede ver en diferentes dientes y a la vez realizar diagnóstico diferencial con defectos del desarrollo del esmalte, razón por la cual se deberán obtener los materiales para su mantenimiento, en condiciones ideales.
- **FASE 3: Investigación tecnológica:** Una vez se tenga el insumo suficiente tanto de material teórico como representaciones en 3D se procederá a producir una herramienta virtual con ayuda de personal capacitada en diseño e ingeniería de sistemas para realizar dicha herramienta y así poder enseñar y mostrar a

estudiantes de pregrado y posgrado, docentes y personas interesadas sobre aspectos moleculares y embriológicos que favorecen a la aparición de los signos clínicos de Fluorosis dental. Inicialmente se plasmara una idea en PowerPoint sobre cada uno de los aspectos a tratar por medio de imágenes, mapas conceptuales, cuadros, entre otros que ayuden a explicar los eventos pero de una manera fácil y clara con evidencia científica. Posteriormente se contratará personas expertas en la producción de esta herramienta virtual, el cual la Universidad El Bosque cuenta con estudiantes de diseño e ingeniería de sistemas, donde se contara con ellos para la elaboración de dicha herramienta virtual, los cuales serán guiados por los estudiantes a cargo del trabajo y los tutores correspondientes. Finalmente se realizará la evaluación pertinente de la efectividad mediante la revisión del mismo y la evaluación mediante encuestas de los aspectos que se incluyeron en la ayuda virtual tanto a estudiantes como docentes de la Universidad El Bosque.

Consideraciones éticas

De acuerdo a la resolución N° 8430 de 1993 que establece las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en humanos y el Artículo 11, este estudio se clasifica como "investigación sin riesgo", lo cual corresponde a: "Estudios que emplean técnicas y métodos de investigación documental retrospectivos y aquellos en los que no se realiza ninguna intervención o modificación intencionada de las variables biológicas, fisiológicas, psicológicas o sociales en individuos, entre los que se consideran: revisión de historias clínicas, entrevistas, cuestionarios, revisiones de literatura, entre otros.

El presente protocolo propone obtener información a través de bases de datos, artículos originales y revisiones de literatura seguimiento del paciente sin ninguna intervención, ni modificación a su tratamiento médico establecido, por lo cual se considera investigación sin riesgo. El resultado de los cultivos será informado a los médicos tratantes de forma inmediata. Se garantiza la confidencialidad de los pacientes incluidos. Las bases de datos estarán custodiadas por la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia.

También se garantiza que los investigadores poseen la competencia técnica requerida para este estudio y que disponen las herramientas necesarias para el cuidado y utilización de los datos de investigación.

Resultados y discusión

Fase 1: Revisión de la literatura

La fluorosis dental es considerado un "efecto toxico secundario" ocasionado por la presencia de masiva de iones fluoruro en el medio ambiente secretor del esmalte durante su formación. Se considera que el fluoruro favorece la presencia de fluorosis, el cual alcanza concentraciones de 1 -2ppm y proviene del agua potable. El ion fluoruro al ser ingerido, se absorbe a nivel del sistema gastrointestinal y es transportado por vía sanguínea a todas las partes del cuerpo, donde a nivel del esmalte humano existe una mayor concentración de fluoruro ubicada en las regiones adamantinas más profundas (Richards et al., 1989; Fejerskov et al., 1990; Aoba et al., 2002; Bronckers et al., 2009).

Características clínicas de la fluorosis dental: A la inspección visual, la fluorosis tiene unos amplios espectros clínicos de manifestaciones, unas incipientes hasta cambios decoloraciones drásticos, los cuales son detectables desde el momento en que inicia la erupción dental (Richards et al., 1989; Fejerskov et al., 1990; Aoba et al., 2002; Bronckers et al., 2009).

