



---

---

Universidad Autónoma del Estado de México  
Facultad de Medicina

Doctorado en Ciencias de la Salud

**“Caracterización química, morfológica y estructural  
del esmalte de dientes temporales  
y cambios producidos por láser Er:YAG y fluoruro”**

## **TESIS**

Para Obtener el Grado de  
Doctora en Ciencias de la Salud

Presenta:

Carmen María Zamudio Ortega

Comité Tutorial

Dra. en O. Rosalía Contreras Bulnes

Tutor Académico

Dr. en O. Rogelio José Scougall Vilchis

Tutor Interno

Dr. en C. M. Raúl Alberto Morales Luckie

Tutor Externo

Toluca, Estado de México, 2014



---

---

Universidad Autónoma del Estado de México  
Facultad de Medicina

Doctorado en Ciencias de la Salud

**“Caracterización química, morfológica y estructural  
del esmalte de dientes temporales  
y cambios producidos por láser Er:YAG y fluoruro”**

## **TESIS**

Para Obtener el Grado de  
Doctora en Ciencias de la Salud

Presenta:

Carmen María Zamudio Ortega

Comité Tutorial

Dra. en O. Rosalía Contreras Bulnes

Tutor Académico

Dr. en O. Rogelio José Scougall Vilchis

Tutor Interno

Dr. en C. M. Raúl Alberto Morales Luckie

Tutor Externo

Toluca, Estado de México, 2014



---

## ÍNDICE

Contenido	No. página
Resumen y Summary	1
1. Antecedentes	3
1.1. Dentición Temporal	3
1.1.1. Generalidades de la Dentición Temporal Humana	3
1.1.2. Características del Esmalte Temporal	4
1.2. Caries Dental	5
1.2.1. Concepto y Etiología de la Caries Dental	5
1.2.2. Prevalencia	5
1.2.3. Caries en Dientes Temporales y su Valor Predictivo en la Dentición Permanente	6
1.2.4. Prevención de la Caries Dental	7
1.3. Tecnología Láser	9
1.3.1. Generalidades del Láser	9
1.3.2. Aplicaciones del Láser en Odontología	10
1.3.3. Tecnología Láser en la Prevención de la Caries Dental	11
1.3.4. Láser Er:YAG	12
2. Planteamiento del Problema	14
3. Hipótesis	16
4. Objetivos	18
5. Justificación	20
6. Material y Métodos	22
6.1. Diseño de Estudio	22
6.2. Criterios de Inclusión y Eliminación	24

---

---

6.3.	Procedimientos	25
6.3.1.	Procedimientos de la Fase I	25
6.3.2.	Procedimientos de la Fase II	28
6.4.	Variables de Estudio	32
6.5.	Implicaciones Bioéticas	37
6.6.	Recolección de Datos	38
6.7.	Análisis Estadístico	38
7.	Resultados	40
7.1.	Artículo Enviado - <i>Fase I</i>	40
7.1.1.	Página frontal del manuscrito	40
7.1.2.	Carta de envío	41
7.1.3.	Resumen	42
7.1.4.	Abstract	42
7.1.5.	Introduction	43
7.1.6.	Material and Methods	44
7.1.7.	Results	48
7.1.8.	Discussion	52
7.1.9.	Conclusions	56
7.1.10.	Acknowledgements	57
7.1.11.	References	57
7.2.	Artículo Aceptado - <i>Fase II</i>	60
7.2.1.	Página frontal del manuscrito	60
7.2.2.	Carta de aceptación	61
7.2.3.	Resumen	62
7.2.4.	Abstract	62
7.2.5.	Introduction	63
7.2.6.	Materials and Methods	64
7.2.7.	Results	68
7.2.8.	Discussion	73
7.2.9.	Conclusion	76
7.2.10.	Acknowledgements	76
7.2.11.	References	77
8.	Discusión General	80

---

---

9.	Conclusiones Generales	88
	9.1. Conclusiones	88
	9.2. Limitaciones	89
	9.3. Recomendaciones	89
10.	Referencias Bibliográficas	91
11.	Anexos	103
	11.1. Anexo 1. Formato de asentimiento informado del paciente menor de edad para la donación de órganos dentarios	103
	11.2. Anexo 2. Formato de consentimiento informado del padre o tutor del paciente menor de edad para la donación de órganos dentarios	104
	11.3. Anexo 3. Figura 2.	105
	11.4. Anexo 4. Tabla 7.	106
	11.5. Anexo 5. Figura 3.	107
	11.6. Anexo 6. Figura 4.	108
	11.7. Anexo 7. Tabla 8.	109
	11.8. Anexo 8. Figura 5.	110
	11.9. Anexo 9. Figura 6.	111
	11.10. Anexo 10. Tabla 9.	112
	11.11. Anexo 11. Tabla 10.	113

---

---

# **Resumen y Summary**

---

---

## Resumen

**Objetivo.** Determinar la morfología, composición química, estructura y las fases cristalinas características de la superficie del esmalte de los dientes temporales humanos sanos y evaluar los cambios morfológicos y químicos producidos en éste por la irradiación con láser Er:YAG, la aplicación de fluoruro, el tratamiento combinado y la disolución ácida *in vitro*. **Antecedentes.** La caries dental es la enfermedad crónica más común en la infancia y el conocimiento profundo del esmalte temporal sano es requerido para mejorar las estrategias de prevención y tratamiento, incluyendo la síntesis de nuevos materiales bioactivos. El láser Er:YAG ha sido propuesto como una potencial estrategia preventiva, pero existe escasa información concerniente al esmalte temporal. **Material y Métodos.** *Fase I.* El esmalte de 30 dientes temporales humanos fue examinado mediante: Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), Espectroscopía de Rayos X por Dispersión de Energía (EDS), Difracción de Rayos X de Polvos (XRD), Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) y Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos X (XPS). Las diferencias químicas entre incisivos y caninos fueron evaluadas estadísticamente mediante el Test *U* de Mann-Whitney ( $p \leq 0.05$ ). *Fase II.* Ochenta muestras de esmalte fueron asignadas a ocho grupos ( $n=10$ ): G1, control; G2, G3 y G4, irradiación con láser Er:YAG a 7.5, 12.7 and 39.8 J/cm<sup>2</sup>, respectivamente; G5, aplicación de fluoruro; G6, G7 y G8, irradiación a las densidades previas + aplicación de fluoruro. La morfología fue evaluada mediante microscopía electrónica de barrido y la composición química fue determinada mediante espectroscopía de rayos X por dispersión de energía antes del tratamiento (BT), después del tratamiento (AT) y después de la disolución ácida (AAD). ANOVA de una vía y de medidas repetidas fueron utilizadas ( $p \leq 0.05$ ) para el análisis estadístico. **Resultados.** *Fase I.* Tres patrones de esmalte fueron observados. Las relaciones Ca/P fueron 1.37 y 1.03 mediante EDS y XPS, respectivamente. El tamaño de cristalita fue  $210.82 \pm 16.78$  Å. La relación promedio entre Ca unido a fosfato y Ca unido a hidroxilo fue aproximadamente 10:1. *Fase II.* La morfología de las superficies irradiadas incluyó cráteres, prismas expuestos, fracturas y fusión. No existieron modificaciones morfológicas después de la aplicación de fluoruro y tampoco AAD. Químicamente, AT: el porcentaje atómico (%at) de C disminuyó en G3, G4 y G8; el %at de O disminuyó en G5-G8; el contenido de F fue mayor para G7; los elementos traza se mantuvieron por debajo de 1.0 %at; el %at de Ca aumentó en G4, G7 y G8; incrementos en el %at de P en G4 y G8; Ca/P aumentó en G4, G7 y G8. AAD: el %at de F cayó a 0.00 en G5-G8; el %at de P se incrementó en G7. **Conclusiones.** *Fase I.* El esmalte mostró dos patrones principales (“principalmente liso con algunos surcos” y “abundantes microporosidades”) y un patrón secundario (“prismas expuestos”). Ligeras variaciones entre las relaciones molares Ca/P encontradas mediante EDS y XPS sugieren diferencias en el contenido mineral desde la superficie del esmalte hacia el interior. Las fases cristalinas encontradas fueron hidroxiapatita y apatita carbonatada, con mayor incorporación de carbonato tipo B. *Fase II.* Los cambios morfológicos del esmalte irradiado con Er:YAG incluyeron daños desde leves hasta severos. Las condiciones empleadas en este estudio no son recomendadas para la prevención de caries de dientes temporales. La densidad de energía del láser Er:YAG produjo cambios químicos en el esmalte que mejoraron su estructura. La disolución ácida removió fluoruro de la superficie del esmalte.

---

---

## Summary

**Objective.** To characterize the enamel surface of human sound deciduous teeth in terms of morphology, chemical composition, structure and crystalline phases and evaluate the morphological and chemical changes on it produced by Er:YAG laser irradiation, fluoride application, combined treatment and acid dissolution *in vitro*. **Background.** Dental caries is the most common chronic disease in childhood and deep knowledge of the sound deciduous enamel is required to improve the prevention and treatment strategies, including the synthesis of new bioactive materials. Er:YAG laser has been proposed as a potential preventive dental caries strategy, but here is quite scarce information regarding deciduous enamel. **Material and Methods.** *Phase I.* The enamel of 30 human deciduous teeth was examined by: Scanning Electron Microscopy (SEM), Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy (EDS), X-ray Powder Diffraction (XRD), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS). Chemical differences between incisors and canines were statistically evaluated by Mann-Whitney *U* Test ( $p \leq 0.05$ ). *Phase II.* Eighty enamel samples were assigned to eight groups ( $n=10$ ): G1, control; G2, G3 and G4, Er:YAG laser irradiation at 7.5, 12.7 and 39.8 J/cm<sup>2</sup>, respectively; G5, fluoride application; G6, G7 and G8, irradiation at previous densities + fluoride application. Morphology was evaluated by scanning electron microscopy and chemical composition determined by energy dispersive X-ray spectroscopy before treatment (BT), after treatment (AT) and after acid dissolution (AAD). One-way and repeated measures ANOVA were used ( $p \leq 0.05$ ). **Results.** *Phase I.* Three enamel patterns were observed. Ca/P ratios were 1.37 and 1.03 by EDS and XPS, respectively. Crystallite size was  $210.82 \pm 16.78$  Å. Mean ratio between Ca bonded to phosphate and Ca bonded to hydroxyl was approximately 10:1. *Phase II.* The morphology of lased surfaces included craters, exposed prisms, fractures and melting. No morphological modifications appeared after fluoride application, neither AAD. Chemically, AT: C atomic percent (at%) decreased in G3, G4 and G8; O at% decreased in G5-G8; F content was higher for G7; trace elements remained under 1.0 at%; Ca at% increased in G4, G7 and G8; increments in P at% of G4 and G8; Ca/P increased in G4, G7 and G8. AAD: F at% dropped to 0.00 in G5-G8; P at% increased in G7. **Conclusions.** *Phase I.* Enamel showed two main patterns (“mostly smooth with some grooves” and “abundant microporosities”) and a secondary pattern (“exposed prisms”). Slight variations among the Ca/P molar ratios found by EDS and XPS, suggest differences in the mineral content from the enamel surface to the interior. Crystalline phases found were hydroxyapatite and carbonate apatite, with major type B carbonate incorporation. *Phase II.* Morphological changes of Er:YAG irradiated enamel were from mild to severe damages. Conditions employed in this study are not recommended for deciduous caries prevention. Er:YAG energy density influenced chemical changes in enamel to enhance its structure. Acid dissolution removed fluoride from enamel surface.

---



---

# **Antecedentes**

---

---

## 1. Antecedentes

### 1.1. Dentición Temporal

#### 1.1.1. Generalidades de la Dentición Temporal Humana

La dentición temporal, también denominada decidua, primaria o de leche, está constituida por 20 órganos dentarios: 4 incisivos, 2 caninos y 4 molares en cada arcada. Los dientes son de menor tamaño y tienen un color más blanco que aquellos de la dentición permanente, pero tienen raíces más largas y delgadas para albergar entre ellas los gérmenes de los dientes definitivos.<sup>1</sup> Asimismo, los dientes temporales tienen una menor proporción de la dentina coronaria en relación al volumen pulpar; cuernos más altos y agudos; cuello con contricción; piso cameral delgado; y conductos estrechos y curvos, a diferencia de los permanentes.<sup>2</sup>

La dentición primaria se origina cerca de la sexta semana de desarrollo embrionario, a partir de la lámina dental epitelial primaria (de origen ectodérmico) que es una invaginación en forma de herradura del epitelio bucal hacia el mesénquima subyacente de cada maxilar. A partir de este momento comienza a incorporarse en su estructura el mesodermo y ulteriores procesos de proliferación e histodiferenciación conducen al crecimiento y desarrollo de los gérmenes dentarios.<sup>3</sup>

La distribución de los dientes deciduos en cada hemiarcada y su cronología aproximada de erupción son las siguientes:<sup>4</sup>

- Un incisivo central, el primer diente que hace erupción más o menos a los 6 meses de edad, aunque en algunos lactantes esto ocurre hasta los 12 ó 13 meses.
  - Un incisivo lateral, que erupciona alrededor de los ocho meses.
  - Un canino, que aparece alrededor de los 15 meses.
  - Dos molares, el primero de los cuales erupciona entre los 10 y los 19 meses y el segundo hace erupción entre los 20 y los 31 meses.
-

---

### 1.1.2. Características del Esmalte Temporal

El esmalte dental es el tejido más duro del cuerpo humano y está muy mineralizado, es alrededor del 96% en peso mineral, 3% agua y 1% orgánico.<sup>5</sup> La parte mineral o inorgánica se compone, en su mayor parte de cristales de hidroxiapatita  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$  y la parte orgánica está compuesta por proteína.<sup>6</sup> La hidroxiapatita que lo compone es una apatita cálcica carbonatada no estequiométrica en forma de cristales que se organizan en bastoncillos o prismas (unidades estructurales del esmalte) que miden 4  $\mu\text{m}$  de ancho por 8  $\mu\text{m}$  de largo, los cuales se extienden a través de todo el espesor del esmalte desde la unión amelodentinaria hasta la superficie libre del diente.<sup>4</sup>

Los dientes primarios se distinguen de los permanentes por los llamados “caracteres de la dentición”, entre los cuales se destacan los siguientes rasgos histológicos concernientes al esmalte:

- El esmalte deciduo tiene un menor grosor que el de los dientes permanentes.<sup>2,7,8</sup>
  - El esmalte de los dientes temporales está mineralizado en menor grado que el de los permanentes.<sup>7</sup>
  - El esmalte deciduo tiene un mayor contenido orgánico.<sup>2,8</sup>
  - Los dientes primarios tienen un mayor volumen de poros en el esmalte.<sup>2,8</sup>
  - Como consecuencia de las características anteriores, los dientes temporales son más permeables.<sup>8</sup>
  - Las piezas temporales presentan con mayor frecuencia zonas libres de prismas (aprismáticas) en el esmalte de una profundidad de 20-80  $\mu\text{m}$ , las cuales aparecen en las últimas etapas de la amelogénesis.<sup>2</sup>
  - En los dientes temporales, los prismas del esmalte del tercio gingival de la corona se extienden en dirección oclusal a partir de la unión amelodentinaria, mientras que en los dientes permanentes se encuentran en dirección cervical.<sup>7</sup>
-

## **1.2. Caries Dental**

### **1.2.1. Concepto y Etiología de la Caries Dental**

La caries dental es una enfermedad infecciosa de etiología multifactorial que involucra a los microorganismos cariogénicos, la dieta y la susceptibilidad del huésped.<sup>9</sup> Es concebida como un proceso patológico dinámico en el que existen periodos de desmineralización de los tejidos duros del diente debido a la presencia de metabolitos bacterianos que producen cambios a nivel molecular e inclusive destrucción tisular, alternando con periodos de remineralización.<sup>10</sup>

La desmineralización o destrucción del diente por la acción del ácido generado en la placa, usualmente comienza en el esmalte, procede en la dentina que está por debajo y finalmente ocurre en la pulpa.<sup>11</sup> Cuando el pH de la placa dental disminuye, los iones de hidrógeno fluyen por los poros que circundan a los cristales de hidroxiapatita, provocando la difusión de calcio y fósforo del esmalte subsuperficial hacia el exterior; sin embargo, debido a que la concentración de calcio y fósforo en los fluidos orales es alta, algunos iones de calcio y fósforo precipitan de nuevo en la superficie del esmalte afectado.<sup>12</sup> Este proceso de remineralización ocurre mediante el crecimiento de los cristales de hidroxiapatita,<sup>13</sup> pero cuando la reposición de los minerales es más baja que la pérdida neta de éstos, se desarrolla la caries dental.<sup>14</sup>

Las personas con caries dental pueden verse afectadas en la masticación, la digestión y la fonación, además de que la enfermedad usualmente cursa con dolor intenso y constituye una de las principales causas de pérdida dental.<sup>15</sup> La calidad de vida del enfermo puede verse comprometida en la esfera personal con sentimientos de vergüenza y ansiedad, en la convivencia social e inclusive en el ámbito económico.<sup>16</sup>

### **1.2.2. Prevalencia**

La caries dental representa un gran problema de salud en la mayoría de los países industrializados, afectando a un 60-90% de los niños en edad escolar y a la mayoría de los adultos, y se espera que su incidencia aumente en algunos países en vías de desarrollo en los que

---

---

existe un incremento pronunciado en el consumo de azúcares, aunado a la falta de exposición a los fluoruros.<sup>17</sup>

En una encuesta realizada en 1988 a escolares del Distrito Federal con edades entre 5 y 12 años, se observó una prevalencia general de 90.5% y de 88.6% en niños de 6 años, tomando en cuenta órganos dentarios tanto temporales como permanentes.<sup>18</sup> Posteriormente, en México se implementó la fluoración de la sal de mesa como método preventivo de la caries dental, y probablemente debido a esto y a otros factores como el uso de dentífricos y enjuagues fluorados, en algunas zonas del país se observó una clara reducción en el índice de dientes cariados, perdidos y obturados (CPOD).<sup>19</sup> Sin embargo, varios estudios muestran que los índices de caries, la prevalencia y las necesidades de tratamiento restaurador continúan siendo elevados en la población mexicana infantil y adolescente de ciertas regiones.<sup>20-25</sup> De acuerdo con las estadísticas del Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Patologías Bucales 2009 (SIVEPAB), la prevalencia de caries a nivel nacional en la población adulta fue de 96.4% y en pacientes de 6 años la media fue de 75.4%.<sup>26</sup>

### **1.2.3. Caries en Dientes Temporales y su Valor Predictivo en la Dentición Permanente**

El esfuerzo en el tratamiento preventivo y curativo de la caries en los dientes temporales debe ser constante, ya que existe una amplia gama de problemas que pueden desencadenarse en el niño enfermo. En casos extremos, como en la caries rampante de la dentición decidua, la destrucción masiva de los órganos dentarios puede ocasionar deterioro de la apariencia estética, dificultades en el habla, maloclusión y defectos en la masticación.<sup>27</sup> En otros procesos cariosos, los problemas secundarios pueden ser menos severos, pero no menos significativos.

Clarke y colaboradores<sup>28</sup> encontraron signos de malnutrición en los datos de peso, estatura, indicadores antropométricos y exámenes de laboratorio de niños de 2 a 6 años de edad que cursaban con Caries de la Infancia Temprana Severa (CITS); la mayoría presentaba evidencia de ingesta inadecuada de hierro, con potenciales efectos adversos permanentes en el crecimiento y el desarrollo ocasionados por la deficiencia de este elemento.

---

---

En una investigación realizada en China por Li y Wang<sup>29</sup> se examinaron 362 niños de 3 a 5 años en 1992 y posteriormente en 2000, reportando una asociación estadísticamente significativa entre la experiencia de caries en los órganos dentarios temporales y los permanentes ( $p < 0.01$ ), proponiendo que el status de caries en la dentición primaria podría ser utilizado como un indicador de riesgo para predecir la caries en la dentición permanente. También existen varios estudios realizados en escolares de la Ciudad de Campeche en los que se concluye que existe una fuerte asociación entre la presencia de caries en la dentición primaria y permanente,<sup>30, 31</sup> reportando valores de odds ratio (OR) hasta de 6.02 en niños de 6 a 13 años.<sup>21</sup>

Skeie y colaboradores<sup>32</sup> demostraron que la aparición de caries en los molares temporales sitúa al niño en el grupo de riesgo de presentar caries en la dentición permanente, con un mayor valor predictivo del segundo molar deciduo. Lo anterior puede ser corroborado con el estudio de Leroy et al.,<sup>33</sup> en el cual se concluyó que si los dos molares primarios presentaban caries y el niño tenía una higiene oral deficiente, existía un riesgo elevado de que se formara una cavidad en el primer molar permanente, entre uno y dos años después de su erupción. Además, se sabe que la experiencia de caries en los molares temporales puede provocar alteraciones en el orden de erupción de los órganos dentarios permanentes (caninos, premolares y segundos molares)<sup>34</sup> y que la pérdida temprana de los molares primarios puede ocasionar dificultad para masticar y falta de espacio para la dentición permanente.<sup>35</sup>

#### **1.2.4. Prevención de la Caries Dental**

Las estrategias actuales para prevenir la caries dental contemplan: el combate de los microorganismos que inducen la caries, a través de la higiene oral personal, utilizando dentífricos efectivos, cepillos de dientes de diseño mejorado e hilo dental, así como técnicas de cepillado adecuadas; el control de la dieta y la sustitución de los ingredientes que promueven la caries por otros con menor potencial cariogénico; el incremento de la resistencia del diente mediante el uso de fluoruros adicionados en el agua potable, la sal de mesa y otros productos tópicos y sistémicos destinados para este fin; y el sellado de fosas y fisuras.<sup>36</sup> Para que exista una verdadera prevención de la caries o una reversión efectiva de las lesiones cariosas, deben predominar los factores preventivos por encima de los factores patológicos (función salival reducida, presencia de bacterias cariogénicas, consumo frecuente de carbohidratos fermentables, etc.).<sup>37</sup>

---

---

Mundialmente se reconoce que la fluoración, como medida de prevención a nivel colectivo, ha disminuido en gran medida la prevalencia de caries dental.<sup>38-41</sup> El fluoruro actúa mediante mecanismos tópicos para atacar la caries: evita la desmineralización, mejora la remineralización e inhibe a las enzimas bacterianas.<sup>37</sup> Además, la incorporación de los iones fluoruro en el diente estabiliza los cristales de hidroxiapatita y los vuelve más resistentes a la disolución, facilitando su precipitación.<sup>11</sup> En México, la adición de fluoruro a la sal de consumo humano como vía sistémica única es la medida de protección específica masiva contra la caries dental y se encuentra regulada en la Norma Oficial Mexicana NOM-040-SSA1-1993.<sup>42</sup>

Algunas opciones novedosas para el tratamiento preventivo de la caries dental que están actualmente en investigación para comprobar su eficacia y seguridad son: selladores proximales, dispositivos de liberación retardada de fluoruro, métodos para liberar fosfato de calcio amorfo, terapias con ozono y métodos para incrementar la resistencia del esmalte a la desmineralización, incluyendo la irradiación con láser.<sup>43</sup>

---

---

### 1.3. Tecnología Láser

#### 1.3.1. Generalidades del Láser

“Láser” es el acrónimo de “light amplification by stimulated emission of radiation” (amplificación de la luz por la emisión estimulada de la radiación). En 1917, Einstein escribió en “Zur Quantentheorie der Strahlung” (Sobre la Teoría Cuántica de la Radiación) acerca de la emisión estimulada de energía radiante, que es el principio en el que se basa la amplificación de la luz en el láser.<sup>44</sup> En 1958, Schawlow y Townes<sup>45</sup> diseñaron un sistema que podría funcionar con longitudes de onda del espectro visible e infrarrojo y el primer láser, con medio activo de rubí, fue construido por Maiman<sup>46</sup> en 1960. Poco tiempo después, muchos otros tipos de láser fueron inventados: láser de uranio (1960); láser He-Ne (1961); láser semiconductor (1962); láseres Nd:YAG, argón y CO<sub>2</sub> (1964).<sup>47</sup>

“El dispositivo láser consiste en un medio activo que estimula la emisión de fotones, contenido entre dos espejos, uno de los cuales es capaz de transmitir parcialmente la luz. Cuando se aplica energía al medio, más átomos del medio alcanzan un estado excitado. Un fotón que golpea un átomo en el estado excitado, provocará su caída a un estado de energía más bajo y la liberación de un fotón con la misma longitud de onda, que viaja en la misma dirección, y en fase con el primer fotón – este proceso es la emisión estimulada”.<sup>48</sup>

La amplificación es posible porque las ondas de luz que viajan a través de la cavidad del láser que contiene el medio activo están en fase; estas ondas son reflejadas en los espejos colocados en ambos extremos de la cavidad y atraviesan de un lado al otro, estimulando la emisión de cada vez más y más fotones.<sup>49</sup> La longitud de onda del fotón emitido depende del estado de energía del electrón cuando se libera el fotón, y en particular, la longitud de onda específica de cada dispositivo láser determina sus propiedades.<sup>50</sup>

La emisión monocromática, la coherencia y la colimación o baja divergencia, son las tres características principales del rayo láser que han sido aprovechadas para distintos fines en el ámbito médico.<sup>51</sup> En la actualidad existen múltiples aplicaciones del láser, sobre todo en otorrinolaringología, oftalmología, urología, dermatología y cirugía.<sup>48, 52-54</sup>

---



### 1.3.2. Aplicaciones del Láser en Odontología

Goldman et al.<sup>55</sup> y Stern y Sognaes<sup>56</sup> fueron los primeros en describir los efectos del láser en el tejido dental al irradiar esmalte y dentina con el láser rubí. Pero no fue sino hasta 1989 que Myers y colaboradores<sup>57</sup> desarrollaron el primer láser para uso odontológico, consistente en un medio activo Nd:YAG e indicado para su uso exclusivo en tejidos blandos. Otros láseres que ya eran utilizados en el área médica fueron adaptados para su uso en Odontología y comercializados a inicios de los años noventa, entre los cuales destacan los láseres de argón, CO<sub>2</sub> y de diodos.<sup>47</sup>

Algunas de las aplicaciones actuales de los láseres de uso dental se describen en la Tabla 1.

**Tabla 1. Características de los láseres utilizados en Odontología**

Tipo de láser		Longitud de onda	Aplicaciones
Gas	CO <sub>2</sub>	10,600 nm	Incisión y ablación de tejidos blandos; detección de caries en fisuras por cambios ópticos; blanqueamiento fototérmico; desepitelización para asistir la regeneración; recubrimiento pulpar directo; secado del conducto radicular.
	Argón	457 a 502 nm	Incisión y ablación de tejidos blandos; curado de resinas; blanqueamiento.
		488 nm	Detección de caries dental por fluorescencia láser.
		515 nm	Blanqueamiento fotoquímico.
		488 y 515 nm	Desinfección de la bolsa periodontal y el canal radicular; cirugía menor de tejidos blandos.
He-Ne	633 nm	Desinfección fotoactivada de bolsas.	
Sólido	Nd:YAG	1,064 nm	Incisión y ablación de tejidos blandos (excelente homeostasis); remoción de caries incipiente; desinfección de la bolsa periodontal y del canal radicular.
	Er:YAG	2,940 nm	Remoción de caries y cálculos; desinfección de la bolsa periodontal; desepitelización para asistir la regeneración; recubrimiento pulpar directo; preparación del canal radicular; remoción del barrillo dentinario; preparación de cavidades en esmalte y dentina; corte del hueso; cirugía menor de tejido blando (baja homeostasis).
	Er,Cr:YSGG	2,780 nm	Remoción de caries, preparación de cavidades; grabado del esmalte; desinfección de la bolsa periodontal; desepitelización para asistir la regeneración; preparación del canal radicular; remoción del barrillo dentinario; corte del hueso; cirugía menor de tejido blando.
	Diodo (semiconductor)	633 y 655 nm	Monitoreo del flujo sanguíneo pulpar.
		655 nm	Detección de caries dental y cálculos subgingivales por fluorescencia láser.
		635, 670 y 830 nm	Desinfección fotoactivada de bolsas.
		810 a 980 nm	Blanqueamiento fototérmico, desinfección de la bolsa periodontal.
	904 nm	Incisión y ablación de tejidos blandos.	

Tabla adaptada de Dederich y Bushick,<sup>58</sup> Walsh.<sup>59</sup>

---

Los mecanismos por medio de los cuales actúa el láser en los diferentes tejidos orales son muy diversos. Cuando el rayo láser es absorbido se convierte en calor, y dependiendo de la composición del tejido y del tiempo de exposición, el aumento de temperatura puede inducir cambios en la estructura y la composición del diente, que abarcan desde la desnaturalización hasta la vaporización y la carbonización, e incluso la fusión seguida por recristalización en el caso de los tejidos duros.<sup>58</sup>

### 1.3.3. Tecnología Láser en la Prevención de la Caries Dental

Los estudios de Stern y cols.<sup>56, 60</sup> demostraron que la exposición *in vitro* del esmalte humano al láser rubí, aumenta la resistencia a la desmineralización.<sup>61</sup> En investigaciones posteriores se confirmó lo anterior al irradiar esmalte con los láseres Argón,<sup>62, 63</sup> CO<sub>2</sub>,<sup>64-68</sup> Nd:YAG<sup>68-70</sup> y Er:YAG.<sup>70-72</sup> Lo cual indica que estos láseres tienen la capacidad potencial de prevenir la formación de lesiones cariosas causadas por la acción de los ácidos producidos por las bacterias del biofilm dental. Algunos estudios *in vitro* en dientes temporales han mostrado que la irradiación con láser puede proteger al esmalte del ataque cariogénico<sup>70, 73</sup> o reducir la profundidad de las lesiones cariosas inducidas artificialmente.<sup>74</sup>

Como se mencionó anteriormente, cuando el rayo láser penetra en los tejidos se produce un efecto fototérmico, que teóricamente puede provocar distintos fenómenos que contribuyen a que el esmalte se vuelva más resistente a la disolución ácida y al desarrollo de la caries dental:

- 1) Liberación de carbonato (con una relación directa entre la pérdida de CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> y la resistencia ácida en el esmalte irradiado).<sup>75, 76</sup>
  - 2) Bloqueo de las vías de difusión de los iones por desnaturalización parcial de la matriz orgánica de los espacios inter- e intraprismáticos.<sup>77, 78</sup>
  - 3) Disminución en la permeabilidad del esmalte por efecto de la fusión y la recristalización del esmalte.<sup>60</sup>
  - 4) Formación de pirofosfatos.<sup>79</sup>
  - 5) Disminución de la carga bacteriana en la superficie irradiada (efecto bactericida).<sup>80, 81</sup>
  - 6) Formación de “microespacios” en el esmalte debido a la disminución de los componentes orgánicos, agua y carbonatos que provoca la contracción del eje alfa; los iones liberados al medio por la acción ácida pueden ser captados de nuevo por estos “microespacios”.<sup>82</sup>
-

---

### 1.3.4. Láser Er:YAG

El láser Er:YAG (Erbio:Itrio-Aluminio-Granate) tiene una longitud de onda de 2940 nm (infrarrojo medio), que es bien absorbido por las moléculas de agua e hidroxiapatita,<sup>83, 84</sup> lo cual lo hace potencialmente útil en el tratamiento de los tejidos duros del diente. En 1997, la FDA aprobó la comercialización del primer láser Er:YAG para ser utilizado en tejidos blandos y duros en la preparación de cavidades.<sup>85</sup> Posteriormente se ha evaluado su seguridad y efectividad en la remoción de caries, preparación de cavidades y grabado del esmalte, obteniéndose resultados favorables.<sup>85</sup> El mecanismo de ablación de los tejidos mediante láser Er:YAG tiene que ver con su selectividad para ser absorbido por el agua. Cuando el rayo penetra los tejidos duros del diente, la temperatura aumenta y el calor generado provoca la evaporación del agua, lo cual aumenta la presión interna del tejido que causa una expansión explosiva denominada “microexplosión”.<sup>50, 86, 87</sup>

En cuanto a la prevención de la caries dental mediante el tratamiento con láser Er:YAG, aún no se ha llegado a conclusiones contundentes debido a las divergencias en las investigaciones realizadas. Algunos autores han señalado que la irradiación con láser Er:YAG aumenta la resistencia del esmalte al ataque ácido y previene su desmineralización,<sup>71, 88-91</sup> e incrementa la captación de fluoruro.<sup>72</sup> Por el contrario, Kameyama et al.<sup>92</sup> argumentaron que la irradiación de la dentina con este láser no previene el ataque ácido; y Rodríguez-Vilchis et al.<sup>93</sup> y Apel et al.<sup>94</sup> observaron daños importantes en el esmalte irradiado con láser Er:YAG a densidades de energía subablativas, incluyendo cráteres y fracturas, lo cual contrarresta el beneficio potencial del láser en la resistencia a la desmineralización.

También se ha cuestionado si la irradiación con el láser Er:YAG debe realizarse con o sin irrigación con agua. Hossain y colaboradores<sup>95</sup> concluyeron que aparentemente en ambas condiciones el láser es efectivo en la prevención de la caries dental.

Castellan et al.,<sup>70</sup> evaluó la resistencia ácida en dientes temporales tratados con láser Er:YAG, concluyendo que, a las condiciones de irradiación empleadas en los primeros molares primarios (2 Hz, 60 mJ, 40.3 J/cm<sup>2</sup>), aumentó la resistencia del esmalte a la desmineralización. Sin

---

embargo, los cambios morfológicos microscópicos producidos por el láser no fueron evaluados en dicho estudio.

Otros estudios en dentición decidua en los que se ha evaluado el efecto del láser Er:YAG se han enfocado en el tratamiento de la caries dental, preparación de cavidades y la ablación en fosas y fisuras.<sup>96-101</sup> La percepción del láser Er:YAG por parte de los pacientes es buena, como se concluyó en un ensayo clínico en el que la mayoría de las personas prefirieron este sistema láser al método convencional de preparación cavitaria.<sup>102</sup> Además, en otros dos estudios<sup>103, 104</sup> con niños que requerían tratamiento en los tejidos duros del diente, alrededor del 90% de los pacientes calificó al láser Er:YAG como tolerable y aceptable, además de que el tratamiento fue efectivo de acuerdo a la indicación terapéutica requerida en cada caso.

---

---

# **Planteamiento del Problema**

---

---

## 2. Planteamiento del Problema

La caries dental es una enfermedad con una alta prevalencia en el mundo, y particularmente el 90% de la población mexicana ha padecido esta afección.<sup>105</sup> Los efectos negativos que pueden ser provocados por la caries incluyen dolor, halitosis, deterioro de la apariencia estética y dificultades en el habla y la masticación;<sup>27</sup> problemas que comprometen el estado general de salud y el desarrollo armónico del paciente.

Actualmente, las estrategias preventivas se han enfocado en gran medida a la población infantil, pues se ha demostrado que la presencia de caries en la dentición temporal es causa de malnutrición y problemas permanentes en el crecimiento y el desarrollo,<sup>28</sup> además de que predispone la aparición de esta enfermedad en la dentición permanente debido al ambiente cariogénico generado.<sup>13, 21-25</sup> Se sabe que la pérdida temprana de los molares temporales puede ocasionar pérdida de espacio para la dentición permanente,<sup>35</sup> o inclusive alteraciones en el orden de erupción de estos órganos dentarios.<sup>34</sup> Sin embargo, a pesar de los esfuerzos que se han realizado hasta ahora por controlar la enfermedad, existe la necesidad de evaluar los mecanismos de acción de nuevas y efectivas estrategias de prevención que mejoren la estructura dental sin depender de la cooperación del paciente.

La tecnología láser se presenta como una de estas nuevas opciones potenciales en la prevención de la caries dental, pero existe incertidumbre y controversia en cuanto a su utilización para este fin. En particular, se ha cuestionado la efectividad del láser Er:YAG, pero no existen estudios contundentes que avalen que el esmalte irradiado aumenta su resistencia al ataque ácido sin presentar daños colaterales como fracturas, cráteres y prismas expuestos como resultado del efecto térmico. Además, los efectos del láser Er:YAG en la prevención de caries de la dentición temporal han sido poco estudiados.

Cabe mencionar que para poder evaluar los cambios morfológicos y químicos en los dientes irradiados con este láser, es necesario conocer a profundidad las características que definen a un diente sano sin tratamiento. A pesar de que existe información al respecto en dientes temporales, en escasos trabajos se utilizan técnicas de caracterización actuales para evaluar integralmente la morfología, composición química y estructura del esmalte decíduo.

---

**Pregunta de Investigación:**

¿Cómo son la morfología, composición química, estructura y las fases cristalinas que caracterizan la superficie del esmalte de los dientes temporales humanos sanos y qué cambios morfológicos y químicos son producidos en éste por la irradiación con láser Er:YAG, la aplicación de fluoruro y el tratamiento combinado, así como los efectos inducidos por la disolución ácida en las superficies tratadas *in vitro*?

---

---

# Hipótesis

---



---

### 3. Hipótesis

#### Hipótesis de Investigación

##### *Fase I*

- La morfología de la superficie del esmalte de los dientes temporales sanos será predominantemente lisa al ser observada mediante microscopía electrónica de barrido.
- No habrá diferencias significativas entre los dientes incisivos y los dientes caninos en cuanto a los porcentajes atómicos (%at) de los elementos químicos que componen al esmalte y las relaciones Ca/P.
- Las fases cristalinas que se encontrarán en el esmalte serán hidroxiapatita y apatita carbonatada.
- El esmalte contendrá carbonatos, fosfatos y amidas en su estructura.
- La relación promedio entre  $\text{Ca}^{2+}$  unido a  $\text{PO}_4^{3-}$  y  $\text{Ca}^{2+}$  unido a  $\text{OH}^-$  será 9:1 en el esmalte de los dientes incisivos y caninos sanos.

##### *Fase II*

- A mayor densidad de energía utilizada en la irradiación con láser Er:YAG, los daños en la superficie del esmalte (cráteres, prismas expuestos, fracturas y evidencias morfológicas de fusión) serán mayores.
  - El %at de C será menor en las superficies de esmalte irradiadas con láser Er:YAG que en las no irradiadas.
  - El %at de O será menor en las superficies con aplicación de fluoruro que en aquellas en las que este producto no sea aplicado.
-

- El %at de F será mayor en aquellos dientes irradiados con láser Er:YAG y posteriormente tratados con fluoruro que en los que únicamente se aplique fluoruro.
  - No existirán diferencias significativas en el %at de Ca y P en la superficie del esmalte de los dientes temporales: a) irradiados con láser Er:YAG, b) tratados con fluoruro, así como c) irradiados y posteriormente tratados con fluoruro.
  - Después de la prueba de disolución ácida, el %at de Ca y P será mayor en la superficie del esmalte de los dientes irradiados con láser Er:YAG, que en la superficie de los dientes sin tratamiento (no irradiados y no tratados con fluoruro).
-

---

# Objetivos

---

---

## 4. Objetivos

### Objetivo General

Determinar la morfología, composición química, estructura y las fases cristalinas características de la superficie del esmalte de los dientes temporales humanos sanos y evaluar los cambios morfológicos y químicos producidos en éste por la irradiación con láser Er:YAG, la aplicación de fluoruro y el tratamiento combinado, así como los efectos inducidos por la disolución ácida en las superficies tratadas *in vitro*.

### Objetivos Específicos

#### *Fase I*

- Describir y analizar la morfología observable al microscopio electrónico de barrido en la superficie del esmalte de los dientes temporales sanos incisivos y caninos.
  - Determinar semicuantitativamente los %at de C, O, P, Ca, N y elementos traza que componen al esmalte de los dientes incisivos y caninos y calcular las relaciones Ca/P.
  - Determinar las fases cristalinas que componen al esmalte dental, así como los sistemas cristalinos, grupos espaciales, dimensiones de la celda unitaria y tamaño de cristalita de cada una de éstas.
  - Analizar los grupos funcionales que componen al esmalte dental temporal, sus bandas características y calcular las relaciones carbonato (tipo A o tipo B)/fosfato.
  - Establecer las energías de enlace (eV) correspondientes a los elementos que componen al esmalte y calcular las relaciones promedio entre  $\text{Ca}^{2+}$  unido a  $\text{PO}_4^{3-}$  y  $\text{Ca}^{2+}$  unido a  $\text{OH}^-$  en la capa más superficial de éste (~5nm).
-

---

*Fase II*

- Describir y analizar la morfología observable al microscopio electrónico de barrido en el esmalte de los molares temporales: a) no irradiados y sin aplicación de fluoruro, b) con aplicación de fluoruro, c) irradiados con láser Er:YAG a distintas densidades de energía, así como d) irradiados con láser Er:YAG a diferentes densidades de energía y posteriormente tratados con fluoruro; antes de los tratamientos mencionados, después de los tratamientos y después de la disolución ácida.
  - Determinar semicuantitativamente los %at de C, O, F, elementos traza, Ca y P de la superficie del esmalte de los molares temporales: a) no irradiados y sin aplicación de fluoruro, b) con aplicación de fluoruro, c) irradiados con láser Er:YAG a distintas densidades de energía, así como d) irradiados con láser Er:YAG a diferentes densidades de energía y posteriormente tratados con fluoruro; antes de los tratamientos mencionados, después de los tratamientos y después de la disolución ácida.
  - Evaluar si la captación de fluoruro es mayor en los dientes previamente irradiados con láser Er:YAG que en aquellos no irradiados.
-

---

# **Justificación**

---

---

## 5. Justificación

La caries dental es la enfermedad crónica más común en la infancia, puede afectar la salud general de los pacientes y representa problemas socioeconómicos para muchas poblaciones a nivel mundial. Es por ello que el conocimiento a profundidad del esmalte deciduo sano es requerido para mejorar las estrategias de prevención y tratamiento, incluyendo la síntesis de nuevos materiales bioactivos.