Clasificación de la fluorosis con base en la severidad: Superficie moteada con opacidad: líneas opacas de color blanco hasta calcáreo en una superficie; esta se conoce como una hipomineralización con diversos grados de porosidad generando así diversos espacios entre dicha matriz en formación dependiendo de la severidad de la fluorosis (Richards et al., 1989; Fejerskov et al., 1990; Aoba et al., 2002; Bronckers et al., 2009).

Consecuencias del esmalte fluorótico: Disminución de la resistencia al desgaste superficial y mayor capacidad de fractura. Dichas características se evidencian en la superficie, por la afectación de los ameloblastos en su etapa secretora por la presencia de ion fluoruro (Richards et al., 1989; Fejerskov et al., 1990; Bronckers et al., 2009).

Durante la fase secretora de amelogénesis, los cristales de hidroxapatita se forman dentro de una matriz rica en proteínas la cual es mineralizada parcialmente por la enzima

fosfatasa alcalina esta procede por la ruptura normal de las células sanguíneas y se clasifica dentro de las hidrolasas las cuales se encuentran presentes en todos los tejidos especialmente en los huesos , La aparición de este tejido mineralizado ocurre sobre el tercer o cuarto mes de embarazo en donde inicia la aparición del esmalte en el feto .Durante la fase de maduración se elimina la matriz y los cristales se expanden en espesor, esto se conoce como un fenómeno único durante esta etapa ya que los ameloblastos modulan y también secretan KLK4 reabsorbiendo los productos de degradación de proteínas y promoviendo a la deposición de minerales en masa a medida que el esmalte se endurece, los ameloblastos transportan algunas de las sustancias empleadas en la fase secretora fuera del esmalte. De esta forma, la función de los ameloblastos se convierte en la de transporte de sustancias. Dicho transporte suele consistir en proteínas requeridas para la completa mineralización del diente, como es el caso de la amelogenina, ameloblastina, esmaltina y tuftelina Al final de esta fase el esmalte ya está completamente mineralizado (Bronckers et al., 2015; Suzuki et al., 2014).

Durante la amelogénesis ocurren diferentes eventos moleculares. Entre ellos podemos mencionar: el transporte de iones de calcio, la precipitación y alineación de iones para formar los cristales de hidroxiapatita, proliferación celular y diferenciación por medio de interacciones epitelio-mesénquima (Aoba et al., 2002). En estos participan de diversas proteínas tales como amelogeninas, que coadyuvan para generar el crecimiento de los cristales de hidroxiapatita y permiten la mineralización de la matriz. Por su parte la incorporación excesiva de fluoruros interfiere con diversos procesos mencionados anteriormente, alterando su capacidad de eliminar proteínas y agua lo cual interfiere en la capacidad de producir enzimas proteolíticas necesarias para que se forme un esmalte de calidad esperada (Aoba et al., 2002; Fejerskov et al., 1990).

Ameloblastos:

- Ameloblastos de secreción precoz: la presencia de altas concentraciones de fluoruro en dosis moderadas (3-7 mg F / kg de peso corporal), la estructura del ameloblasto se puede afectar y reducir la síntesis de proteínas de forma transitoria (Aoba et al., 2002; Bronckers et al., 2009).

- Ameloblastos en su etapa secretora definitiva: dichas células son resistentes a la exposición aguda al fluoruro, el cual pueden interrumpir la transformación estructural de los ameloblastos causando acumulación de las proteínas de la matriz. Como consecuencia macroscópicamente existe una reducción del espesor del esmalte (Aoba et al., 2002; Bronckers et al., 2009).
- Ameloblastos tardíos: en esta etapa los ameloblastos son sensibles a las altas concentraciones de los iones de fluoruro, el cual se ve asociado con la formación de periquematis, siendo un tipo de aberturas de líneas incrementales, vistas como pequeñas líneas horizontales (Aoba et al., 2002; Bronckers et al., 2009).
- Maduración de los ameloblastos: los pocos cambios efectuados en esta etapa son graduales y la actividad celular se reduce en presencia de fluoruro. Generando retención de proteínas, dando un retraso en la degradación proteolítica, y un menor contenido mineral. Evidenciando que el efecto fluoruro es reversible permitiendo que las células moduladoras jóvenes se recuperen más rápidamente que los ameloblastos más antiguos. Finalmente, las proteínas de la matriz desaparecen del esmalte no fluorado en esta fase, pero se conservan en la superficie del esmalte en niveles de 25 ppm aproximadamente. Los ameloblastos usan oligoelementos tales como el (Flúor-calcio) para mineralizar el esmalte, las alteraciones en los niveles de estos reflejan cambios en la actividad de transporte que conducen a la hipomineralización del esmalte, Los oligoelementos en el esmalte se encuentran en un equilibrio dinámico con un gran conjunto de iones unidos a la superficie del cristal este grupo unido es muy móvil, indicado por la facilidad con que K^+ y Na^+ se pueden extraer del esmalte En el líquido de este, cerca de las membranas apicales de los ameloblastos influirán en la actividad del ion transportistas. Los altos niveles de K^+ despolarizan la membrana plasmática de los osteoclastos, detienen la reabsorción ósea e inducen el desprendimiento de las células de la superficie del hueso y En el desarrollo del esmalte, la K^+ adsorbida a las superficies cristalinas podría liberarse de los cristales en el líquido del esmalte por acidificación gradual durante la formación del cristal lo cual llega a ser perjudicial para el reciclaje de K^+ y reducir o incluso revertir el transporte de Ca^{2+} , convirtiendo el ameloblasto en células lisas. El exceso de K^+ también se puede lavar junto con Na^+ , protones y

péptidos de matriz durante la modulación cuando la ubicación de las uniones estrechas en los ameloblastos cambia del borde apical al basal y viceversa.

En la etapa post-eruptiva, la capa externa del esmalte experimenta una alta exposición a fluoruros, lo cual genera cambios superficiales con respecto a su composición habitual. Esto es debido a su capacidad para absorber fluoruros dados sus propiedades afectando dicho esmalte desde la parte superficial hasta lo más interno. Cabe señalar que el patrón de distribución de fluoruro en el esmalte no refleja las variaciones en el volumen de poros y su distribución en la capa superficial adamantina (Aoba et al., 2002; Bronckers et al., 2009).

Existen diversas proteínas que se encuentran en la formación de la matriz del esmalte. Entre estas proteínas se encuentran las amelogeninas, ameloblastinas, amelina, tuftelinas, y proteínas sulfatadas de alto peso molecular tales como enamelinas generadas a partir de 65-kDa degradada después de la secreción (Fincham et al., 1999), las cuáles serán eliminadas de la matriz del esmalte posteriormente. Se ha identificado otra proteína llamada esmalisina, ubicada en la porción secretora del proceso de Tomes durante el proceso de maduración al mismo nivel que las amelogeninas y las demás proteínas. Estas tienen la capacidad de alterar el pH y aumentar los iones de calcio (Aoba et al., 2002).

Relación dosis-respuesta en humanos: tras la exposición antes de los 6 años de vida, se pueden tener efectos indeseados del fluoruro siendo visibles únicamente durante el periodo de erupción. Tras diversas intervenciones de Salud Pública, incluyeron el agua potable fluorada como medida de prevención en caries, pero tras el exceso de ingesta superior a 0,02mg/Flkg, se ha observado que tiene mayor capacidad de generar un aumento de la incorporación en diversos tejidos tales como los gérmenes dentales. Cabe aclarar que hay diversos factores que influyen en la susceptibilidad, siendo el principal responsable las altas concentraciones del ion fluoruro (Richards et al., 1989; Fejerskov et al., 1990).

La hipomineralización es un defecto del desarrollo del esmalte que ocurre por la ingesta excesiva de fluoruro durante la formación dental, Dando como resultado cambios en la estructura y apariencia defectuosa en los dientes afectados, su severidad es variable y depende de la concentración, la ingesta de este elemento, Los factores externos y genéticos tales como la alteración de los reguladores del pH, las mutaciones de MMP20 y KLK4 las cuales afectan y alteran el desarrollo del mismo (Bronckers et al., 2015; Suzuki et al., 2014).