Específicamente, el esmalte dental temporal tiene características únicas relacionadas con las funciones y la permanencia en boca de la dentición decidua, condiciones que deben ser tomadas en cuenta para el cuidado dental pediátrico. Sin embargo, la mayoría de los estudios han sido enfocados principalmente a la dentición permanente o a dientes temporales con algún proceso patológico. Existen pocos estudios actuales con respecto a la caracterización del esmalte temporal sano. Además, en estos estudios la caracterización del esmalte se efectúa utilizando solamente una técnica o en muestras reducidas, lo cual no es suficiente para estudiarlo de manera amplia y profunda.

Por estas razones, en una primera fase el presente trabajo tuvo como parte de su objetivo realizar una evaluación exhaustiva acerca del esmalte deciduo sano utilizando una amplia variedad de técnicas de caracterización para fortalecer el estado del arte en este tópico de la Odontología Pediátrica, incluyendo Microscopía Electrónica de Barrido (SEM, por sus siglas en inglés) para morfología; Espectroscopía de Rayos X por Dispersión de Energía (EDS, por sus siglas en inglés) y Espectroscopía Fotelectrónica de Rayos X (XPS, por sus siglas en inglés) para determinar la composición química del esmalte; Difracción de Rayos X (XRD, por sus siglas en inglés) para la estructura cristalina; y finalmente, Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) para estudiar los grupos químicos.

Por otra parte, en la actualidad se buscan nuevas estrategias centradas en la prevención de la caries dental, considerando que es mejor actuar antes que después de que ya se ha iniciado la enfermedad o en etapas avanzadas de ésta, pues los tratamientos restauradores son cada vez más complicados y costosos y el paciente en cierto punto incluso podría llegar a perder los órganos dentarios. La irradiación del esmalte dental con el láser Er:YAG se presenta como una de estas

---

opciones potenciales para prevenir la formación de la caries, ya que distintos autores han reportado que incrementa la resistencia a la disolución ácida. Adicionalmente, existen estudios que soportan la idea de que la irradiación con este láser promueve la captación de fluoruro de los productos tópicos, aumentando su efecto preventivo.

Sin embargo, se carece de investigaciones que respalden la seguridad y efectividad del láser Er:YAG en la prevención de caries. Además, no existe información suficiente con respecto a la acción del láser Er:YAG utilizado para este fin en los dientes temporales; de hecho, de acuerdo a la revisión bibliográfica realizada, únicamente se encontró un reporte científico.<sup>70</sup>

Por consiguiente, en una segunda fase se evaluaron *in vitro* los cambios morfológicos y químicos en el esmalte temporal producidos por la irradiación con láser Er:YAG, la aplicación de fluoruro y el tratamiento combinado; sometiendo a los dientes a un proceso de disolución ácida posterior a los tratamientos. Lo anterior fue útil para determinar si las condiciones empleadas garantizaban la inocuidad y efectividad de los tratamientos y si éstos podrían ser potencialmente adecuados para la prevención de la caries dental.

---



---

# **Material y Métodos**

---

## 6. Material y Métodos

### 6.1. Diseño de Estudio

El estudio fue dividido en dos fases, como se muestra en la Figura 1.

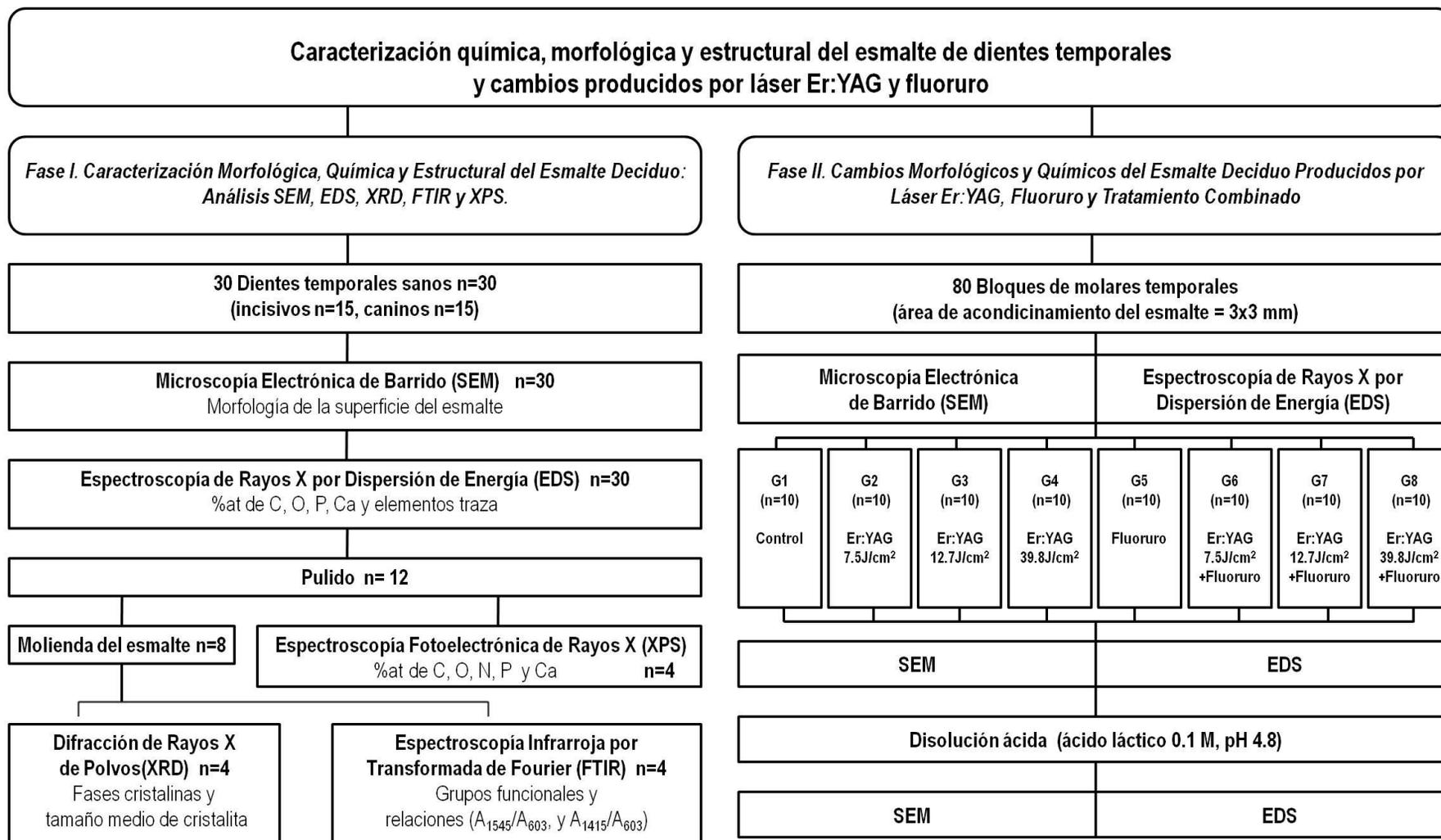


Figura 1. Diagrama del Diseño del Estudio

**Tipo de Estudio***Fase I*

Observacional descriptivo, prospectivo, transversal.

*Fase II*

Experimental, prospectivo, longitudinal.

**Universo***Fase I*

Dientes incisivos y caninos temporales de niños residentes en el Estado de México.

*Fase II*

Molares temporales de niños residentes en el Estado de México.

**Método de Muestreo**

En ambas fases el muestreo fue probabilístico, aleatorio simple.

**Tamaño de Muestra***Fase I*

El tamaño de la muestra fue de 30 dientes temporales (15 incisivos y 15 caninos).

*Fase II*

El tamaño de la muestra fue de 80 bloques provenientes de 40 molares temporales, con un área de acondicionamiento de 3x3 mm.

---

## 6.2. Criterios de Inclusión y Eliminación

### Criterios de Inclusión

#### *Fase I*

En el estudio se incluyeron órganos dentarios temporales erupcionados:

- incisivos y caninos, superiores e inferiores, exfoliados o extraídos por persistencia en la cavidad bucal.
- sin caries, fracturas, obturaciones o daños observables a simple vista.
- sin fluorosis dental.
- no seccionados durante la extracción quirúrgica (en los casos de persistencia).
- que en la prueba de DIAGNOdent® presentaron un valor de 0 a 13 (materia sana).

#### *Fase II*

En el estudio se incluyeron bloques de molares temporales erupcionados:

- superiores e inferiores, extraídos por persistencia en la cavidad bucal.
- sin caries, fracturas, obturaciones o daños observables a simple vista.
- sin fluorosis dental.
- no seccionados durante la extracción quirúrgica.
- que en la prueba de DIAGNOdent® presentaron un valor de 0 a 13 (materia sana).

### Criterios de Eliminación

#### *Fase I y Fase II*

Se eliminaron del estudio los órganos dentarios y bloques que sufrieron daños y/o fracturas durante la preparación de la muestra.

---

---

## 6.3. Procedimientos

### 6.3.1. Procedimientos de la *Fase I*

#### **Selección de los dientes y preparación de las muestras**

Los órganos dentarios temporales incisivos y caninos, exfoliados o extraídos por persistencia en la cavidad bucal, se obtuvieron de pacientes de las Clínicas de Ortodoncia y Odontopediatría de la Facultad de Odontología de la UAEM y del Centro de Especialidades Odontológicas del Instituto Materno Infantil del Estado de México (IMIEM). Los dientes recolectados no presentaron evidencia obvia de caries, fluorosis, fracturas u obturaciones. Las donaciones se realizaron mediante previo consentimiento informado de alguno de los padres/tutores del paciente y asentimiento informado de los menores de edad (Ver Anexos 1 y 2). Los dientes fueron colocados sin ser enjuagados en un frasco con timol al 0.2% inmediatamente después de su recolección y posteriormente fueron transportados en un lapso de 15 días al laboratorio del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Odontología “Dr. Keizaburo Miyata”.

La limpieza de los órganos dentarios se realizó con agua deionizada, retirando con un bisturí los restos de tejidos blandos. Los molares fueron cepillados delicadamente con un cepillo suave (Sulcus, Oral-B, México) y enjuagados con agua deionizada. El almacenamiento se realizó a 4°C en solución de timol al 0.2% hasta la realización de los análisis.

Los órganos dentarios fueron removidos de la solución, enjuagados con agua deionizada y secados con aire libre de aceite de una jeringa triple. Los dientes fueron examinados con el dispositivo DIAGNOdent® pen (KaVo, Biederach, Alemania) y 30 dientes sanos (15 incisivos y 15 caninos) con valores entre 0 y 13 fueron seleccionados para su caracterización. La secuencia de los procedimientos y técnicas aplicados se muestran en la Figura 1.

#### **Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)**

Los especímenes fueron fijados a un portamuestras de aluminio con cinta doble cara adhesiva de carbón (SPI Supplies, EUA). La aplicación de una capa conductora no fue requerida, ya que el análisis se efectuó en el Modo de Bajo Vacío (25 Pa de presión en la cámara). Cierta superficie de esmalte de la cara bucal fue elegida al azar en cada diente y se observó en el microscopio

---

---

electrónico de barrido (JEOL, JSM-6510LV, Japón) a tres magnificaciones diferentes (200x, 600x y 1200x), con un voltaje de aceleración de 15-20 kV y utilizando el detector de electrones retrodispersados. La morfología de la superficie del esmalte dental fue descrita.

### **Espectroscopía de Rayos X por Dispersión de Energía (EDS)**

La misma superficie de cada diente fue visualizada mediante SEM a una magnificación estandarizada de 100x a una distancia de trabajo de 10 mm y toda el área de la imagen fue seleccionada para determinar los porcentajes atómicos (%at) de C, O, P, Ca y elementos traza, utilizando un sistema detector de rayos X (Oxford Instruments, 7582, Reino Unido) acoplado al microscopio electrónico de barrido. El software INCAEnergy (Oxford Instruments, Reino Unido) fue utilizado para determinar la composición química.

### **Pulido**

La superficie de esmalte de cada diente fue pulida por 5 minutos con una copa de goma montada en una pieza de mano de baja velocidad de la unidad dental (KaVo, Biederach, Alemania) y bajo irrigación constante con agua deionizada. No se utilizaron sustancias abrasivas en este procedimiento.

### **Molienda del esmalte**

Los dientes fueron fracturados con el pistilo de un mortero de ágata, con el único propósito de dejar la dentina expuesta. Un micromotor con fresa redonda fue usado para remover la dentina y en los casos requeridos los dientes fueron fracturados de nuevo para tener acceso a las áreas que aún contenían dentina. En los casos necesarios, las raíces remanentes fueron cortadas con el micromotor utilizando un disco de carburo. Los especímenes fueron observados en el microscopio estereoscópico para asegurar la completa remoción de la dentina. Las piezas de esmalte fueron lavadas sacudiéndolas en agua deionizada para eliminar el polvo residual de dentina y fueron secadas al aire. Finalmente, el esmalte depurado fue molido con el mortero de ágata hasta que se obtuvo un polvo fino.

### **Difracción de Rayos X de Polvos (XRD)**

El polvo de cada espécimen fue colocado en un portamuestras circular de vidrio y fue analizado en un difractómetro de rayos X de polvos (D8 Advance, Bruker, Alemania). Las condiciones

---

---

fueron las siguientes: radiación  $\text{CuK}\alpha$ , poder de la fuente de rayos X de 1050 W (35 kV, 30 mA), detector angular, rango de  $2\theta$  de  $7^\circ$  a  $67^\circ$  con un tamaño de paso de  $0.02^\circ$  y 0.5 segundos por paso. Se aplicó un factor de suavizado de 0.1 para mejorar la definición de los picos. Las fases cristalinas y estructuras, el grupo espacial y el tamaño de cristalita (utilizando el método de Scherrer) fueron determinados con el programa EVA 13, perteneciente al paquete de software DiffracPlus Basic Evaluation Package (Bruker, Alemania).

### **Espectroscopía de Rayos X por Transformada de Fourier (FTIR)**

Inicialmente, para cada diente analizado, 5 mg de polvo de esmalte fueron mezclados con 100 mg de KBr en un mortero de ágata y se fabricaron pellets transparentes a la luz visible en una prensa hidráulica manual aplicando una presión de  $8.0 \text{ ton/cm}^2$ . Los espectros de FTIR fueron registrados con un espectrómetro Avatar 360 (Thermo Nicolet, EUA). El ruido de fondo se corrigió restando el espectro del aire y las iteraciones fueron realizadas 32 veces en la región de  $200\text{-}4000 \text{ cm}^{-1}$  con una resolución de  $8 \text{ cm}^{-1}$ . Las bandas espectrales fueron analizadas con el software OMINC- Macro Basic v6.2 (Thermo Nicolet, EUA) para asignar los grupos funcionales correspondientes. La absorbancia en las bandas de carbonato (Tipos A y B) y fosfato fue medida partiendo de una línea base previamente trazada.

### **Espectroscopía Foelectrónica de Rayos X (XPS)**

Primero, los órganos dentales fueron cortados para obtener una sección de 2.0 mm de cada muestra, apropiada para el análisis de XPS. Para este fin, se aplicó adhesivo de autograbado (Adper Easy One 3M ESPE, EUA) a la dentina de la cámara pulpar, se fotopolimerizó y la cavidad se rellenó con resina autopolimerizable (Unitek 3M, EUA) con la finalidad de tener un mejor soporte. Después, la corona se fijó con resina epóxica termoplástica (Allied, EUA) a un portaobjetos de vidrio situado sobre una plancha caliente (Corning, USA). Cada portamuestras se colocó en una cortadora (South Bay Technology Inc., EUA) y el corte se realizó paralelo a la superficie bucal del diente (aprox. 2 mm de ancho) con una rueda de diamante (South Bay Inc., EUA) bajo irrigación constante con agua.

Subsecuentemente, las muestras fueron secadas al aire, fijadas a portamuestras de aluminio con cinta adhesiva de carbón y fueron analizadas químicamente con un equipo XPS (JEOL XPS-9200, Japón). El área de análisis fue de 1 mm de diámetro en el centro de la superficie bucal de

---

---

esmalte. La presión en la cámara de alto vacío fue de al menos  $10^{-7}$  Pa. Una fuente de rayos X  $MgK\alpha$  fue utilizada a 200 W de potencia de salida. Las posiciones de los picos fueron calibradas tomando como referencia el valor de 284.5 eV para el pico de C-C, C-H en el espectro de C 1s. Se obtuvieron datos cualitativos y semicuantitativos (%at) para C 1s, N 1s, O 1s, Ca 2p y P 2p de sus respectivos espectros de alta resolución. La deconvolución del espectro XPS de calcio también se realizó para determinar las posibles interacciones de este elemento con otros átomos en la estructura del esmalte. El libro “Handbook of X-ray Photoelectron Spectroscopy” (JEOL, Japón) y la base de datos “NIST XPS Database, Version 3.5” (NIST, EUA) fueron usados como referencia de las energías de enlace (eV) características relacionadas a cada orbital atómico de los elementos estudiados.

### **6.3.2. Procedimientos de la Fase II**

#### **Selección de los dientes y preparación de las muestras**

Molares temporales extraídos por retención prolongada, sin evidencia obvia de caries, sin fluorosis ni fracturas u obturaciones, fueron obtenidos mediante el mismo procedimiento de consentimiento y asentimiento informado que en la *Fase I* del presente estudio, tomando en cuenta las mismas consideraciones en la recolección y con la participación del personal y pacientes de las clínicas antes mencionadas (Anexos 1 y 2). Inmediatamente después de la extracción, los dientes fueron recolectados en una solución de timol al 0.2% y transportados al laboratorio. Los especímenes fueron lavados con agua tridestilada, las trazas de tejido blando fueron removidas con un bisturí y las raíces remanentes fueron eliminadas con un disco de carburo del micromotor dental. Las coronas fueron cepilladas gentilmente con un cepillo suave (Sulcus, Oral-B, México) y finalmente enjuagadas con agua tridestilada. El almacenamiento se llevó a cabo a 4°C en solución de timol al 0.2% hasta su análisis.

Posteriormente, las coronas se enjuagaron con agua tridestilada y se dejaron secar al aire. Los especímenes fueron escaneados con un sistema fluorescente de detección de caries DIAGNOdent® pen (KaVo, Biederach, Alemania) y cuarenta molares fueron seleccionados para el estudio por presentar valores entre 0 y 13 (materia sana). Cada corona se fijó con una resina epóxica termoplástica (Allied, EUA) a un portaobjetos de vidrio colocado sobre una plancha caliente (Corning, EUA) y se realizó un corte mesiodistal central utilizando una cortadora de baja

---



---

velocidad con rueda de diamante (South Bay Technology Inc., EUA), mediante irrigación constante con agua tridestilada. De cada superficie bucal y lingual del molar se obtuvo un bloque con un área de esmalte de 3x3 mm. Cada bloque de esmalte fue considerado como la unidad experimental. Subsecuentemente, se realizó la limpieza de las muestras por 5 minutos en contenedores separados llenados con agua tridestilada en un baño ultrasónico (Quantrex Q140, L&R Ultrasonics, N.J., EUA) y después fueron secadas al aire.

El diagrama del diseño experimental de la *Fase II* se muestra en la Figura 1. Los análisis de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y Espectroscopía de Rayos X por Dispersión de Energía (EDS) se realizaron en tres etapas del estudio: antes del tratamiento (BT), después del tratamiento (AT) y después de la disolución ácida (AAD). Todos los procedimientos fueron realizados en unidades experimentales aisladas.

### **Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)**

Los bloques fueron fijados a portamuestras de aluminio con cinta adhesiva de carbón (SPI Supplies, EUA). El análisis se realizó usando un microscopio electrónico de barrido (JEOL, JSM-6510LV, Japón) en el modo de bajo vacío a 10 Pa de presión en la cámara, con un voltaje de aceleración de los electrones de 25 kV y detectando electrones retrodispersados. La morfología de la superficie del esmalte fue observada a una magnificación de 400x. La herramienta *scaler* del software de imagen (INCA, Oxford Instruments, Oxfordshire, Reino Unido) fue utilizada para trazar una cruz de las esquinas de la muestra cuadrada y el centro exacto de la cruz fue examinado. Con la intención de asegurar la reproducibilidad entre examinadores en cuanto a los hallazgos morfológicos, tres examinadores fueron calibrados con imágenes de SEM de esmalte seleccionadas de nuestros archivos de investigación previo al inicio del análisis de SEM (Kappa 0.95).

### **Espectroscopía de Rayos X por Dispersión de Energía (EDS)**

Toda el área visualizada en SEM a una magnificación estandarizada de 100x fue analizada para determinar los porcentajes atómicos (%at) de carbono (C), oxígeno (O), flúor (F), elementos traza (sodio + cloro + magnesio), calcio (Ca) y fósforo (P) utilizando un sistema detector de rayos X (Oxford Instruments, 7582, Reino Unido) acoplado al microscopio.

---

## Tratamientos de superficie

Ochenta bloques fueron asignados aleatoriamente a ocho grupos (n=10) y la superficie del esmalte fue acondicionada como se muestra en la Tabla 2.

**Tabla 2. Acondicionamiento de los grupos de estudio**

	Grupos							
	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8
	Control	Láser Er:YAG	Láser Er:YAG	Láser Er:YAG	Fluoruro	Láser Er:YAG + Fluoruro	Láser Er:YAG + Fluoruro	Láser Er:YAG + Fluoruro
<b>Condiciones de irradiación</b>								
Energía (mJ):	-	100	100	200	-	100	100	200
Punta de zafiro Ø (mm):	-	1.3	1.0	0.8	-	1.3	1.0	0.8
Densidad de energía (J/cm <sup>2</sup> ):	-	7.5	12.7	39.8	-	7.5	12.7	39.8
Densidad de potencia (W/cm <sup>2</sup> ):	-	1.88 x 10 <sup>4</sup>	3.18 x 10 <sup>4</sup>	9.95 x 10 <sup>4</sup>	-	1.88 x 10 <sup>4</sup>	3.18 x 10 <sup>4</sup>	9.95 x 10 <sup>4</sup>
<b>Aplicación de fluoruro</b>								
Espuma tópica de APF al 1.23%	-	-	-	-	✓	✓	✓	✓

- **Irradiación con láser Er:YAG**

La irradiación de los especímenes se realizó utilizando un sistema láser Er:YAG (OpusDuo AquaLite EC, Er:YAG + CO<sub>2</sub>, Lumenis, Yokneam, Israel) en los modos de no enfocado y no contacto, con una longitud de onda fijada a 2.94 µm, a una frecuencia de repetición de pulso de 7 Hz y una duración de pulso de 400 µs. Los niveles de energía fueron calibrados utilizando los calibradores del equipo y la energía liberada fue medida periódicamente con un medidor de potencia (LaserMate-P, Coherent Co., Santa Clara, CA, EUA). La superficie fue escaneada una vez manualmente (13 segundos) con una punta de zafiro del láser de forma perpendicular a ésta, a una distancia de trabajo de 1 mm y mediante irrigación con agua tridestilada (5 mL/min).

- **Aplicación de fluoruro**

La superficie del esmalte fue secada con aire comprimido (Falcon Safety Products, Inc., NJ, EUA). Posteriormente, los dientes fueron tratados individualmente durante 4 minutos con espuma tópica de fluoruro de fosfato acidulado (APF) al 1.23% (Butler, Sunstar Americas, Inc., IL, EUA). Después, las muestras fueron enjuagadas con agua tridestilada durante 1 minuto y

después se secaron al aire. En los grupos de tratamiento combinado (G6, G7 y G8), inmediatamente después de la irradiación con láser Er:YAG se aplicó el fluoruro bajo las condiciones previamente descritas.

### **Disolución ácida**

Las muestras fueron recubiertas con barniz resistente al ácido, excepto en el área de esmalte designada para el acondicionamiento. Cada espécimen fue sumergido individualmente en tubos de plástico conteniendo 2 mL de una solución de ácido láctico 0.1 M con un pH de 4.8 y fueron incubados a 37°C durante 24 horas.<sup>95</sup> Después de este tiempo, las muestras fueron removidas y enjuagadas con agua tridestilada.

---

## 6.4. Variables de Estudio

### Variables Independientes

**Tabla 3. Definición Conceptual y Operativa de las Variables Independientes de la Fase I**

Variable	Definición Conceptual	Definición Operativa	Tipo de Variable	Escala de Medición	Análisis Estadísticos
<b>Tipo de diente temporal</b>	Clasificación de los dientes según la forma de la corona, la posición que ocupan en la cavidad bucal y su función.	Incisivo: diente con corona plana, dispuesto en la parte anterior del arco dentario que desempeña la función de prensión y corte de los alimentos. Canino: diente con forma cónica, posicionado en la arcada entre los incisivos planos del sector anterior y los molares posteriores, que tiene la función de desgarrar los alimentos.	Cualitativa dicotómica (incisivo/canino)	Nominal	Test U de Mann-Whitney (EDS)

**Tabla 4. Definición Conceptual y Operativa de las Variables Independientes de la Fase II**

Variable	Definición Conceptual	Definición Operativa	Tipo de Variable	Escala de Medición	Análisis Estadísticos
<b>Densidad de energía</b>	Cantidad de energía por unidad de área.	Densidad de energía del láser: cantidad de energía en Joules dividida entre el área de esmalte en $\text{cm}^2$ irradiada por el láser ( $\text{J}/\text{cm}^2$ ).	Cuantitativa continua	Razón	ANOVA de una vía (comparación entre grupos) Post hoc: Bonferroni o T2 de Tamhane
<b>Fluoruro tópico</b>	Producto que es aplicado tópicamente en los órganos dentarios para incorporar iones fluoruro en el componente inorgánico del esmalte, para incrementar su resistencia a la disolución ácida.	Espuma de Fluoruro de Fosfato Acidulado (APF por sus siglas en inglés) al 1.23% que es aplicada durante 4 minutos sobre la superficie del esmalte dental.	Cualitativa dicotómica (Sí/No)	Nominal	
<b>Etapa</b>	Cada uno de los momentos o fases en los que se dividió la experimentación.	Antes del tratamiento (BT): etapa posterior a la preparación de las muestras y anterior al acondicionamiento del esmalte. Después del tratamiento (AT): etapa posterior al acondicionamiento de la superficie del esmalte. Después de disolución ácida (AAD): etapa posterior a la incubación de las muestras en ácido láctico.	Cualitativa	Nominal	ANOVA de medidas repetidas (comparación entre etapas)

## VARIABLES DEPENDIENTES

**Tabla 5. Definición Conceptual y Operativa de las Variables Dependientes de la Fase I**

Variable	Definición conceptual	Definición operativa	Tipo de variable	Escala de medición	Análisis Estadísticos
<b>Morfología</b>	Descripción de las propiedades de la forma en la superficie del esmalte.	Observación al SEM de: Esmalte “principalmente liso con algunos surcos”: aquel con escasas depresiones y hendiduras debidas al desgaste dental natural. Esmalte con “abundantes microporosidades”: aquel con gran cantidad de diminutos intersticios irregulares. Prismas expuestos: prismas que han cambiado su morfología natural debido a la eliminación de materia intra y/o interprismática.	Cualitativa	Nominal	Ninguno
<b>Carbono (C)</b>	Elemento con número atómico 6, no metal, constituyente de la matriz orgánica del esmalte y de los carbonatos ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) sustituyentes.	Porcentaje atómico de C (%at de C): número de átomos de C por cada 100 átomos contenidos en la superficie del esmalte dental; determinado mediante EDS y XPS.	Cuantitativa continua	Razón	Test U de Mann-Whitney (comparación entre tipos de dientes de los porcentajes atómicos y las relaciones molares Ca/P determinados mediante EDS)
<b>Oxígeno (O)</b>	No metal que se encuentra en el esmalte dental en su forma divalente, con número atómico 8.	Porcentaje atómico de O (%at de O): número de átomos de O por cada 100 átomos contenidos en la superficie del esmalte dental; determinado mediante EDS y XPS.	Cuantitativa continua	Razón	
<b>Fósforo (P)</b>	Elemento con número atómico 15, no metal, constituyente del esmalte dental en forma de grupos fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) con configuración tetraédrica.	Porcentaje atómico de P (%at de P): número de átomos de P por cada 100 átomos contenidos en la superficie del esmalte dental; determinado mediante EDS y XPS.	Cuantitativa continua	Razón	
<b>Calcio (Ca)</b>	Metal alcalinotérreo divalente, con número atómico 20, constituyente del esmalte dental.	Porcentaje atómico de Ca (%at de Ca): número de átomos de Ca por cada 100 átomos contenidos en la superficie del esmalte dental; determinado mediante EDS y XPS.	Cuantitativa continua	Razón	
<b>Elementos traza</b>	Elementos que se encuentran en pequeñas cantidades en el esmalte y cuya incorporación a éste depende del microambiente circundante.	Para fines del presente estudio se definió como elemento traza aquel que presentó un %at (número de átomos del elemento por cada 100 átomos contenidos en la superficie del esmalte dental) menor a 1.0 en el análisis de EDS. Estos elementos fueron sodio (Na), cloro (Cl) y magnesio (Mg).	Cuantitativa continua	Razón	
<b>Relación molar Ca/P</b>	Relación existente entre la cantidad de calcio y la cantidad de fósforo.	Resultado del cálculo del porcentaje atómico de Ca, dividido entre el porcentaje atómico de P (adimensional); determinados mediante EDS y XPS.	Cuantitativa continua	Razón	

Continúa...

**Tabla 5. Definición Conceptual y Operativa de las Variables Dependientes de la Fase I (Continuación)**

Variable	Definición conceptual	Definición operativa	Tipo de variable	Escala de medición	Análisis Estadísticos
<b>Nitrógeno (N)</b>	Elemento no metal de número atómico 7, que forma parte del contenido proteico en la superficie del esmalte.	Porcentaje atómico de N (%at de N): número de átomos de N por cada 100 átomos contenidos en la superficie del esmalte dental; determinado mediante XPS.	Cuantitativa continua	Razón	Ninguno
<b>Fase cristalina</b>	Sólido homogéneo que presenta un orden interno periódico de sus partículas reticulares, sean átomos, iones o moléculas.	Sustancia cristalina que presenta su propio espectro de difracción, permitiendo su identificación mediante la técnica de XRD.	Cualitativa	Nominal	Ninguno
<b>Sistema cristalino</b>	Forma sólida de cómo se ordenan y empaquetan los átomos, moléculas, o iones, de manera ordenada y con patrones de repetición que se extienden en las tres dimensiones del espacio.	Una de las 7 estructuras cristalinas posibles o arreglo único de átomos que presenta la celda unitaria de cada una de las fases encontradas mediante XRD en el esmalte dental.	Cualitativa	Nominal	Ninguno
<b>Grupo espacial</b>	Grupo que representa la descripción de la simetría de un cristal con cierta configuración en el espacio.	Una de las 230 combinaciones posibles de todas las operaciones de simetría de un cristal, como lo son rotaciones propias e impropias, traslaciones, reflexiones, y las operaciones del eje helicoidal y el plano de deslizamiento. Este grupo es determinado por XRD.	Cualitativa	Nominal	Ninguno
<b>Dimensiones de la celda unitaria</b>	Longitud de los lados de la celda unitaria.	Parámetros de red que hacen referencia a la longitud en Å de cada uno de los lados de la celda unitaria hexagonal ( <i>a</i> , <i>b</i> y <i>c</i> ); determinados mediante XRD.	Cuantitativa continua	Razón	Ninguno
<b>Tamaño de cristalita</b>	Tamaño promedio de un cristal individual ideal en la sustancia de un material.	Tamaño promedio de un cristal expresado en Å, que se obtiene midiendo la ampliación de la difracción de algún rayo X con reflexión plana particular dentro de la celda unitaria.	Cuantitativa continua	Razón	Ninguno
<b>Grupo funcional</b>	Conjunto de átomos responsables de la reactividad y las propiedades químicas de un compuesto.	Átomos de ciertos elementos químicos enlazados de una determinada forma que presentan una estructura y propiedades fisicoquímicas características, identificados mediante FTIR.	Cualitativa	Nominal	Ninguno
<b>Relación carbonato/fosfato</b>	Relación existente entre la absorbancia de la banda del fosfato y la del carbonato.	Resultado del cálculo de la absorbancia del carbonato (ya sea tipo A o B), dividido entre la absorbancia del fosfato (adimensional). Los valores de absorbancia son determinados en cada banda a partir de una línea base trazada en el espectro de FTIR del esmalte dental.	Cuantitativa continua	Razón	Ninguno
<b>Energía de enlace</b>	Energía total promedio que se necesita para romper un mol de enlaces dado (en estado gaseoso).	Diferencia de energía entre el electrón <i>n-1</i> del estado final y el electrón <i>n</i> del estado inicial de energía (antes de ser sometido al proceso de fotoemisión); determinada mediante XPS y expresada en eV.	Cuantitativa continua	Razón	Ninguno

**Tabla 6. Definición Conceptual y Operativa de las Variables Dependientes de la Fase II**

Variable	Definición conceptual	Definición operativa	Tipo de variable	Escala de medición	Análisis Estadísticos
<b>Morfología</b>	Descripción de las propiedades de la forma en la superficie del esmalte.	Observación al SEM de: Superficie lisa: aquella con escasas depresiones y hendiduras debidas al desgaste dental natural. Microporosidades: conjunto de diminutos intersticios irregulares existentes en el esmalte dental. Cráter: depresión pronunciada en la superficie del esmalte dental. Prismas expuestos: prismas que han cambiado su morfología natural debido a la eliminación de materia intra y/o interprismática. Fractura: ruptura que provoca la pérdida de continuidad normal del esmalte. Fusión: signo observable de que el esmalte cambió al estado líquido por efecto térmico y se solidificó al enfriarse.	Cualitativa	Nominal	Ninguno
<b>Carbono (C)</b>	Elemento con número atómico 6, no metal, constituyente de la matriz orgánica del esmalte y de los carbonatos ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) sustituyentes.	Porcentaje atómico de C (%at de C): número de átomos de C por cada 100 átomos contenidos en la superficie del esmalte dental; determinado mediante EDS.	Cuantitativa continua	Razón	a) ANOVA de una vía (comparación entre grupos) Post hoc: Bonferroni o T2 de Tamhane  b) ANOVA de medidas repetidas (comparación entre etapas)
<b>Oxígeno (O)</b>	No metal que se encuentra en el esmalte dental en su forma divalente, con número atómico 8.	Porcentaje atómico de O (%at de O): número de átomos de O por cada 100 átomos contenidos en la superficie del esmalte dental; determinado mediante EDS.	Cuantitativa continua	Razón	
<b>Flúor (F)</b>	Halógeno monovalente de número atómico 9, adicionado al esmalte dental a través de productos tópicos y sistémicos.	Porcentaje atómico de F (%at de F): número de átomos de F por cada 100 átomos contenidos en la superficie del esmalte dental; determinado mediante EDS.	Cuantitativa continua	Razón	
<b>Elementos traza</b>	Elementos que se encuentran en pequeñas cantidades en el esmalte y cuya incorporación a éste depende del microambiente circundante.	Para fines del presente estudio se definió como elemento traza aquel que presentó un %at (número de átomos del elemento por cada 100 átomos contenidos en la superficie del esmalte dental) menor a 1.0 en el análisis de EDS. Estos elementos fueron sodio (Na), cloro (Cl) y magnesio (Mg). Entre estos elementos no se incluyó al flúor por su importancia en el estudio y debido a que algunos especímenes mostraron %at. de F superiores a 1.0.	Cuantitativa continua	Razón	

**Continúa...**

**Tabla 6. Definición Conceptual y Operativa de las Variables Dependientes de la Fase II (Continuación)**

Variable	Definición conceptual	Definición operativa	Tipo de variable	Escala de medición	Análisis Estadísticos
<b>Calcio (Ca)</b>	Metal alcalinotérreo divalente, con número atómico 20, constituyente del esmalte dental.	Porcentaje atómico de Ca (%at de Ca): número de átomos de Ca por cada 100 átomos contenidos en la superficie del esmalte dental; determinado mediante EDS.	Cuantitativa continua	Razón	a) ANOVA de una vía (comparación entre grupos) Post hoc: Bonferroni o T2 de Tamhane  b) ANOVA de medidas repetidas (comparación entre etapas)
<b>Fósforo (P)</b>	Elemento con número atómico 15, no metal, constituyente del esmalte dental en forma de grupos fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) con configuración tetraédrica.	Porcentaje atómico de P (%at de P): número de átomos de P por cada 100 átomos contenidos en la superficie del esmalte dental; determinado mediante EDS.	Cuantitativa continua	Razón	
<b>Relación molar Ca/P</b>	Relación existente entre la cantidad de calcio y la cantidad de fósforo.	Resultado del cálculo del porcentaje atómico de Ca, dividido entre el porcentaje atómico de P (adimensional); determinados mediante EDS.	Cuantitativa continua	Razón	



---

## 6.5. Implicaciones Bioéticas

La presente investigación contempló los principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos de la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial (64<sup>a</sup> Asamblea General de octubre de 2013).<sup>106</sup> En el Artículo 7 de este documento se establece que “la investigación médica está sujeta a normas éticas que sirven para promover y asegurar el respeto a todos los seres humanos y para proteger su salud y sus derechos individuales”. La donación de los órganos dentarios no representó daño alguno para los sujetos participantes, pues fue posterior a la exfoliación de los órganos dentarios de acuerdo a su cronología normal o después de la extracción voluntaria de éstos por persistencia en la cavidad bucal. La decisión de extraer un órgano dentario fue siempre por prescripción fundamentada del Odontopediatra y en ningún caso se vio influenciada por terceras personas.

Además, con apego al Artículo 9, se protegió a las personas que participaron en la investigación, velando por su integridad, salud, intimidad y dignidad, resguardando su información personal en calidad de confidencial.

La participación fue voluntaria en todos los casos y cada individuo potencial recibió la información adecuada acerca del proyecto de investigación y de su colaboración en el mismo, de acuerdo al Artículo 26. Todas las dudas acerca de los objetivos, métodos, disposición de las muestras, beneficios calculados, entre otros, fueron aclaradas por el investigador o por el odontólogo tratante hasta asegurar el completo entendimiento de la información.

Asimismo, se cumplieron las leyes y reglamentos vigentes en México, destacando algunas consideraciones estipuladas en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación en Salud:<sup>107</sup>

- Según el Artículo 17, la presente investigación se considera “con riesgo mínimo”, debido a que involucró la obtención de dientes deciduales exfoliados o extraídos por indicación terapéutica.
  - El paciente menor de edad firmó un escrito de asentimiento informado, conforme a lo establecido en el Artículo 37 (Ver Anexo 1), y su representante legal y dos testigos firmaron el consentimiento informado que reúne los requisitos enunciados en el Artículo 22 (Ver Anexo 2).
-

---

Sin embargo, debido a que en las instituciones públicas de atención odontológica el número de pacientes es elevado y hay poco tiempo para firmar los documentos de consentimiento y asentimiento informado, en algunos casos se recurrió únicamente al asentimiento y consentimiento verbales.

Además, en todo momento se cuidó la integridad de los investigadores, implementando las medidas adecuadas de seguridad en el laboratorio.

### **6.6. Recolección de Datos**

Se implementó un sistema de documentación que posibilitó la recolección ordenada de los datos recabados durante la fase de experimentación. Este sistema incluyó:

- Bitácora de trabajo utilizada para llevar el registro diario de las actividades realizadas, los cálculos para la preparación de los reactivos y soluciones requeridas, métodos empleados en cada fase, instrucciones para la operación de los equipos, así como los acuerdos con los tutores durante el desarrollo del proyecto.
- Vaciado de los registros en bases de datos en hojas de cálculo (Excel), procesador de textos (Word) y software de procesamiento estadístico (SPSS).

### **6.7. Análisis Estadístico**

#### *Fase I*

Las diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes atómicos de los elementos y las relaciones molares Ca/P entre incisivos y caninos fueron analizadas utilizando la prueba  $U$  de Mann-Whitney ( $\alpha=0.05$ ), ejecutada en el software SPSS, versión 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

#### *Fase II*

El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete SPSS 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Inicialmente se efectuó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para estimar la distribución de los datos. Posteriormente, se aplicó el análisis de varianza (ANOVA) de una vía para la comparación entre grupos; cuando se encontraron diferencias significativas, se aplicó el test post hoc de

---

---

Bonferroni o T2 de Tamhane de acuerdo al resultado del test de homogeneidad de varianzas de Levene.

La prueba de ANOVA de medidas repetidas se realizó para determinar las diferencias entre etapas (antes de tratamiento, después de tratamiento y después de disolución ácida). El nivel de significancia se fijó en  $p \leq 0.05$  para todos los análisis estadísticos.

---

---

# **Resultados**

---

---

## 7. Resultados

### 7.1. Artículo Enviado – Fase I

#### Morphological, Chemical and Structural Characterization of Deciduous Enamel: SEM, EDS, XRD, FTIR and XPS Analysis

##### 7.1.1. Página frontal del manuscrito

**Title:**

Morphological, Chemical and Structural Characterization of Deciduous Enamel: SEM, EDS, XRD, FTIR and XPS Analysis

**Running Title:** Deciduous enamel characterization

**Word count:** 4443 (excluding tables, including references and figure legends)

**Authors names:**

B.Sc. CARMEN M. ZAMUDIO-ORTEGA<sup>1</sup>, Ph.D. ROSALÍA CONTRERAS-BULNES<sup>1\*</sup>, Ph.D. ROGELIO J. SCOUGALL-VILCHIS<sup>1</sup>, Ph.D. RAÚL A. MORALES-LUCKIE<sup>2</sup>, Ph.D. OSCAR F. OLEA-MEJÍA<sup>2</sup> and Ph.D. LAURA E. RODRÍGUEZ-VILCHIS<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Odontología, Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Odontología (CIEAO), Jesús Carranza esq. Paseo Tollocan, Col. Universidad, C.P. 50130, Toluca, Estado de México, México.