Tras diversos estudios, durante la exposición a los iones de fluoruro, puede haber cambios en cuanto al tamaño del cristal, número, forma del cristal y la calidad. Por un lado el diámetro de los cristales de fluorapatita es de aproximadamente 60-70nm siendo mayor que los cristales de hidroxiapatita (40-50nm). También la subsuperficie hipomineralizada tiene un espesor de 22nm y un ancho de 70nm, lo que quiere decir es que son de menor tamaño los cristales de fluorapatita. Respecto a la superficie de los cristales de fluorapatita, se ha evidenciado que son superficies más ásperas e irregulares respecto a una superficie de un esmalte normal (Richards et al., 1989; Fejerskov et al., 1990; Bronckers et al., 2009).

Posibles mecanismos de acción del fluoruro sobre la formación de esmalte: En casos severos, el esmalte sin prisma se encuentra en el interior del mismo, el cual la formación de esmalte prismático había sido bruscamente interrumpida durante el exceso de iones de fluoruro. Dicha matriz fluorada mantiene la capacidad de forma mineral, estando no directamente relacionado a la amelogenina, por que el fluoruro está unido a las proteínas calcio en dicha matriz. Por lo tanto, a altas concentraciones de fluoruro, logra unirse a las amelogeninas y otras proteínas a través de proteínas de calcio (Richards et al., 1989; Fejerskov et al., 1990).

Los principales efectos al estar en altas concentraciones de fluoruro que pueden generar no captación de minerales pueden ser:

- En presencia del fluoruro genera reducción en la degradación de las proteínas de la matriz reduciendo la producción de proteasas por los ameloblastos.

- Actúa sobre la actividad de la proteasa en el extracelular matriz e inhibe la degradación de la matriz.
- El flúor cambia las características de adsorción, la superficie, o propiedades superficiales de cristales de esmalte a las que se unen proteínas de matriz adherirse.
- Reduce el calcio en el líquido del esmalte requerido para las proteasa
- Afecta la endocitosis y la degradación intracelular de matriz mediante modulación de ameloblastos
- Aumenta la apoptosis o estimula a los ameloblastos para migrar (Richards et al., 1989; Fejerskov et al., 1990).

El mecanismo por el cual el calcio la regulación de la amelogenina, es promover secreción de la matriz del esmalte y la biomineralización, teniendo un efecto directamente sobre los ameloblastos. Puede actuar de dos maneras, modular la síntesis y la secreción de amelogeninas por los ameloblastos y mejora la afluencia transcelular para proporcionar iones para el crecimiento de cristales en la capa que se está depositando (Richards et al., 1989; Fejerskov et al., 1990; Aoba et al., 2002; Bronckers et al., 2009).

Las mutaciones en el gen humano Mmp20 también conocido como enamelysin que contiene 10 exones y es parte de un grupo de genes de metaloproteinasas de matriz que se localizan en el cromosoma humano 11q22.3, altera el patrón de empalme normal y da como resultado la terminación prematura de la proteína codificada, esto se ha asociado con amelogénesis imperfecta. El esmalte en ausencia de MMP-20 es hipoplásico (delgado), contiene menos mineral (solo un tercio del mineral total que el natural) y contiene más proteína y agua. Las funciones de este gen en el esmalte son separar las proteínas de la matriz del esmalte en sitios de escisión específicos ya que este se expresa mediante células de diferente origen de desarrollo (ameloblastos epiteliales y odontoblastos mesenquimatosos) y está implicado en la descomposición de la matriz extracelular en procesos fisiológicos normales, como el desarrollo embrionario, la reproducción y la remodelación