<sup>2</sup>Universidad Autónoma del Estado de México-Universidad Nacional Autónoma de México, Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable (CCIQS), Km 14.5 Carretera Toluca-Ixtlahuaca, San Cayetano de Morelos, C.P. 50200, Toluca, Estado de México, México.

**\* Corresponding author:**

ROSALÍA CONTRERAS-BULNES, D.D.S., Ph.D.

Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Odontología,

Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Odontología (CIEAO),

Jesús Carranza esq. Paseo Tollocan, Col. Universidad, C.P. 50130, Toluca, Estado de México, México.

Tel: (+52) 722-2124351 Ext.118; Fax: (+52)722-2126464;

e-mail: rcontrerasb@uaemex.mx; rcb0209@yahoo.com.mx

---

---

## 7.1.2. Carta de Envío

### Manuscript IJPD-01-14-4013 - International Journal of Paediatric Dentistry

1 mensaje

ijpdedoffice@wiley.com <ijpdedoffice@wiley.com>

16 de enero de 2014, 12:40

Para: rcontrerasb@uaemex.mx, rcb0209@yahoo.com.mx

Cc: carmen.ma.zamudio@gmail.com, rcontrerasb@uaemex.mx, rcb0209@yahoo.com.mx, rogelio\_scougall@hotmail.com, moralesl@uaemex.mx, oleoscar@yahoo.com.mx, rovilaster@gmail.com

16-Jan-2014

Dear Miss Contreras-Bulnes,

Your manuscript entitled "Morphological, Chemical and Structural Characterization of Deciduous Enamel: SEM, EDS, XRD, FTIR and XPS Analysis" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the International Journal of Paediatric Dentistry.

Your manuscript ID is IJPD-01-14-4013.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the editorial office with questions. If there are any changes in your mailing or e-mail addresses, please log into ScholarOne Manuscripts (formerly known as Manuscript Central) at <http://mc.manuscriptcentral.com/ijpd> and edit your user information accordingly.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Centre after logging into <http://mc.manuscriptcentral.com/ijpd>

Thank you for submitting your manuscript to the International Journal of Paediatric Dentistry.

Yours sincerely,

Jenifer Jimenez  
International Journal of Paediatric Dentistry Editorial Office

Sign up for FREE email table of contents alerts (E-Tocs). Go to <http://www.blackwellpublishing.com/IPD>

---

---

### 7.1.3. Resumen

**Antecedentes.** La caries dental es la enfermedad crónica más común en la infancia y el conocimiento profundo del esmalte temporal sano es requerido para mejorar las estrategias de prevención y tratamiento, incluyendo la síntesis de nuevos materiales bioactivos. **Objetivo.** Caracterizar la superficie del esmalte de dientes temporales sanos en términos de morfología, composición química, estructura y fases cristalinas. **Diseño.** El esmalte de 30 dientes temporales humanos fue examinado mediante: Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), Espectroscopía de Rayos X por Dispersión de Energía (EDS), Difracción de Rayos X de Polvos (XRD), Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) y Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos X (XPS). Las diferencias químicas entre incisivos y caninos fueron evaluadas estadísticamente mediante el Test U de Mann-Whitney ( $p \leq 0.05$ ). **Resultados.** Tres patrones de esmalte fueron observados. Las relaciones Ca/P fueron 1.37 y 1.03 mediante EDS y XPS, respectivamente. El tamaño de cristalita fue  $210.82 \pm 16.78 \text{ \AA}$ . La relación promedio entre Ca unido a fosfato y Ca unido a hidroxilo fue aproximadamente 10:1. **Conclusiones.** El esmalte mostró dos patrones principales (“principalmente liso con algunos surcos” y “abundantes microporosidades”) y un patrón secundario (“prismas expuestos”). Ligeras variaciones entre las relaciones molares Ca/P encontradas mediante EDS y XPS sugieren diferencias en el contenido mineral desde la superficie del esmalte hacia el interior. Las fases cristalinas encontradas fueron hidroxiapatita y apatita carbonatada, con mayor incorporación de carbonato tipo B.

### 7.1.4. Abstract

**Background.** Dental caries is the most common chronic disease in childhood and deep knowledge of the sound deciduous enamel is required to improve the prevention and treatment strategies, including the synthesis of new bioactive materials. **Aim.** To characterize the enamel surface of sound deciduous teeth in terms of morphology, chemical composition, structure and crystalline phases. **Design.** The enamel of 30 human deciduous teeth was examined by: Scanning Electron Microscopy (SEM), Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy (EDS), X-ray Powder Diffraction (XRD), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS). Chemical differences between incisors and canines were statistically evaluated by Mann-

---

---

Whitney U Test ( $p \leq 0.05$ ). **Results.** Three enamel patterns were observed. Ca/P ratios were 1.37 and 1.03 by EDS and XPS, respectively. Crystallite size was  $210.82 \pm 16.78$  Å. Mean ratio between Ca bonded to phosphate and Ca bonded to hydroxyl was approximately 10:1. **Conclusions.** Enamel showed two main patterns (“mostly smooth with some grooves” and “abundant microporosities”) and a secondary pattern (“exposed prisms”). Slight variations among the Ca/P molar ratios found by EDS and XPS, suggest differences in the mineral content from the enamel surface to the interior. Crystalline phases found were hydroxyapatite and carbonate apatite, with major type B carbonate incorporation.

### 7.1.5. Introduction

Dental enamel is a tissue with unique characteristics that allow it to interact with the oral environment. In health conditions it acts as a protective barrier against the diffusion of certain fluids and microorganisms into the dentin and pulp.

Tooth enamel is also the most highly mineralized tissue in humans, it is about 96 wt% (weight percentage) mineral, 3 wt% water and 1 wt% organic.<sup>1</sup> The mineral component is an impure form of hydroxyapatite  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$  because its lattice structure facilitates vacancies, solid solutions, substitutions and the incorporation of inorganic elements not present in the pure compound.<sup>2,3</sup> Additionally, as in other bioapatites, it shows Ca/P atomic ratios lower than 1.67, the value for stoichiometric hydroxyapatite.<sup>4</sup> On the other hand, the organic phase has a protein nature.<sup>5</sup>

Specifically, deciduous enamel has characteristics related to the functions and permanency in mouth of the temporary dentition. It is worth mentioning that primary teeth have aprismatic enamel in their surface and percentages of Ca and P lower than permanent teeth,<sup>6,7</sup> conditions that must be taken into account for paediatric dentistry care. However, most studies have been mainly focused on permanent dentition or deciduous teeth with pathological processes.<sup>8-11</sup>

Nowadays, although new technologies have been applied in dental research, these have not been widely applied in all fields. In fact, there are scarce current studies regarding the characterization

---



---

of sound deciduous enamel,<sup>7, 12-14</sup> nevertheless the samples were reduced or only one technique was employed.

Furthermore, dental caries is the most common chronic disease in childhood<sup>15</sup> and deep knowledge of the sound deciduous enamel is required to improve the prevention and treatment strategies, including the synthesis of new bioactive materials that elicit a specific biological response at the interface between these and enamel, resulting in the formation of a bond.<sup>16</sup>

By these reasons, the aim of the present study was to characterize the enamel surface of sound deciduous teeth in terms of morphology, chemical composition, structure and crystalline phases.

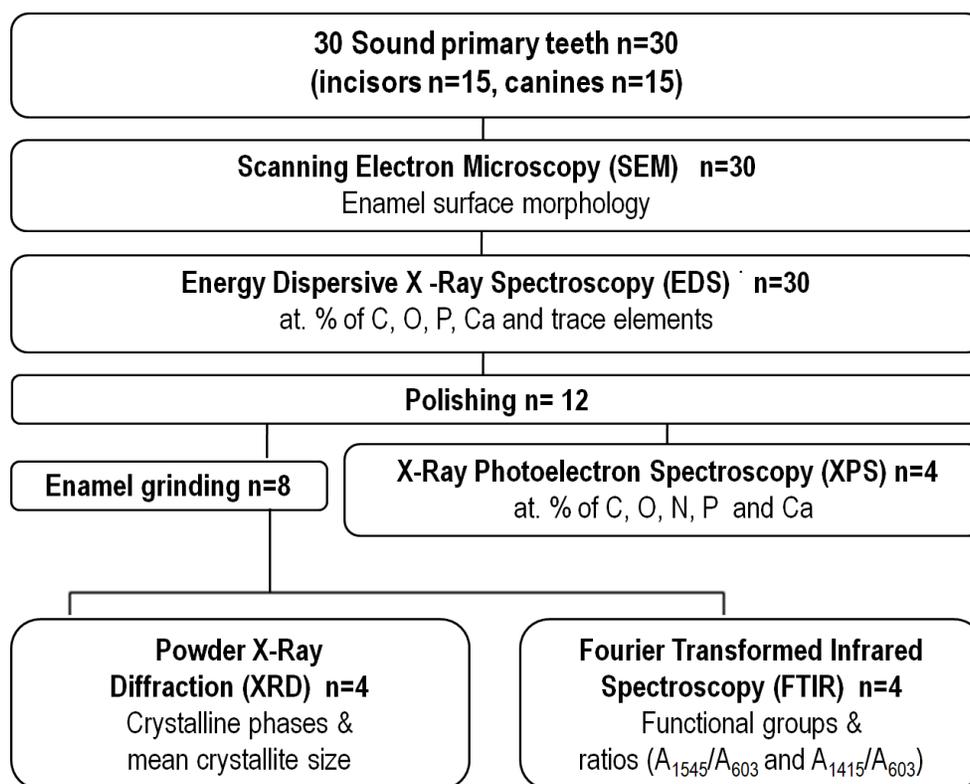
#### **7.1.6. Material and Methods**

##### *Tooth selection and sample preparation*

The protocol of the present study was reviewed and approved by the Research and Ethics Committee of the Autonomous University of the State of Mexico. Deciduous teeth (incisors and canines), exfoliated or extracted because of persistence in mouth were obtained under informed consent. Collected teeth did not present obvious decay or evidence of fluorosis, fractures or fillings. Immediately after extraction, they were placed in a plastic container with 0.2 % thymol solution and transported to the laboratory within 15 days after extraction for the analyses. Deionized water was used for the cleaning of the teeth; traces of soft tissue and blood were removed by means of a scalpel, specimens were delicately brushed with a soft brush (Sulcus, Oral-B, Mexico) and they were finally rinsed with water. Storage was carried out in 0.2% thymol solution at 4 °C until the analyses were performed.

Each tooth was removed from the solution, rinsed with deionized water and dried with oil free air from a triple syringe. The teeth were examined with a DIAGNOdent® pen (KaVo, Biederach, Germany) and 30 healthy teeth (15 incisors and 15 canines) with values between 0 and 13 were selected for their characterization. The sequence of the procedures and the techniques applied is shown in Fig. 1.

---



**Fig. 1.** Diagram of the procedures and characterization techniques sequence.

### *Scanning Electron Microscopy (SEM)*

Specimens were fixed to aluminium stubs with double-sided adhesive carbon tape (SPI Supplies, USA). Since we performed the analysis in the Low Vacuum Mode (25 Pa of chamber pressure), the application of a conducting coating was not necessary. Randomly selected buccal enamel surfaces were observed in a scanning electron microscope (JEOL, JSM-6510LV, Japan) at three different magnifications (200x, 600x and 1200x), with an electron acceleration voltage of 15-20 kV and using the backscattered electrons detector.

### *Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDS)*

The same buccal surface of each tooth was visualized under SEM at a standardized magnification of 100x with a working distance of 10 mm and the whole image area was selected to determine the atomic percentages (at%) of C, O, P, Ca and trace elements, using an X-ray detector system (Oxford Instruments, 7582, U.K.) attached to the scanning electron microscope.

---

### *Polishing*

The enamel surface of each tooth was polished for 5 minutes with a rubber cup mounted at a low-speed handpiece of the dental unit (KaVo, Biederach, Germany) and under constant deionized water irrigation. Abrasive substances were not used.

### *Enamel grinding*

The teeth were fractured hitting them with an agate mortar pestle, with the only purpose of leaving the dentin exposed. A micromotor with round burs was used to remove the dentin and, when required, the teeth were fractured again to access areas that still contained dentin. Roots were cut when necessary using a carbide disc. Specimens were observed in the stereoscopic microscope to ensure the complete removal of the dentin. The enamel pieces were washed by shaking in deionized water to eliminate residual dentin powder and they were air-dried. Finally, the pure enamel that remained was grinded in the agate mortar until a fine powder was obtained.

### *X-ray Powder Diffraction (XRD)*

The powder of each specimen was placed in a circular glass specimen holder and was analyzed in a powder X-ray diffractometer (D8 Advance, Bruker, Germany). We used the following conditions: CuK $\alpha$  X-ray radiation, X-ray source output power of 1050 W (35 kV, 30 mA), angular detector, 2 $\theta$  range of 7° to 67° with a step size of 0.02° and 0.5 seconds per step. A smooth factor of 0.1 was applied to improve the peak definition. The crystalline phases and structures, the spatial group and the crystallite size (using the Scherrer method) were determined with the EVA 13 program, belonging to the software suite DiffracPlus Basic Evaluation Package (Bruker, Germany).

### *Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)*

Firstly, for each tooth analyzed, 5 mg of enamel powder were mixed with 100 mg of potassium bromide (KBr) in an agate mortar and pellets transparent to visible light were fabricated on a manual hydraulic press with a pressure of 8.0 ton/cm<sup>2</sup>. FTIR spectra were recorded with an Avatar 360 spectrometer (Thermo Nicolet, USA). The background noise was corrected with air data and iterations were performed for 32 times in the region of 200-4000 cm<sup>-1</sup> with a measurement resolution of 8 cm<sup>-1</sup>. The spectral bands were analyzed in the software OMINC- Macro Basic v6.2 (Thermo Nicolet, USA) in order to assign the corresponding functional groups. The absorbance in

---

---

the bands of carbonate (types A and B) and phosphate was measured from a previously traced baseline.

#### *X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS)*

The dental organs were first cut to obtain a 2.0 mm slice of each sample that was suitable for the XPS analysis. For this purpose, self-etch adhesive was applied to the dentin of the pulp chamber (Adper Easy One 3M ESPE, USA), and the chamber was filled with autopolymerizable resin (Unitek 3M, USA) for better support. Afterwards, the crown was fixed with a thermoplastic epoxy resin (Allied, USA) to a glass slide placed on a hot plate (Corning, USA). Each slide was then put on a cutter (South Bay Technology Inc., USA). The cut was done parallel to the buccal surface of the tooth (approx. 2 mm width) with a diamond wheel (South Bay Inc., USA) under constant water irrigation.

Subsequently, the samples were air-dried, fixed to aluminium stubs with carbon tape and were chemically analyzed with an XPS (JEOL XPS-9200, Japan). The analysis area was 1 mm in diameter in the centre of the buccal enamel surface. The chamber vacuum was at least  $10^{-7}$  Pa. A MgK $\alpha$  X-ray source was used at 200 W of power output. Peak positions were calibrated by referencing a value of 284.5 eV for the peak of C-C, C-H in the C 1s spectrum. Qualitative and semiquantitative data (at%) were obtained for C 1s, N 1s, O 1s, Ca 2p and P 2p from their respective high resolution spectra. The deconvolution of the XPS calcium spectrum was also done to determine the possible interactions of this element with other atoms in the enamel structure. The Handbook of X-ray Photoelectron Spectroscopy (JEOL, Japan) and the NIST XPS Database, Version 3.5 (NIST, USA) were used as reference of the characteristic binding energies (eV) related to each core atomic orbital of the studied elements.

#### *Statistical analysis*

Significant statistical differences in the atomic percentages of the elements and the Ca/P molar ratios between incisors and canines were analyzed using the Mann-Whitney *U* Test ( $\alpha=0.05$ ), performed in the SPSS software, version 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

---

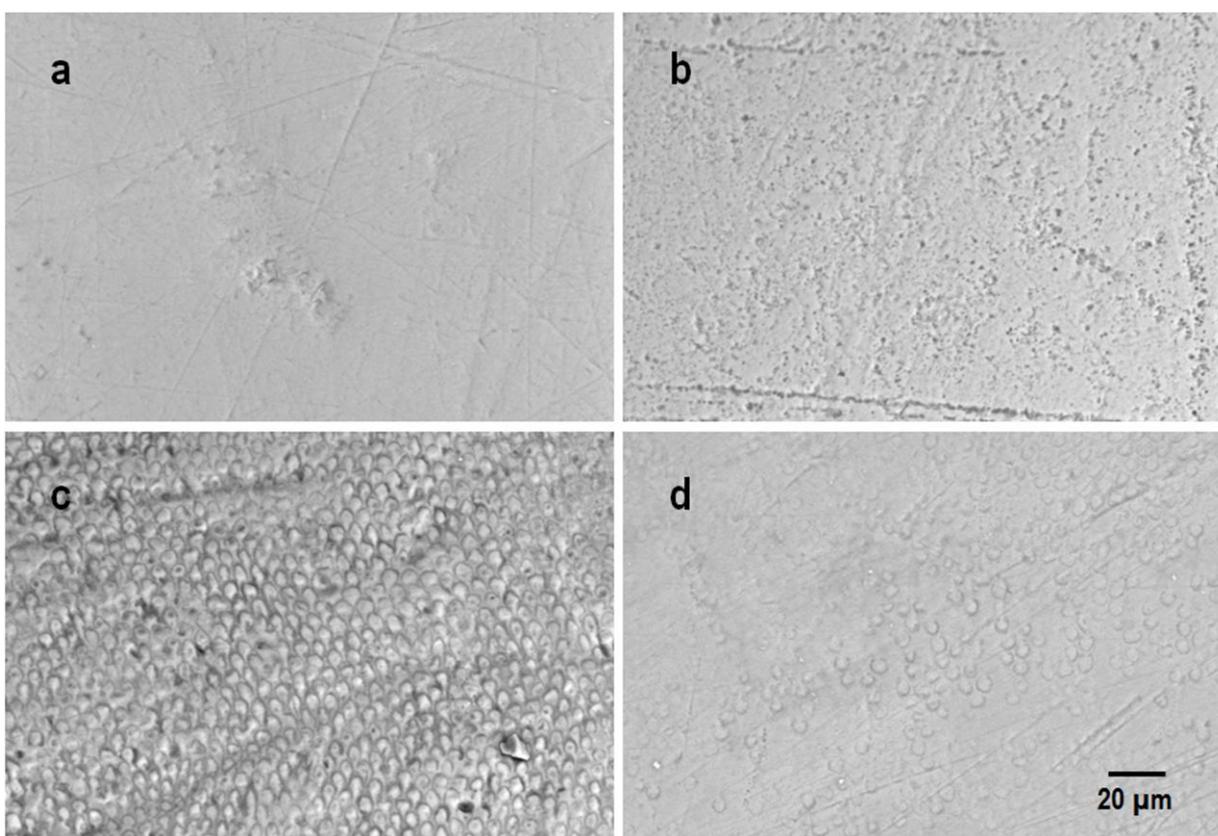
---

### 7.1.7. Results

#### *Scanning Electron Microscopy (SEM)*

The enamel surface of deciduous teeth showed two main types of morphological patterns as observed by SEM: A) “mostly smooth with some grooves” in 14 teeth (Fig. 2a) and B) “abundant microporosities” in 16 teeth (Fig. 2b).

“Exposed prisms” was a secondary pattern observed in the surface of 9 teeth, localized in all cases in the incisal third. Two teeth showed prisms with a “key hole” pattern (Fig. 2c) and seven teeth had prisms in irregular circular-like shapes (Fig. 2d).



**Fig. 2.** Enamel surface morphology patterns of deciduous teeth: a) mostly smooth with some grooves; b) abundant microporosities; c) exposed “key hole” prisms and d) exposed prisms with irregular circular-like shapes.

---

---

### *Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDS)*

The chemical composition of the enamel surface of the specimens obtained by EDS is shown in Table 1. The at% and Ca/P molar ratios (mean values and standard deviations) are showed. Incisors and canines showed no statistically significant differences in the at% of C, O, P, Ca and trace elements; nor the Ca/P molar ratios ( $p \leq 0.05$ ).

**Table 1. Mean values and standard deviations of elements atomic percentages and Ca/P molar ratios of deciduous enamel surface by EDS analysis.**

	<b>C at%</b>	<b>O at%</b>	<b>P at%</b>	<b>Ca at%</b>	<b>Trace elements<sup>a</sup> at%</b>	<b>Ca/P molar ratio</b>
Incisors (n=15)	19.40±7.51	55.58±7.06	10.20±0.97	14.09±1.81	0.73±0.20	1.38±0.13
Canines (n=15)	15.18±6.06	58.77±6.44	10.72±1.06	14.68±2.12	0.65±0.13	1.36±0.08
P-value*	0.081	0.250	0.305	0.461	0.174	0.902
Total (n=30)	17.29±7.04	57.18±6.83	10.46±1.03	14.38±1.96	0.69±0.17	1.37±0.11

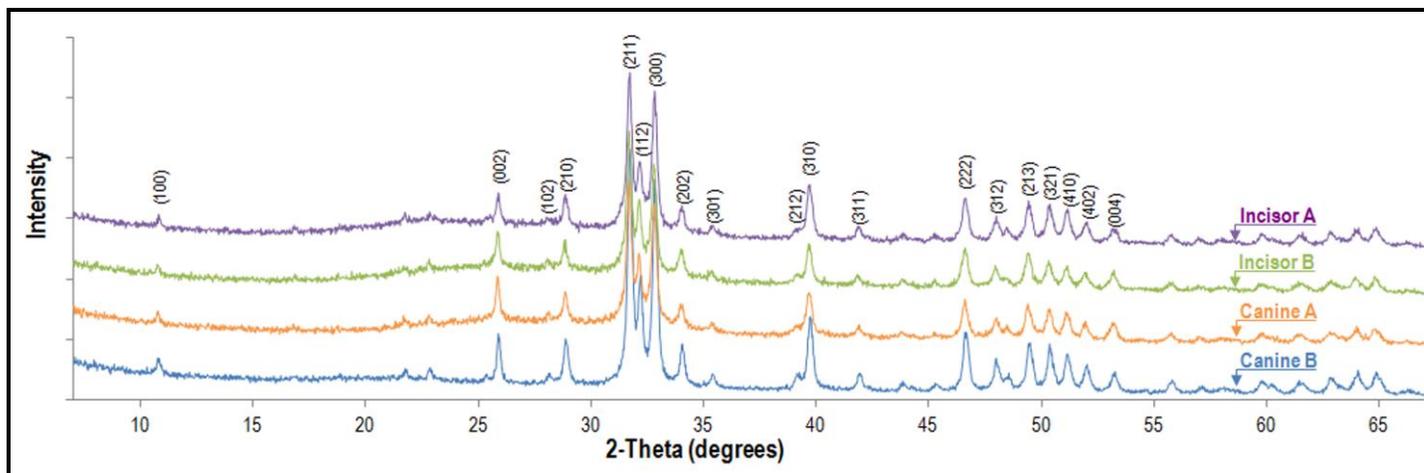
<sup>a</sup> at% lower than 1.0 (Cl + Na + Mg).

\* Mann-Whitney *U* Test ( $\alpha=0.05$ )

### *X-ray Powder Diffraction (XRD)*

The diffractograms of the incisors and canines analyzed by XRD are shown in Fig. 3. The diffraction planes (labelled) corresponded, for all specimens, to the crystalline phases of hydroxyapatite and carbonate apatite. Both phases had a hexagonal structure and belonged to the space group  $P6_3/m$  (176), with the same unit cell dimensions ( $a=b=9.44 \text{ \AA}$ ,  $c=6.88 \text{ \AA}$ ). The mean crystallite size was  $210.82 \pm 16.78 \text{ \AA}$ .

---



**Fig. 3.** X-ray diffractograms of the enamel powder of deciduous incisors and canines.

#### *Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)*

The functional groups found in the enamel powder samples are shown in the wide scan FTIR spectrum (Fig. 4a). The typical OH stretching band was shown at  $3566\text{ cm}^{-1}$ .

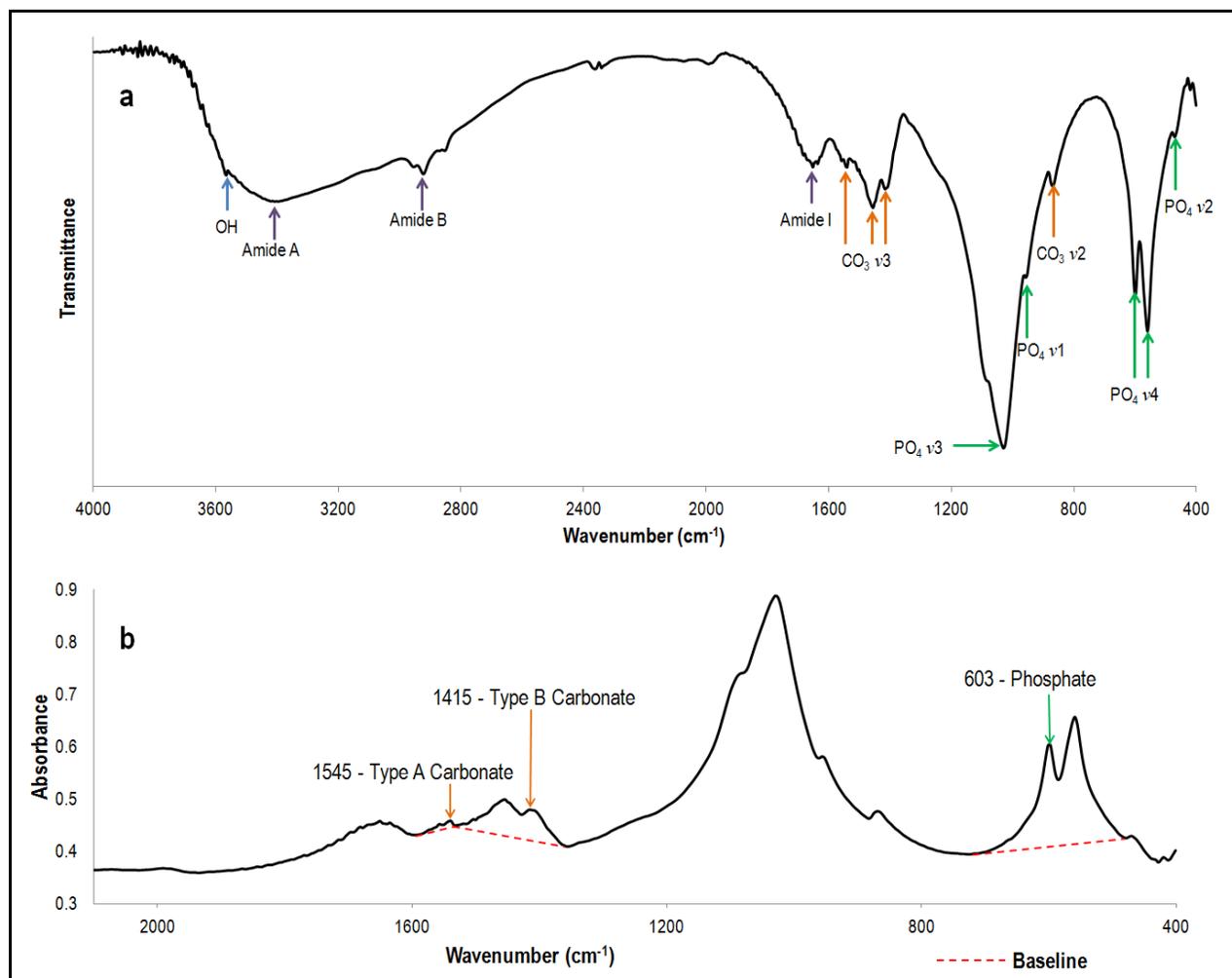
Regarding the phosphates, we could localize the  $\text{PO}_4^{3-}$  v1 mode at  $959\text{ cm}^{-1}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  v2 mode at  $472\text{ cm}^{-1}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  v3 at  $1033\text{ cm}^{-1}$  and  $\text{PO}_4^{3-}$  v4 at  $562\text{ cm}^{-1}$  with a less intense band centred at  $603\text{ cm}^{-1}$ .

The major component of v2  $\text{CO}_3^{2-}$ , was type B carbonate ( $\text{CO}_3^{2-}$  ions substituting  $\text{PO}_4^{3-}$  sites), located at  $872\text{ cm}^{-1}$ . Type B carbonate v3 mode showed two bands, one at  $1415\text{ cm}^{-1}$  and the other at  $1457\text{ cm}^{-1}$ . Type A carbonate ( $\text{CO}_3^{2-}$  substituting  $\text{OH}^-$  sites) in the v3 domain was located at  $1545\text{ cm}^{-1}$ .

The amide I vibration arising from C=O stretching was centred in the  $1654\text{ cm}^{-1}$  band. The amide A region, where the N-H stretching vibration of the amide appears, had its major intensity at  $3396\text{ cm}^{-1}$ . The amide B region arising from C-H stretching showed a band with higher intensity at  $2927\text{ cm}^{-1}$ .

In addition, Fig. 4b shows the absorbance of the region where carbonates and phosphates appeared. The calculated mean ratios between carbonates and phosphates were:  $A_{1545}/A_{603}$  (type A

carbonate/phosphate) =  $0.0507 \pm 0.009$  and  $A_{1415}/A_{603}$  (type B carbonate/phosphate) =  $0.2976 \pm 0.031$ .



**Fig. 4.** Infrared spectra of deciduous incisor enamel: a) wide scan spectrum and b) narrow scan spectrum.

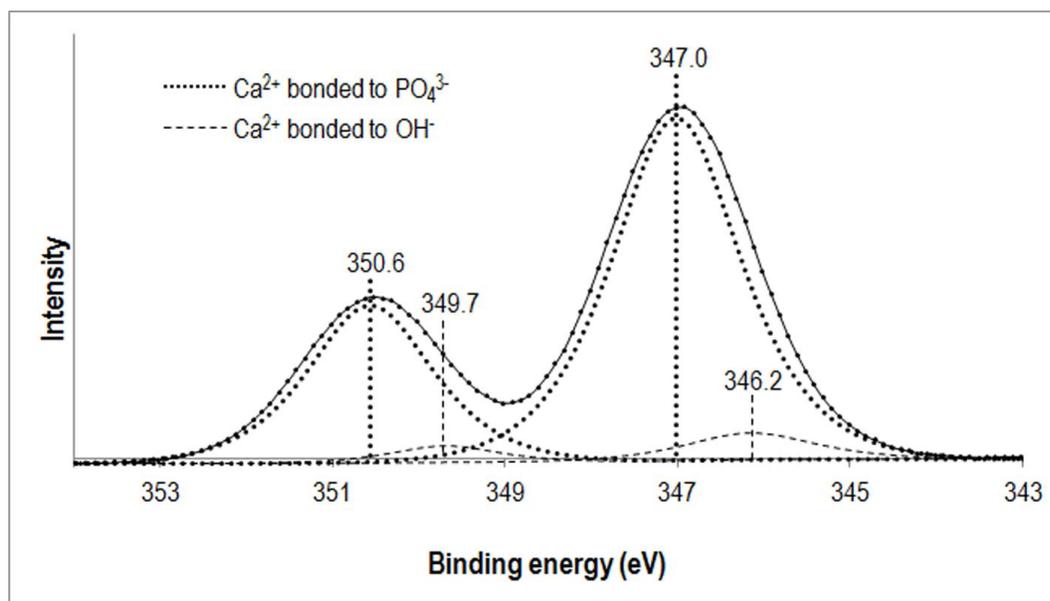
#### *X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS)*

The mean at% of C, O, P, Ca and N, as well as the average Ca/P molar ratio calculated from XPS spectra are shown in Table 2. The deconvolution of the XPS calcium spectrum (Fig. 5) show the binding energies (eV) in the peaks of  $\text{Ca}^{2+}$  bonded to  $\text{PO}_4^{3-}$  (higher peaks) and the peaks of  $\text{Ca}^{2+}$  bonded to  $\text{OH}^-$  (lower peaks). The average ratio between Ca bonded to phosphate and Ca bonded to hydroxyl was approximately 10:1.



**Table 2. Mean values of elements atomic percentages and Ca/P molar ratios of deciduous enamel surface by XPS analysis.**

C 1s at%	O 1s at%	P 2p <sub>3/2</sub> at%	Ca 2p <sub>3/2</sub> at%	N 1s at%	Ca/P molar ratio
54.54	24.66	8.28	8.79	3.73	1.03



**Fig. 5.** Deconvolution of the XPS calcium spectrum from the enamel surface.

### 7.1.8. Discussion

Since our goal was to study the teeth without any physical or chemical modification, after extraction from the buccal cavity the enamel surface was not polished or etched before SEM analysis in order to maintain their original morphology and structure. The “mostly smooth with some grooves” pattern observed in this study could be explained by the fact that there is “prismless enamel” in the outermost layer of the deciduous teeth, where crystallites are regularly arranged parallel to each other.<sup>17</sup> The well defined grooves found in some teeth might be formed due to the abrasion processes that all erupted teeth undergo,<sup>18</sup> like the ones caused by toothbrushing or feeding. These findings are consistent with Neves et al.<sup>19</sup> who obtained a similar SEM image of sound primary teeth without any treatment.

---

The “abundant microporosities” pattern was observed along the wear grooves, suggesting that these areas could be more prone to morphological and structural changes resulting from factors inherent to the oral environment.

Exposed prisms were found in the incisal third probably due to the presence of localized forces applied in this zone during the masticatory function. As reported by Kodaka et al.<sup>17</sup> these areas showed “circular-like arcades” and arcade-shape prisms commonly named “key hole” prisms, where the head (rod) and tail (interrod) of each prism are clearly observed. However, contrary to our study, the teeth were etched with EDTA prior to SEM analysis.

It is important to highlight that all the morphological patterns showed microscopic defects such as grooves, microporosities and/or exposed prisms in "smooth" buccal surfaces. Moreover, these defects are sites vulnerable to bacterial retention and posterior demineralization, fact that must be considered for caries prevention in Paediatric Dentistry.

Regarding to chemical composition, human dental enamel has been analyzed by EDS in previous reports,<sup>7-9, 20, 21</sup> mostly including samples from unhealthy subjects. Additionally, variations in the results have been reported in the literature. Ca and P content was evaluated, excluding other elements that form part of the hydroxyapatite structure, such as C and O.<sup>7, 8</sup> In our study, there was no difference between deciduous incisors and canines in terms of the chemical composition despite of the different formation, eruption and shedding times that could be influenced by several intrinsic and extrinsic factors.

It is worth mentioning that the Ca/P molar ratio represents a relationship independent of the absence or presence of other elements, which constitutes a criterion to compare results, reason why it was used in our study. The calculated mean Ca/P molar ratio obtained was close although slightly lower than the 1.55-1.70 range reported by Shore et al.<sup>20</sup> for deciduous enamel. On the other hand, it has been reported a Ca/P molar ratio around 1.74 for permanent teeth.<sup>8</sup> This suggests that there is a small difference between this molar ratio from deciduous and permanent teeth, though additional studies are required.

---

---

Another point to be considered is related to the indistinct use of the term “phosphate” ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) instead of “phosphorus” when referring to the element P, which leads to erroneous interpretations.<sup>9, 21</sup> Besides, results expressed in wt% as unit of measurement have been widely spread. Nonetheless, the at% is a more straightforward way to relate the number of atoms of each element, as used in this research.

With respect to the structural characterization, there are important advantages when working with powdered enamel instead of fractured enamel for the XRD analysis. One is that all the plane directions promote diffraction since all the grains are randomly oriented. A second advantage is that the geometry of the analysis is favoured when the powder inside the specimen holder is flattened, avoiding edge effects such as secondary diffraction signals, etc. Therefore, these conditions promote more intense and defined diffraction peaks as well as less noise in the spectra for easier and more accurate analysis.

X-ray diffractograms showed narrow and well defined peaks, suggesting that the crystallite size was large. Indeed, the calculated crystallite size coincided with the value reported by Leventouri et al.<sup>14</sup> in deciduous teeth, which corresponds to a well crystallized apatite ( $>200 \text{ \AA}$ ), according to Pleshko et al.<sup>22</sup> However, we could not determine by XRD analysis the proportion between hydroxyapatite and carbonate apatite since their lattice parameters were the same and indistinguishable from each other.

FTIR, a useful tool to analyze hydroxyapatite and the organic content in enamel, showed bands of the functional groups in agreement with other authors studies, such as: hydroxyl,<sup>23</sup> phosphates,<sup>23-26</sup> carbonates,<sup>14, 23, 24, 27</sup> and amides.<sup>23, 28</sup>

The carbonate/phosphate absorbance ratio as an indicator of the degree of incorporated carbonate in hydroxyapatite,<sup>29</sup> showed an increased presence of type B carbonate in relation to type A. SØnju and Ruyter<sup>24</sup> reported that only about 11% of the total carbonate content in deciduous enamel is type A.

---

---

On the other hand, since XPS is a surface technique with an analysis scope of approximately 1 to 6 nm depth, we decided to polish the samples in order to eliminate the organic content over the enamel, reducing the N at% to a minimum according to the results of our pilot study. It has been reported that the complete removal of the acquired pellicle is achieved pumicing the teeth around 5 minutes with a rotating rubber cup,<sup>30</sup> however, to prevent contamination, we did not use any abrasive. The presence of N and a high amount of C in the enamel surface may be due to two factors: one is that these elements are part of the proteins forming the organic pellicle that may not be completely eliminated and the second is that XPS is sensitive to environmental carbon. The at% of O, P and Ca were lower with XPS than when analyzed by EDS, probably due to the C at% increment. Additionally, the slight variations among the Ca/P molar ratios could be explained by the analysis depth of each employed technique, suggesting differences in the mineral content from the enamel surface to the interior. A smaller Ca/P molar ratio in the outermost surface (XPS) suggest the loss of  $\text{Ca}^{2+}$  ions from the surface, which could be related to microscopic morphological defects such as microporosities and exposed prisms. Weatherell et al.<sup>31</sup> have also found low Ca/P values near the surface and mentioned that it could be indicative of calcium-deficient apatite.

An XPS advantage is that the chemical or electronic state of each element could be studied. As mentioned before, the average ratio between  $\text{Ca}^{2+}$  bonded to  $\text{PO}_4^{3-}$  and  $\text{Ca}^{2+}$  bonded to  $\text{OH}^-$  was approximately 10:1. In pure hydroxyapatite there are 9 Ca ions bonded to  $\text{PO}_4^{3-}$  for 1 Ca ion bonded to  $\text{OH}^-$ . The difference can arise from  $\text{CO}_3^{2-}$  substitutions and other crystalline defects such as vacancies and interstitials.

In this era of major technological advances, the findings revealed in this study by several characterization techniques should be considered as a whole for the synthesis of new bioactive materials. Depending on the desired use, for enamel protection they must have high chemical affinity. While to replace the hydroxyapatite structure and to achieve a proper adhesion, materials must have a composition and a structure similar to those described by the authors.

---

---

### 7.1.9. Conclusions

Morphologically, the enamel of sound deciduous teeth showed two main patterns: “mostly smooth with some grooves” and “abundant microporosities”. “Exposed prisms” was a secondary pattern located only in the incisal third.

Chemically, there were slight variations among the Ca/P molar ratios found by EDS and XPS, suggesting differences in the mineral content from the enamel surface to the interior.

Structurally, the crystalline phases found in enamel by powder XRD were hydroxyapatite and carbonate apatite; and there was a higher amount of incorporated type B carbonate than type A carbonate as evidenced by FTIR.

#### **\*Why this paper is important to paediatric dentists.**

- This is a comprehensive study regarding to morphology and chemical composition in deciduous enamel more extensive than previous reports. Several current analytical techniques were used simultaneously to strengthen the state of the art in this topic of Paediatric Dentistry.
  - It is important to highlight that microscopic morphological patterns which included grooves, microporosities and exposed prisms in the buccal surface could contribute to bacterial retention, demineralization processes and dental sensitivity. These factors should be taken into consideration by Paediatric Dentistry clinicians.
  - Because dental caries is the most common chronic disease in childhood, deep knowledge of the sound deciduous enamel is required to improve the prevention and treatment strategies, including the synthesis of new bioactive materials.
-

---

### 7.1.10. Acknowledgements

The authors deeply thank the personal and patients of the Paediatric Dental Clinics of the Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM) and of the Centro de Especialidades Odontológicas del Instituto Materno Infantil del Estado de México (IMIEM), for their support in the collection of the dental organs. We highly acknowledge the contributions of Iván García, Claudia Centeno, Magdalena García and Gustavo López, for their helpful advice and suggestions.