tisular, La proteína codificada por este gen degrada la amelogenina, la cual es el principal componente proteico de la matriz del esmalte , y por lo tanto se cree que desempeña un papel en la formación del esmalte dental. Otra de las mutaciones que se pueden generar son las del gen KLK4 el cual es secretado por ameloblastos en fase de transición y maduración Este gen codifica la proteína calicreína la cual se encuentra en humanos y se encuentra en un subgrupo de serinas proteasas que tienen diversas funciones fisiológicas. Este gen es uno de los quince miembros de la subfamilia calicreína ubicados en un grupo en el cromosoma 19, En algunos tejidos su expresión está regulada hormonalmente. Dicho gen degrada agresivamente la matriz orgánica retenida después de la terminación de la secreción de proteína del esmalte, sus funciones principales en la formación del esmalte dental son facilitar el reemplazo ordenado de la matriz orgánica con mineral, generando una capa de esmalte que es más dura, menos porosa y no manchada por las proteínas del esmalte retenidas (Bronckers et al., 2015; Suzuki et al., 2014).

Fase 2: Correlación clínico-teórico

En esta parte, se ha venido trabajando con la parte de correlación clínico-teórico, el cual se han ido buscando imágenes que permitan explicar las diferentes clasificaciones de la fluorosis dental. (Pendrys 2000; Rozier 1994; Guía de Fluorosis Dental de Colombiana De Salud S.A (Tabla 1.)

También se ha descrito el Índice de Thilstrup & Fejerskov, ya que evalúa la fluorosis dental en todos sus niveles de gravedad correlacionando características clínicas con las histológicas del esmalte afectado. En la parte clínica de acuerdo a la determinación de gravedad y severidad de la lesión determinará el tipo de tratamiento a realizar (Cavalheiro et al., 2017; Thylstrup and Fejerskov, 1978) (Tabla 2.)

Para poder realizar este tipo de diagnóstico debe realizarse por medio de personal capacitado que este calibrado en este tema, por ende existen diversos criterios a la hora de realizar un diagnóstico de este tipo (Pendrys 2000; Rozier 1994; Guía de Fluorosis Dental de Colombiana De Salud S.A (Tabla 3.)

Fase 3: Investigación tecnológica

En este punto del proyecto de grado, se plasmó un diseño en PowerPoint donde se explican todos los procesos embriológicos desde la fecundación hasta la formación del diente, de una forma detallada y por medio de imágenes histológicas permitiendo así la explicación y asimilación de la información de una forma más sencilla y didáctica tanto para los estudiantes como para los docentes interesados en el tema.

Conclusiones

Tras la revisión de la literatura realizada en este trabajo, se unificaron conceptos sobre la aparición de la fluorosis dental durante la formación del diente y explicando detalladamente eventos moleculares y embriológicos siendo así una manera fácil de poder explicar a los estudiantes y docentes interesados en el tema sobre estos eventos y poder generar nuevas investigaciones partiendo de este trabajo como base.

En este trabajo se tuvieron en cuenta ciertas clasificaciones avaladas a nivel mundial sobre la fluorosis dental y un método de calibración para poder realizar una correlación entre lo estudiado e investigado en este trabajo y poder llevarlo a la práctica clínica identificando dichas lesiones y sus grados de severidad.

Finalmente, lo que obtuvimos fue una base en PowerPoint para la realización de la herramienta virtual y así poder explicar estos fenómenos de una forma didáctica y entendible en la tercera fase de este trabajo de grado.

Tablas

Tabla 1. Clasificación de la fluorosis de acuerdo a la guía de fluorosis dental de Colombiana de salud del 2012.

GRADO
Leve Pequeñas estrías o líneas en la superficie dental localizadas en esmalte.
Moderada Dientes altamente resistentes a caries dental con presencia de machas blancas opacas.
Severa Presencia de esmalte quebradizo y visible manchas marrones, cafés con gran destrucción del esmalte dental.

Tabla 2. Índice de Thilstrup & Fejerskov.