### 7.1.11. References

1. Skinner HCW. Biominerals. *Mineral Mag* 2005; 69: 621-641.
  2. Elliott JC, Wilson RM, Dowker SEP. Apatite structures. *Adv X Ray Anal* 2002; 45: 172-181.
  3. Eanes ED. Enamel Apatite: Chemistry, Structure and Properties. *J Dent Res* 1979; 58: 829-834.
  4. Pasteris JD, Wopenka B, Valsami-Jones E. Bone and tooth mineralization: why apatite? *Elements* 2008; 4: 97-104.
  5. Simmer JP, Hu JC. Dental enamel formation and its impact on clinical dentistry. *J Dent Educ* 2001; 65: 896-905.
  6. Ripa LW. The histology of the early carious lesion in primary teeth with special reference to a "prismless" outer layer of primary enamel. *J Dent Res* 1966; 45: 5-11.
  7. De Menezes Oliveira MA, Torres CP, Gomes-Silva JM et al. Microstructure and mineral composition of dental enamel of permanent and deciduous teeth. *Microsc Res Tech* 2010; 73: 572-577.
  8. Mahoney EK, Rohanizadeh R, Ismail FS, Kilpatrick NM, Swain MV. Mechanical properties and microstructure of hypomineralised enamel of permanent teeth. *Biomaterials* 2004; 25: 5091-5100.
  9. Zilberman U, Zilberman S, Keinan D, Elyiahu M. Enamel development in primary molars from children with familial dysautonomia. *Arch Oral Biol* 2010; 55: 907-912.
  10. Kusabe Y, Nakano T, Okamoto T et al. Distribution of fluoride and magnesium concentrations in deciduous tooth enamel of children with cerebral palsy and Down syndrome. *Pediatric Dental Journal* 2012; 22: 103-109.
  11. Elfrink MEC, ten Cate JM, van Ruijven LJ, Veerkamp JSJ. Mineral content in teeth with Deciduous Molar Hypomineralisation (DMH). *J Dent* 2013; 41: 974-978.
-

- 
12. Wong FS, Anderson P, Fan H, Davis GR. X-ray microtomographic study of mineral concentration distribution in deciduous enamel. *Arch Oral Biol* 2004; 49: 937-944.
  13. Dolphin AE, Goodman AH, Amarasiriwardena DD. Variation in elemental intensities among teeth and between pre- and postnatal regions of enamel. *Am J Phys Anthropol* 2005; 128: 878-888.
  14. Leventouri T, Antonakos A, Kyriacou A, Venturelli R, Liarokapis E, Perdikatsis V. Crystal structure studies of human dental apatite as a function of age. *Int J Biomater* 2009; 698547.
  15. Losso EM, Tavares MC, Silva JY, Urban Cde A. Severe early childhood caries: an integral approach. *J Pediatr (Rio J)* 2009; 85: 295-300.
  16. Watson TF, Atmeh AR, Sajini S, Cook RJ, Festy F. Present and future of glass-ionomers and calcium-silicate cements as bioactive materials in dentistry: Biophotonics-based interfacial analyses in health and disease. *Dent Mater* 2014; 30:50-61.
  17. Kodaka T, Nakajima F, Higashi S. Structure of the so-called 'prismless' enamel in human deciduous teeth. *Caries Res* 1989; 23: 290-296.
  18. Fava M, Watanabe I-S, Fava-de-Moraes F, Costa LRdRSd. Prismless enamel in human non-erupted deciduous molar teeth: a scanning electron microscopic study. *Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo* 1997; 11: 239-243.
  19. Neves Ade A, Castro Rde A, Coutinho ET, Primo LG. Microstructural analysis of demineralized primary enamel after in vitro toothbrushing. *Pesqui Odontol Bras* 2002; 16: 137-143.
  20. Shore RC, Backman B, Elcock C, Brook AH, Brookes SJ, Kirkham J. The structure and composition of deciduous enamel affected by local hypoplastic autosomal dominant amelogenesis imperfecta resulting from an ENAM mutation. *Cells Tissues Organs* 2010; 191: 301-306.
  21. Keinan D, Smith P, Zilberman U. Microstructure and chemical composition of primary teeth in children with Down syndrome and cerebral palsy. *Arch Oral Biol* 2006; 51: 836-843.
  22. Pleshko N, Boskey A, Mendelsohn R. Novel infrared spectroscopic method for the determination of crystallinity of hydroxyapatite minerals. *Biophys J* 1991; 60: 786-793.
  23. Chang MC, Tanaka J. FT-IR study for hydroxyapatite/collagen nanocomposite cross-linked by glutaraldehyde. *Biomaterials* 2002; 23: 4811-4818.
  24. SØnju Clasen AB, Ruyter IE. Quantitative determination of type A and type B carbonate in human deciduous and permanent enamel by means of Fourier transform infrared spectrometry. *Adv Dent Res* 1997; 11: 523-527.
-

- 
25. Segvich SJ, Smith HC, Kohn DH. The adsorption of preferential binding peptides to apatite-based materials. *Biomaterials* 2009; 30: 1287-1298.
  26. Markovic M, Fowler BO, Tung MS. Preparation and comprehensive characterization of a calcium hydroxyapatite reference material. *J Res Natl Inst Stand Technol* 2004; 109: 553-568.
  27. Rey C, Collins B, Goehl T, Dickson IR, Glimcher MJ. The carbonate environment in bone mineral: a resolution-enhanced Fourier Transform Infrared Spectroscopy Study. *Calcif Tissue Int* 1989; 45: 157-164.
  28. Polyanichko AM, Wieser H. Vibrational circular dichroism and its applications to protein studies. In: Uversky VN, Permyakov EA, editors. *Methods in protein structure and stability analysis: vibrational spectroscopy*. New York: Nova Publishers; 2007. p. 267-302.
  29. Boskey AL, Mendelsohn R. Infrared spectroscopic characterization of mineralized tissues. *Vib Spectrosc* 2005; 38: 107-114.
  30. Saxton CA. The effects of dentifrices on the appearance of the tooth surface observed with the scanning electron microscope. *J Periodontal Res* 1976; 11: 74-85.
  31. Weatherell JA, Robinson C, Hallsworth AS. Variations in the chemical composition of human enamel. *J Dent Res* 1974; 53: 180-192.
-



---

## 7.2. Artículo Aceptado – Fase II

### Morphological and Chemical Changes of Deciduous Enamel Produced by Er:YAG Laser, Fluoride and Combined Treatment

#### 7.2.1. Página Frontal del Manuscrito

**Title:**

Morphological and Chemical Changes of Deciduous Enamel Produced by Er:YAG Laser, Fluoride and Combined Treatment

**Names of Authors:**

Carmen M. Zamudio-Ortega, B.S.Pharm.Chem., <sup>1</sup> Rosalía Contreras-Bulnes, D.D.S., Ph.D., <sup>1</sup> Rogelio J. Scougall-Vilchis, D.D.S., M.S.D., Ph.D., <sup>1</sup> Raúl A. Morales-Luckie, B.S.Chem., Ph.D., <sup>2</sup> Oscar F. Olea-Mejía, B.S.Che.E., Ph.D., <sup>2</sup> Laura E. Rodríguez-Vilchis, D.D.S., M.S.D., Ph.D., <sup>1</sup> and María Magdalena García-Fabila, B.S.Chem., M.Env.Sc.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Odontología, Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Odontología (CIEAO), Jesús Carranza esq. Paseo Tollocan, Col. Universidad, C.P. 50130, Toluca, Estado de México, México.

<sup>2</sup>Universidad Autónoma del Estado de México-Universidad Nacional Autónoma de México, Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable (CCIQS), Km 14.5 Carretera Toluca-Ixtlahuaca, San Cayetano de Morelos, C.P. 50200, Toluca, Estado de México, México

<sup>3</sup>Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Química. Paseo Tollocan esq. Paseo Colón, C.P. 50120, Toluca, Estado de México, México

**Corresponding author:**

Rosalía Contreras-Bulnes, D.D.S., Ph.D.

Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Odontología (CIEAO),

Facultad de Odontología, Universidad Autónoma del Estado de México,

Jesús Carranza esq. Paseo Tollocan, Col. Universidad, Toluca, Estado de México, C.P. 50130, México

Tel: (+52) 722-2124351 Ext.118; Fax: (+52)722-2126464;

e-mail: rcontrerasb@uaemex.mx; rcb0209@yahoo.com.mx

**Running Title:** Characterization of Er:YAG laser irradiated enamel

**Contact information:**

Carmen María Zamudio-Ortega: Tel: (+52) 722-266-95-66; e-mail: carmen.ma.zamudio@gmail.com.

Rogelio José Scougall-Vilchis: Tel: (+52) 722-2124351 Ext. 119; Fax: (+52) 722-2126464; e-mail: rogelio\_scougall@hotmail.com.

Raúl Alberto Morales-Luckie: Tel: (+52) 722-2766610 Ext. 7715, Fax: (+52) 722-2173890; e-mail: rmoralesl@uaemex.mx

Oscar Fernando Olea-Mejía: Tel: (+52) 722-2766610 Ext. 7732, Fax: (+52) 722-2173890; e-mail: oleaoscar@yahoo.com.mx

Laura Emma Rodríguez-Vilchis: Tel: (+52) 722-2124351 Ext. 117; Fax: (+52)722-2126464; e-mail: rovilaster@gmail.com

María Magdalena García-Fabila: Tel: (+52) 722-2173890 and (+52) 722-2175109 Ext. 113 and 131; e-mail: mmgafa@yahoo.com.mx

---

---

## 7.2.2. Carta de Aceptación

### Preview

**From:** photomedicine.editorial@gmail.com

**To:** rcb0209@yahoo.com.mx, rcontrerasb@uaemex.mx

**CC:**

**Subject:** Photomedicine and Laser Surgery - Decision on Manuscript ID PHO-2013-3622.R3

**Body:** 30-Jan-2014

Dear Dr. Contreras-Bulnes:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Morphological and Chemical Changes of Deciduous Enamel Produced by Er:YAG Laser, Fluoride and Combined Treatment" in its current form for publication in Photomedicine and Laser Surgery.

Please be sure to cite this article to ensure maximum exposure of your work.

All authors will get a follow-up email with instructions on how to complete our online Copyright Agreement form.

FAILURE BY ALL AUTHORS TO SUBMIT THIS FORM MAY RESULT IN A DELAY OF PUBLICATION.

The corresponding author is responsible for communicating with coauthors to make sure they have completed the online copyright form. Authors not permitted to release copyright must still return the form acknowledging the statement of the reason for not releasing the copyright. The corresponding author will receive notification when all copyright forms have been submitted.

Consider Liebert Open Option to have your paper made free online immediately upon publication for a one-time fee. Benefits of Liebert Open Option include: accelerated e-pub ahead of print publication; email message highlighting the article; increased readers, citations and downloads; an identifying icon in the table of contents showing that the paper is permanently available for free to all readers; and immediate deposition into PubMed Central®. Subsequent accepted papers are eligible for a reduced fee for Open Option. Please contact Karen Ballen at kballen@liebertpub.com or at (914) 740-2194 for more information.

If your institution is not currently subscribing to this journal, please ensure that your colleagues have access to your work by recommending this title ([http://www.liebertpub.com/mcontent/files/lib\\_rec\\_form.pdf](http://www.liebertpub.com/mcontent/files/lib_rec_form.pdf)) to your Librarian.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of Photomedicine and Laser Surgery, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,

Dr. Raymond Lanzafame  
Editorial Office, Photomedicine and Laser Surgery  
photomedicine.editorial@gmail.com

Reviewer(s)' Comments to Author:

**Date Sent:** 30-Jan-2014

---

---

### 7.2.3. Resumen

**Objetivo:** Evaluar *in vitro* los cambios morfológicos y químicos en el esmalte temporal humano producidos por la irradiación con láser Er:YAG, la aplicación de fluoruro, el tratamiento combinado y la disolución ácida. **Antecedentes:** El láser Er:YAG ha sido propuesto como una potencial estrategia preventiva de caries dental. Existe escasa información concerniente al esmalte temporal. **Métodos:** Ochenta muestras de esmalte fueron asignadas a ocho grupos (n=10): G1, control; G2, G3 y G4, irradiación con láser Er:YAG a 7.5, 12.7 and 39.8 J/cm<sup>2</sup>, respectivamente; G5, aplicación de fluoruro; G6, G7 y G8, irradiación a las densidades previas más aplicación de fluoruro. La morfología fue evaluada mediante microscopía electrónica de barrido y la composición química fue determinada mediante espectroscopía de rayos X por dispersión de energía antes del tratamiento (BT), después del tratamiento (AT) y después de la disolución ácida (AAD). ANOVA de una vía y de medidas repetidas fueron utilizadas ( $p \leq 0.05$ ) para el análisis estadístico. **Resultados:** La morfología de las superficies irradiadas incluyó cráteres, prismas expuestos, fracturas y fusión. No existieron modificaciones morfológicas después de la aplicación de fluoruro y tampoco AAD. Químicamente, AT: el porcentaje atómico (%at) de C disminuyó en G3, G4 y G8; el %at de O disminuyó en G5-G8; el contenido de F fue mayor para G7; los elementos traza se mantuvieron por debajo de 1.0 %at; el %at de Ca aumentó en G4, G7 y G8; incrementos en el %at de P en G4 y G8; Ca/P aumentó en G4, G7 y G8. AAD: el %at de F cayó a 0.00 en G5-G8; el %at de P se incrementó en G7. **Conclusiones:** Los cambios morfológicos del esmalte irradiado con Er:YAG incluyeron daños desde leves hasta severos. Las condiciones empleadas en este estudio no son recomendadas para la prevención de caries de dientes temporales. La densidad de energía del láser Er:YAG produjo cambios químicos en el esmalte que mejoraron su estructura. La disolución ácida removió fluoruro de la superficie del esmalte.

### 7.2.4. Abstract

**Objective:** Evaluate *in vitro* morphological and chemical changes on human deciduous enamel produced by Er:YAG laser irradiation, fluoride application, combined treatment and acid dissolution. **Background Data:** Er:YAG laser has been proposed as a potential preventive dental caries strategy. There is quite scarce information regarding deciduous enamel. **Methods:** Eighty

---

---

enamel samples were assigned to eight groups (n=10): G1, control; G2, G3 and G4, Er:YAG laser irradiation at 7.5, 12.7 and 39.8 J/cm<sup>2</sup>, respectively; G5, fluoride application; G6, G7 and G8, irradiation at previous densities + fluoride application. Morphology was evaluated by scanning electron microscopy and chemical composition determined by energy dispersive X-ray spectroscopy before treatment (BT), after treatment (AT) and after acid dissolution (AAD). One-way and repeated measures ANOVA were used ( $p \leq 0.05$ ). **Results:** Morphology of lased surfaces included craters, exposed prisms, fractures and melting. No morphological modifications appeared after fluoride application, neither AAD. Chemically, AT: C at% decreased in G3, G4 and G8; O at% decreased in G5-G8; F content was higher for G7; trace elements remained under 1.0 at%; Ca at% increased in G4, G7 and G8; increments in P at% of G4 and G8; Ca/P increased in G4, G7 and G8. AAD: F at% dropped to 0.00 in G5-G8; P at% increased in G7. **Conclusions:** Morphological changes of Er:YAG irradiated enamel were from mild to severe damages. Conditions employed in this study are not recommended for deciduous caries prevention. Er:YAG energy density influenced chemical changes in enamel to enhance its structure. Acid dissolution removed fluoride from enamel surface.

### 7.2.5. Introduction

Nowadays, the strategies for preventive dental caries have been mainly focused on deciduous teeth because it is well known that this disease leads to several negative effects with further damage to permanent dentition.<sup>1-4</sup> However, despite the efforts to control it, there is the need to evaluate the mechanisms of action of novel and effective prevention strategies that enhance the dental structure without relying on the cooperation of the patient.

Laser technology has been considered a new potential strategy in caries prevention since the first studies conducted by Stern and Sognaes<sup>5</sup> and Stern et al.,<sup>6</sup> in which they demonstrated that acid resistance of enamel increased when irradiated by ruby laser. In general, the use of laser technology for caries prevention has been controversial, because there are several variables that could be modified (type of laser, wavelength, irradiation parameters, type of demineralization induced in samples, etc.) and the final result in the studies depends on the interaction of all of them.<sup>7</sup>

---

---

In particular, the effectiveness of Er:YAG laser ( $\lambda = 2940$  nm) has been questioned.<sup>8,9</sup> However, several studies have demonstrated that the treatment with this laser prevents enamel demineralization,<sup>10-14</sup> including quite scarce information regarding the effects on deciduous enamel.<sup>11</sup> Castellan et. al.<sup>11</sup> concluded that Er:YAG laser can be an alternative tool for enhancing deciduous enamel acid resistance, nonetheless, key factors to consider such as the morphological and chemical changes produced by irradiation have not been studied. In fact, some researchers have reported that enamel surface of permanent teeth suffered collateral damages (fractures, craters, exposed prisms, etc.) as a result of the thermal phenomena that occurs during irradiation, even at energy densities usually considered as subablative.<sup>15-17</sup> Additionally, there are studies supporting the idea that Er:YAG laser irradiation improves the incorporation of fluoride from topical products to dental enamel,<sup>12</sup> and the combination of both treatments leads to a greater reduction in mineral loss when it is subjected to an acid challenge.<sup>12,18</sup>

For these reasons, the aim of the present study was to evaluate *in vitro* morphological and chemical changes on human deciduous enamel produced by Er:YAG laser irradiation, fluoride application and combined treatment, as well as the effects induced by acid dissolution on treated surfaces.

#### **7.2.6. Materials and Methods**

##### *Tooth selection and sample preparation*

The protocol of this study was reviewed and approved by the Research and Ethics Committee of the Autonomous University of the State of Mexico. Deciduous molars extracted for prolonged retention without obvious decay or evidence of fluorosis, fractures or fillings were obtained under informed consent. Immediately after extraction, teeth were collected in a 0.2% thymol solution and transported to the laboratory. The specimens were cleaned with tridistilled water, traces of soft tissue were removed with a scalpel and the crown was separated from the remnant root by means of a carbide disc. Crowns were gently brushed with a soft brush (Sulcus, Oral-B, Mexico) and finally rinsed with tridistilled water. The storage was carried out at 4 °C in 0.2% thymol solution before the analysis.

---

---

Afterwards, the crowns were rinsed with tridistilled water and air-dried. They were observed under the stereoscopic microscope and the ones that showed fractures were discarded. Specimens were scanned with a laser fluorescence caries detection system DIAGNOdent® pen (KaVo, Biederach, Germany) and forty were selected for the study after showing values between 0 and 13 (healthy teeth). Each crown was fixed with a thermoplastic epoxy resin (Allied, USA) to a glass slide placed on a hot plate (Corning, USA) and a mesiodistal central cut was performed using a low speed diamond wheel saw (South Bay Technology Inc., USA), under constant tridistilled water irrigation. One block with an enamel square area of 3x3 mm was obtained from each buccal and lingual surface. Each enamel block was considered as the experimental unit. Subsequently, the samples were cleaned for 5 minutes in separate containers filled with tridistilled water in the ultrasonic bath (Quantrex Q140, L&R Ultrasonics, N.J., U.S.A.) and they were air-dried.

The diagram of the experimental design is shown in Fig. 1. Scanning electron microscopy (SEM) and Energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS) were conducted during three stages: before treatment (BT), after treatment (AT) and after acid dissolution (AAD). All procedures were performed in isolated experimental units.

#### *Scanning electron microscopy (SEM)*

The blocks were fixed to aluminium stubs with double-sided adhesive carbon tape (SPI Supplies, USA). The analysis was performed using a scanning electron microscope (JEOL, JSM-6510LV, Japan) in the low vacuum mode at 10 Pa of chamber pressure, with an electron acceleration voltage of 25 kV and detecting backscattered electrons. The morphology of the enamel surface was observed at a magnification of 400x. The *scaler* tool of the image software (INCA, Oxford Instruments, Oxfordshire, United Kingdom) was used to trace a cross from the corners of the square sample and the exact center of the cross was examined. To ensure satisfactory inter-examiner reproducibility of morphological findings, three examiners were calibrated with enamel SEM images selected from our research files previous to the start of SEM analysis (Kappa 0.95).