No.	Criterios
0	La translucidez normal del esmalte permanece después del secado prolongado al aire.
1	Líneas blancas estrechas correspondientes a las periquematides.
2	Superficies lisas: líneas de opacidad más pronunciadas que siguen las periquematides. Ocasionalmente confluencia de líneas adyacentes. Superficies oclusales: áreas de opacidad dispersas <2 mm de diámetro y opacidad pronunciada de las crestas cuspidas.
3	Superficies lisas: fusión y zonas turbias irregulares de opacidad. Dibujo acentuado de periquematides a menudo visible entre opacidades. Superficies oclusales: Áreas confluentes de marcada opacidad. Las áreas desgastadas parecen casi normales pero usualmente están circunscritas por un borde de esmalte opaco.
4	Superficies lisas: toda la superficie muestra una opacidad marcada o aparece de color blanco calizo. Partes de superficie expuestas al desgaste aparece menos afectado. Superficies oclusales: toda la superficie exhibe marcada opacidad. El desgaste a menudo se pronuncia poco después de la erupción
5	Superficies lisas y superficies oclusales: toda la superficie muestra una opacidad marcada con pérdida focal del esmalte más externo <2 mm de diámetro.
6	Superficies lisas: las piscinas se organizan regularmente en bandas horizontales de menos de 2 mm en extensión vertical. Superficies oclusales: las áreas confluentes <3 mm de diámetro exhiben pérdida de esmalte. Desgaste marcado.
7	Superficies lisas: Pérdida de esmalte más externo en áreas irregulares que involucran <1/2 de toda la superficie. Superficies oclusales: cambios en la morfología causados por la fusión de picaduras y el desgaste marcado.
8	Superficies lisas y oclusales: pérdida del esmalte más externo que involucra > 1/2 de superficie
9	Superficies lisas y oclusales: pérdida de la parte principal del esmalte con cambio en el aspecto anatómico de la superficie. En cervical a menudo se nota el borde del esmalte casi no afectado

Tabla 3. *Criterios para la calibración para la fluorosis de acuerdo a la guía de fluorosis dental de Colombiana de salud del 2012.*

GRADO	OBSERVACION CLINICA
0	Ausencia de manifestaciones clínicas de la fluorosis dental.
0,5	Compromiso hasta el 25% de la superficie dental bilateralmente.
1	Compromiso hasta el 50% de la superficie dental bilateralmente.
2	Compromiso hasta el 75% de la superficie dental bilateralmente.
3	Compromiso hasta el 100% de la superficie dental bilateralmente con cambio de color en esmalte (amarillo, café, marrón)

Referencias bibliográficas

1. Alvarez J, Rezende, Salazar S, Alves F, Celiberti P, Ciamponi A. Dental fluorosis: Exposure, prevention and management. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2009 Feb 1;14 (2):E103-7.
2. Aoba T, Fejerskov O, Dental fluorosis: chemistry and biology, *Crit Rev Oral Biol Me*, 13(2):155-170 (2002)
3. Bronckers AL1, Lyaruu DM, DenBesten PK. The impact of fluoride on ameloblasts and the mechanisms of enamel fluorosis 2009 Oct; 88(10): 877–893.
4. Bronckers; Ameloblast Modulation and Transport of Cl⁻, Na⁺, and K⁺ during Amelogenesis; *Journal of Dental Research* 2015, Vol. 94
5. Buzalaf MA, Cardoso Cde A, Magalhães AC. Low-fluoride toothpastes may not lead to dental fluorosis but may not control caries development. Standard fluoride toothpastes can control caries development but may lead to dental fluorosis. *J Evid Based Dent Pract*. 2013 Dec;13(4):148-50.
6. Buzalaf MA, Pessan JP, Honório HM, ten Cate JM. Mechanisms of action of fluoride for caries control. *Monogr Oral Sci*. 2011;22:97-114.
7. Bronckers AL, Lyaruu DM, DenBesten PK. The impact of fluoride on ameloblasts and the mechanisms of enamel fluorosis. *J Dent Res*. 2009 Oct;88(10):877-93. doi: 10.1177/0022034509343280. Review.
8. Cavalheiro JP, Giroto-Bussaneli D, Restrepo M, Bullio-Fragelli CM, Loiola-Cordeiro RdC, Escobar-Rojas A, Santos-Pinto L, Jeremias F. Clinical aspects of dental fluorosis according to histological features: a Thylstrup Fejerskov Index review. *Rev. CES Odont* 2017; 30(1):41-50
9. Cardoso C, Lacerda B, Mangueira DF, Charone S, Olympio KP, Magalhães AC, Pessan JP, Vilhena FV, Sampaio FC, Buzalaf MA. Mechanisms of action of fluoridated acidic liquid dentifrices against dental caries. *Arch Oral Biol*. 2015 Jan;60(1):23-8.
10. Christie DP. The spectrum of radiographic bone changes in children with fluorosis. *Radiology*. 1980 Jul;136(1):85-90.
11. Colombiana de Salud S.A. Guía de Fluorosis Dental. Colombia. 2012.

12. DenBesten PK, Zhu L, Li W, Tanimoto K, Liu H, Witkowska HE. Fluoride incorporation into apatite crystals delays amelogenin hydrolysis. *Eur J Oral Sci.* 2011 Dec;119 Suppl 1:3-7.
13. DenBesten PK, Yan Y, Featherstone JD, Hilton JF, Smith CE, Li W. Effects of fluoride on rat dental enamel matrix proteinases. *Arch Oral Biol.* 2002 Nov;47(11):763-70.
14. Den Besten PK. Effects of fluoride on protein secretion and removal during enamel development in the rat. *J Dent Res.* 1986 Oct;65(10):1272-7.
15. Fejerskov O, Manjap F, Baeluw V, The Nature and Mechanisms of Dental Fluorosis in Man, *Dent Res* 69(Spec Iss):692-700, February, 1990
16. Fincham A, Moradian-Oldak J, Simmer J. The Structural Biology of the Developing Dental Enamel Matrix, *Journal of Structural Biology* 126, 270–299 (1999).
17. Gómez G, Gómez D, Martín M. Flúor y fluorosis dental. Gómez G, Gómez D, Martín M. Pautas para el consumo de dentífricos y aguas de bebida en Canarias. 1 ed. Santa Cruz de Tenerife. 2002. p.5.
18. Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjäderhane L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontol Scand.* 2007 Feb;65(1):1-13.
19. Izaguirre Fernández EJ. Mechanisms of fluoride action, toxicology and therapeutic regimens for dental caries control. What are the options?. *Pract Odontol.* 1988 Oct;9(10):43-8, 52-8.
20. Jiang M, Mu L, Wang Y, Yan W, Jiao Y. The relationship between Alu I polymorphisms in the calcitonin receptor gene and fluorosis endemic to Chongqing, China. *Med Princ Pract.* 2015;24(1):80-3.
21. Jiao YZ, Mu LH, Wang YX, An W, Jiang M. Association between ameloblastin gene polymorphisms and the susceptibility to dental fluorosis. 2013 Jan;34(1):28-32.
22. Kirkham J, Brookes SJ, Zhang J, Wood SR, Shore RC, Smith DA, Wallwork ML, Robinson C. Effect of experimental fluorosis on the surface topography of developing enamel crystals. *Caries Res.* 2001 JanFeb;35(1):50-6.
23. Li W, Jiang B, Cao X, Xie Y, Huang T. Protective effect of lycopene on fluoride-induced ameloblasts apoptosis and dental fluorosis through oxidative stress-mediated Caspase pathways. *Chem Biol Interact.* 2017 Jan 5;261:27-34.

- 24.** Lyaruu DM, Bronckers AL, Santos F, Mathias R, DenBesten P et al, The effect of fluoride on enamel and dentin formation in the uremic rat incisor 2008 Nov;23(11):1973-9
- 25.** Marianela Delgado Fernández, Arlyne Solano González. ESTRATEGIAS DIDÁCTICAS CREATIVAS EN ENTORNOS VIRTUALES PARA EL APRENDIZAJE. Actualidades Investigativas en Educación 2009 Jan 1,;9(2):1-21.
- 26.** Mofatto LS, Frozoni MRS, do Espírito Santo, Alexandre R, Guimarães GN, de Souza AP, de Campos Vidal B, et al. Fluoride effect on the secretory-stage enamel organic extracellular matrix of mice. Connective Tissue Research 2011 Jun;52(3):212-217.
- 27.** Oncu M, Gulle K, Karaoz E, Gultekin F, Karaoz S, Karakoyun I, Mumcu E. Effect of chronic fluorosis on lipid peroxidation and histology of lung tissues in first and second generation rats. Toxicol Ind Health. 2006 Oct;22(9):375-80.
- 28.** Martignon S, Opazo-Gutiérrez MO, Velásquez-Riaño M, Orjuela-Osorio IR, Avila V, Martinez-Mier EA, González-Carrera MC, Ruiz-Carrizosa JA, Silva-Hermida BC. Geochemical characterization of fluoride in water, table salt, active sediment, rock and soil samples, and its possible relationship with the prevalence of enamel fluorosis in children in four municipalities of the department of Huila (Colombia). Environ Monit Assess. 2017 Jun;189(6):264.
- 29.** Reddy GB, Khandare AL, Reddy PY, Rao GS, Balakrishna N, Srivalli I. Antioxidant defense system and lipid peroxidation in patients with skeletal fluorosis and in fluoride-intoxicated rabbits. Toxicol Sci. 2003 Apr;72(2):363-8.
- 30.** Renato Masaharu Hassunuma, Edson Virgilio Zen, Filho, Danielle Santi Ceolin, Tania Mary Cestari, Rumio Taga, and Gerson Francisco de Assis, et al. ultrastructural and immunohistochemical study of the influence of fluoride excess on the development of rat incisor tooth buds 2007 Aug;15(4):292-298
- 31.** Richards A, Fejerskov O, Baelum V. Enamel Fluoride in Relation To Severity of Human Dental Fluorosis. Advances in Dental Research 1989 Sep;3(2):147-153.
- 32.** Suzuki I; Fluoride Affects Enamel protein content via tGF- β 1-mediated KLK4 Inhibition; research reports biological; J Dent Res 93(10):1022-1027, 2014

33. Thylstrup A, Fejerskov O. Clinical appearance of dental fluorosis in permanent teeth in relation to histological changes. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1978; 6(6): 315- 328
34. Wang HW, Zhao WP, Liu J, Tan PP, Zhang C, Zhou BH. Fluoride-induced oxidative stress and apoptosis are involved in the reducing of oocytes development potential in mice. *Chemosphere.* 2017 Aug 14;186:911-918.
35. Wen S, Li A, Cui L, Huang Q, Chen H, Guo X, Luo Y, Hao Q, Hou J, Ba Y. The relationship of PTH Bst BI polymorphism, calciotropic hormone levels, and dental fluorosis of children in China. *Biol Trace Elem Res.* 2012 Jun;147(1-3):84-90. doi: 10.1007/s12011-011-9313-5. Epub 2012 Jan 5.
36. Xue H, Li Y, Everett ET, Ryan K, Peng L, Porecha R, et al. Ameloblasts require active RhoA to generate normal dental enamel. *Eur J Oral Sci* 2013;121(4):293-302.
37. Zhang T, Shan KR, Tu X, He Y, Pei JJ, Guan ZZ. Myeloperoxidase activity and its corresponding mRNA expression as well as gene polymorphism in the population living in the coal-burning endemic fluorosis area in Guizhou of China. *Biol Trace Elem Res.* 2013 Jun;152(3):379-86. doi: 10.1007/s12011-0139632-9.
38. Zhang X, Zhang Y, Xi S, Cheng G, Guo X. The effect of different fluoride concentrations on the expression of transforming growth factor-beta1 in ameloblast of rat incisor. *West China journal of stomatology* 2012;30(4):434.