---

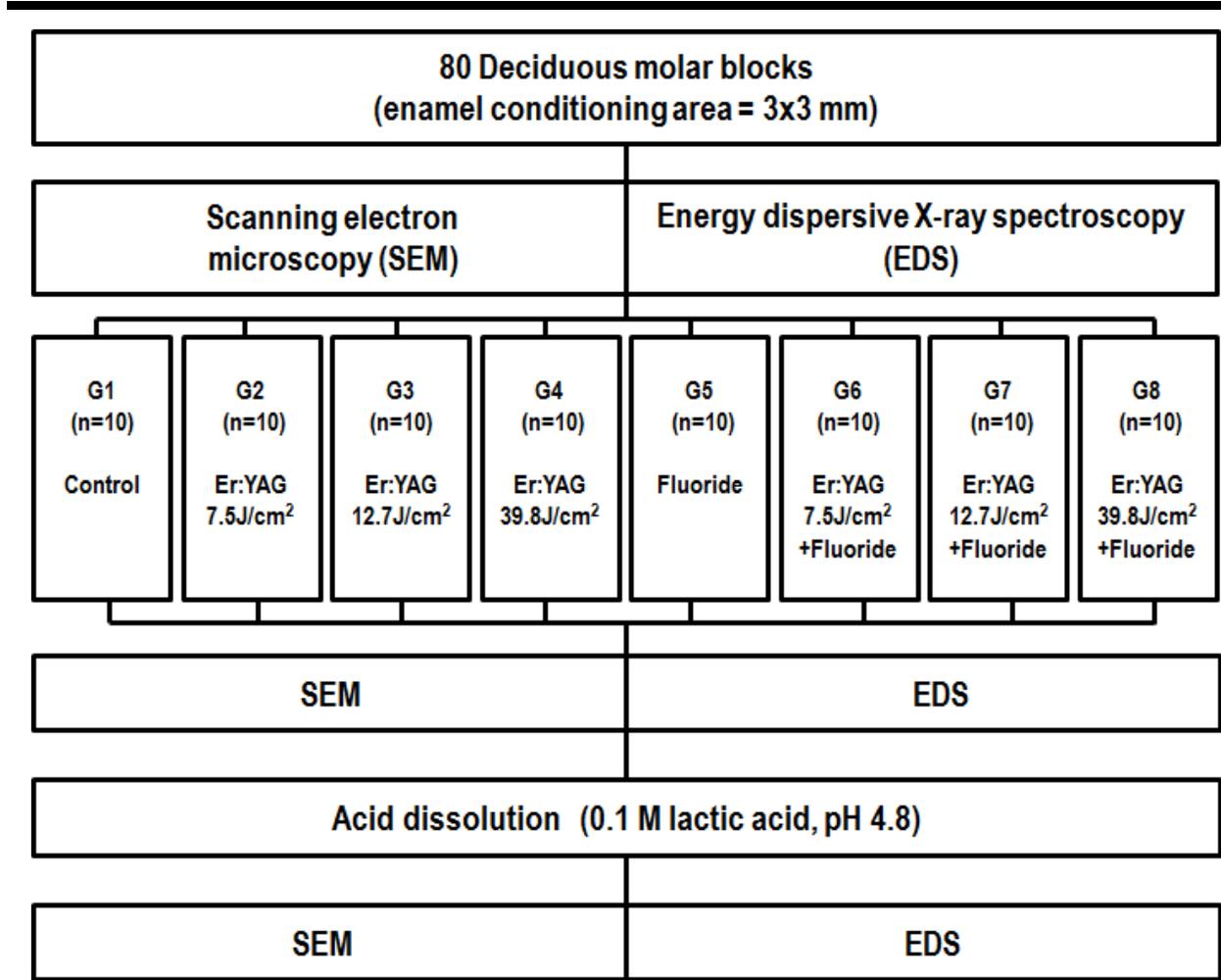


FIG. 1 Diagram of the experimental design.

#### *Energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS)*

The whole area visualized under SEM at a standardized magnification of 100x was analyzed to determine the atomic percentages (at%) of carbon (C), oxygen (O), fluorine (F), trace elements (sodium + chlorine + magnesium), calcium (Ca) and phosphorus (P) using an X-ray detector system (Oxford Instruments, 7582, U.K) attached to the microscope.

#### *Surface treatments*

Eighty block samples were randomly assigned to eight groups (n=10) and enamel surface was conditioned as shown in Table 1.

TABLE 1. CONDITIONING FOR STUDY GROUPS

	Groups							
	G1 Control	G2 Er:YAG Laser	G3 Er:YAG laser	G4 Er:YAG laser	G5 Fluoride	G6 Er:YAG laser + Fluoride	G7 Er:YAG laser + Fluoride	G8 Er:YAG laser + Fluoride
<b>Irradiation conditions</b>								
Energy (mJ):	-	100	100	200	-	100	100	200
Sapphire tip Ø (mm):	-	1.3	1.0	0.8	-	1.3	1.0	0.8
Energy density (J/cm <sup>2</sup> ):	-	7.5	12.7	39.8	-	7.5	12.7	39.8
Power density (W/cm <sup>2</sup> ):	-	1.88 x 10 <sup>4</sup>	3.18 x 10 <sup>4</sup>	9.95 x 10 <sup>4</sup>	-	1.88 x 10 <sup>4</sup>	3.18 x 10 <sup>4</sup>	9.95 x 10 <sup>4</sup>
<b>Fluoride application</b>								
1.23% APF topical foam	-	-	-	-	✓	✓	✓	✓

#### A) Er:YAG laser irradiation

The irradiation of the specimens was performed using an Er:YAG laser system (OpusDuo AquaLite EC, Er:YAG + CO<sub>2</sub>, Lumenis, Yokneam, Israel) in the non-focused and non-contact modes, with a wavelength fixed at 2.94 µm, at a pulse repetition of 7 Hz and a pulse duration of 400 µsec. Energy levels were calibrated using the calipers of the equipment, and the energy delivered was measured periodically with a power meter (LaserMate-P, Coherent Co., Santa Clara, CA, USA). The surface was scanned once by hand (13 sec) with the sapphire tip of the laser perpendicular to it, at a working distance of 1 mm and with tridistilled water irrigation (5 mL/min).

#### B) Fluoride application

Enamel surface was dried with a compressed-gas duster (Falcon Safety Products, Inc., NJ, U.S.A.). Then, the teeth were treated individually during 4 minutes with 1.23% APF topical foam (Butler, Sunstar Americas, Inc., IL, U.S.A.). After, the samples were rinsed with tridistilled water for 1 minute and then air-dried. For G6, G7 and G8 groups, fluoride was applied immediately after Er:YAG laser irradiation.



---

### *Acid dissolution*

Samples were coated with an acid-resistant varnish, except on the enamel area designed for conditioning. Each specimen was immersed individually in plastic tubes containing 2 mL of a 0.1 M lactic acid solution with a pH of 4.8 and incubated at 37°C for 24 hours.<sup>19</sup> After this time, the samples were removed and rinsed with tridistilled water.

### *Statistical analysis*

All data were analyzed using the SPSS 18.0 statistical package (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The Kolmogorov-Smirnov test was performed to estimate the distribution of the data. Subsequently, the one-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare among groups; when significant differences were found, Bonferroni or Tamhane's T2 post hoc tests were applied depending on Levene's test of homogeneity of variance.

A repeated measures ANOVA was performed to determine the differences among stages (before treatment, after treatment and after acid dissolution). The level of significance was stated at  $p \leq 0.05$  in all statistical analysis.

## **7.2.7. Results**

### *SEM surface analysis*

Morphological changes of deciduous enamel produced by Er:YAG laser, fluoride and acid dissolution can be seen in Figure 2. Before laser treatment teeth showed some defects such as grooves, fractures and even exposed prisms. After irradiation the adverse effects were more accentuated at higher energy densities.

However, surface morphology was not modified after fluoride application, neither after the acid dissolution process.

---

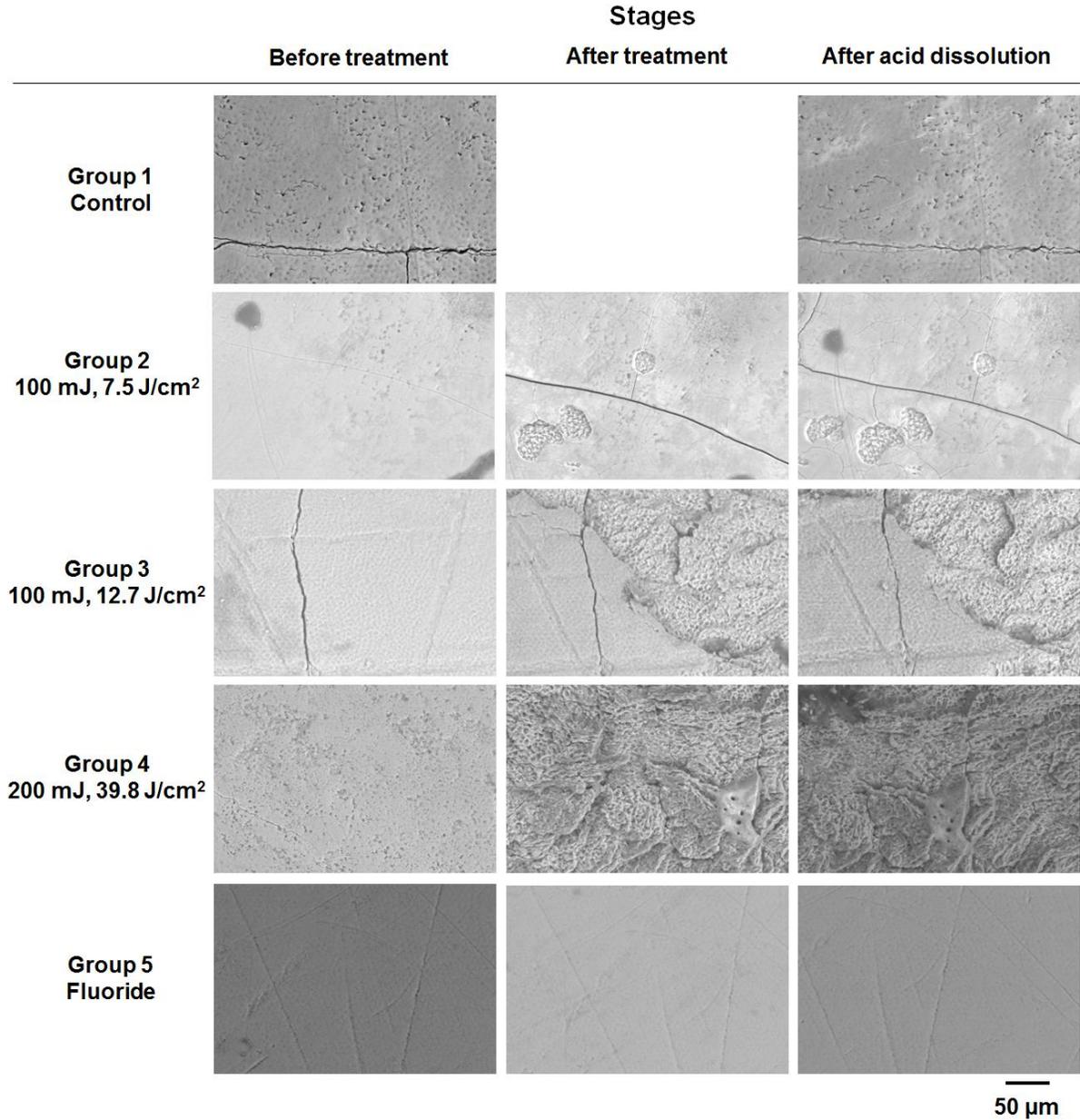


FIG. 2 Representative SEM micrographs of enamel surfaces for control, irradiated and fluoride groups. Before treatment, the teeth showed smooth surfaces or microporosities, as well as some defects. After treatment, signs of damage were observed on irradiated enamel, including craters, completely exposed prisms, fractures and melting. No morphological changes were observed with fluoride application and after acid dissolution. Original magnification = 400x.

*EDS evaluation*

The chemical composition of deciduous enamel surface determined before treatment, after treatment and after acid dissolution is expressed in at% (means and standard deviations). See Tables 2 and 3.

There were statistically significant differences in all analyzed elements, highlighting the following findings. Table 2 shows a decrease AT in C at% in G3, G4 and G8, more evident in groups irradiated at the highest energy density, also AAD. Additionally, in G5 there was an increase in C at% after fluoride application. A decrease in O at% was produced in groups treated with fluoride (G5-G8). Relative to F at%, G5-G8 showed an increase, which was higher in G7. AAD, the values of these groups dropped to 0.00. An increment in trace elements following treatment is displayed in G3, G4, G6 and G7.

Table 3 illustrates the calculated Ca/P molar ratio, as well as the content of such elements, statistically significant differences were found in G4, G7 and G8. The Ca at% was increased AT in these groups and values remained without modifications AAD. With regard to P at%, G4 and G8 had an increment AT and G7 showed a higher value AAD. The Ca/P molar ratio was superior AT in both groups irradiated at  $39.8 \text{ J/cm}^2$  (G4 and G8), and no changes were observed AAD. This ratio was also increased after the combined treatment of G7. Subsequent to surface treatment, G4, G7 and G8 had Ca/P values higher than the one obtained by the control group, but similar to G5 value.

---

TABLE 2. ATOMIC PERCENTAGES (AT%) OF C, O, F AND TRACE ELEMENTS OF THE DECIDUOUS TEETH ENAMEL SURFACE, ANALYZED BEFORE TREATMENT, AFTER TREATMENT AND AFTER ACID DISSOLUTION BY EDS (MEAN  $\pm$  STANDARD DEVIATION)

at% Chemical Element	Stage	Groups											
		G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8				
C	BT	15.76 $\pm$ 7.71 A a	18.34 $\pm$ 8.42 A a	16.45 $\pm$ 8.96 A a	16.70 $\pm$ 3.87 A a	15.57 $\pm$ 7.40 A a	17.70 $\pm$ 7.77 A a	16.66 $\pm$ 4.54 A a	13.48 $\pm$ 5.98 A a	*			
	AT	15.76 $\pm$ 7.71 A,B,C a	13.71 $\pm$ 3.32 A,B,C a	9.41 $\pm$ 3.03 A,B b	1.57 $\pm$ 2.12 D b	23.24 $\pm$ 8.37 C b	17.79 $\pm$ 6.97 A,C a	13.56 $\pm$ 4.13 A,B,C a	1.33 $\pm$ 1.89 D b	**			
	AAD	15.53 $\pm$ 5.97 A,B a	16.86 $\pm$ 6.61 A,B a	17.60 $\pm$ 7.45 A,B a	5.91 $\pm$ 1.46 C c	20.85 $\pm$ 7.93 A,B a,b	21.66 $\pm$ 5.91 A a	12.88 $\pm$ 4.31 B a	0.39 $\pm$ 0.80 D b	**			
O	BT	58.09 $\pm$ 6.82 A,B a	54.77 $\pm$ 6.62 A a	56.63 $\pm$ 5.90 A,B a	60.93 $\pm$ 5.33 A,B a	59.41 $\pm$ 6.10 A,B a	55.31 $\pm$ 6.00 A a	63.92 $\pm$ 0.89 B a	63.50 $\pm$ 1.09 A,B a	**			
	AT	58.09 $\pm$ 6.82 A,B,C a	62.16 $\pm$ 3.53 A,B b	60.96 $\pm$ 2.44 A,B a	65.72 $\pm$ 3.96 B a	48.84 $\pm$ 5.58 C,D b	47.09 $\pm$ 4.39 D b	42.98 $\pm$ 5.56 D b	59.00 $\pm$ 1.87 A b	**			
	AAD	59.13 $\pm$ 5.62 A,B,C a	58.44 $\pm$ 4.57 A,B a,b	57.07 $\pm$ 5.19 A,B a	65.34 $\pm$ 2.18 C a	56.25 $\pm$ 6.31 A,B a	54.28 $\pm$ 3.38 A a	59.85 $\pm$ 3.99 A,B,C c	60.95 $\pm$ 0.27 B c	**			
F	BT	0.00 A a	0.00 A a	0.00 A a	0.00 A a	0.00 A a	0.00 A a	0.00 A a	0.00 A a				
	AT	0.00 A a	0.00 A a	0.00 A a	0.00 A a	2.45 $\pm$ 1.42 B b	6.82 $\pm$ 3.74 B b	17.69 $\pm$ 6.62 C b	3.36 $\pm$ 2.86 A,B b	**			
	AAD	0.00 A a	0.00 A a	0.00 A a	0.00 A a	0.00 A a	0.00 A a	0.00 A a	0.00 A a				
Trace elements	BT	0.67 $\pm$ 0.10 A a	0.67 $\pm$ 0.10 A a	0.67 $\pm$ 0.11 A a	0.57 $\pm$ 0.14 A,B a	0.64 $\pm$ 0.16 A,B a	0.59 $\pm$ 0.12 A,B a	0.46 $\pm$ 0.16 B,C a	0.33 $\pm$ 0.16 C a	*			
	AT	0.67 $\pm$ 0.10 A a	0.63 $\pm$ 0.12 A a	0.84 $\pm$ 0.15 A,B b	0.84 $\pm$ 0.15 A,B b	0.69 $\pm$ 0.11 A a	0.76 $\pm$ 0.12 A,B b	0.96 $\pm$ 0.19 B b	0.53 $\pm$ 0.30 A a	**			
	AAD	0.70 $\pm$ 0.12 A a	0.65 $\pm$ 0.08 A,B a	0.71 $\pm$ 0.15 A a,b	0.64 $\pm$ 0.15 A,B a	0.62 $\pm$ 0.13 A,B a	0.63 $\pm$ 0.16 A,B a	0.71 $\pm$ 0.06 A c	0.45 $\pm$ 0.30 B a	*			

Capital letters in a row are for the comparison by chemical element of different groups in the same stage. Same capital letters follow means that do not differ statistically.

\*Bonferroni test,  $p < 0.05$ ; \*\*Tamhane's T2 test,  $p < 0.05$ .

Lower-case letters in a column are for the comparison by chemical element of different stages in the same group. Same lower-case letters follow means that do not differ statistically (repeated measures analysis of variance [ANOVA],  $p < 0.05$ ).

EDS, energy dispersive X-ray spectroscopy; BT, before treatment; AT, after treatment; AAD, after acid dissolution.

TABLE 3. ATOMIC PERCENTAGES (AT%) OF Ca, P AND Ca/P MOLAR RATIO OF THE DECIDUOUS TEETH ENAMEL SURFACE, ANALYZED BEFORE TREATMENT, AFTER TREATMENT AND AFTER ACID DISSOLUTION BY EDS (MEAN  $\pm$  STANDARD DEVIATION)

at% Chemical Element	Stage	Groups											
		G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8				
Ca	BT	15.25 $\pm$ 2.71 A,B a	15.66 $\pm$ 2.53 A,B a	15.62 $\pm$ 2.86 A,B a,b	12.93 $\pm$ 3.28 A,B a	14.55 $\pm$ 2.63 A,B a	15.99 $\pm$ 2.26 A a	11.29 $\pm$ 3.44 B a	13.48 $\pm$ 4.38 A,B a	*			
	AT	15.25 $\pm$ 2.71 A a	14.08 $\pm$ 2.14 A a,b	17.30 $\pm$ 1.43 A,B a	19.94 $\pm$ 2.58 B,C b	15.04 $\pm$ 2.49 A a	17.10 $\pm$ 2.98 A,B a	15.59 $\pm$ 2.58 A b	22.38 $\pm$ 1.99 C b	*			
	AAD	14.40 $\pm$ 2.01 A a	14.07 $\pm$ 2.71 A,B b	14.68 $\pm$ 2.57 A,B b	17.51 $\pm$ 1.41 B b	13.03 $\pm$ 1.89 A a	13.96 $\pm$ 3.54 A,B a	16.12 $\pm$ 2.70 A,B b	23.61 $\pm$ 0.92 C b	**			
P	BT	10.23 $\pm$ 1.39 A,B a	10.56 $\pm$ 1.35 A a	10.63 $\pm$ 1.48 A a,b	8.87 $\pm$ 1.91 A,B a	9.83 $\pm$ 1.66 A,B a	10.41 $\pm$ 1.23 A,B a	7.67 $\pm$ 1.98 B a	9.21 $\pm$ 2.65 A,B a	**			
	AT	10.23 $\pm$ 1.39 A,B,C a	9.42 $\pm$ 1.49 A a	11.50 $\pm$ 0.97 B,C a	11.94 $\pm$ 1.50 C,D b	9.74 $\pm$ 1.41 A,B a	10.44 $\pm$ 1.13 A,B,C a	9.23 $\pm$ 0.98 A a	13.41 $\pm$ 1.20 D b	*			
	AAD	10.26 $\pm$ 1.03 A a	9.98 $\pm$ 1.45 A a	9.94 $\pm$ 1.37 A b	10.60 $\pm$ 0.64 A a,b	9.24 $\pm$ 1.37 A a	9.47 $\pm$ 1.55 A a	10.45 $\pm$ 0.98 A b	14.61 $\pm$ 0.61 B b	*			
Ca/P molar ratio	BT	1.49 $\pm$ 0.11 A a	1.48 $\pm$ 0.09 A a	1.46 $\pm$ 0.10 A a	1.45 $\pm$ 0.09 A a	1.48 $\pm$ 0.09 A a,b	1.53 $\pm$ 0.10 A a	1.46 $\pm$ 0.18 A a	1.45 $\pm$ 0.11 A a	*			
	AT	1.49 $\pm$ 0.11 A a	1.50 $\pm$ 0.14 A,B a	1.51 $\pm$ 0.06 A,B a	1.67 $\pm$ 0.08 B,C b	1.54 $\pm$ 0.10 A,B,C a	1.63 $\pm$ 0.17 A,B,C a	1.69 $\pm$ 0.18 C b	1.67 $\pm$ 0.09 B,C b	*			
	AAD	1.40 $\pm$ 0.09 A b	1.40 $\pm$ 0.11 A a	1.47 $\pm$ 0.10 A,B a	1.65 $\pm$ 0.08 C b	1.41 $\pm$ 0.06 A b	1.45 $\pm$ 0.16 A a	1.54 $\pm$ 0.14 A,B,C c	1.62 $\pm$ 0.11 B,C b	*			

Capital letters in a row are for the comparison by chemical element of different groups in the same stage. Same capital letters follow means that do not differ statistically.

\*Bonferroni test,  $p < 0.05$ ; \*\*Tamhane's T2 test,  $p < 0.05$ .

Lower-case letters in a column are for the comparison by chemical element of different stages in the same group. Same lower-case letters follow means that do not differ statistically (repeated measures analysis of variance [ANOVA],  $p < 0.05$ ).

EDS, energy dispersive X-ray spectroscopy; BT, before treatment; AT, after treatment; AAD, after acid dissolution.

---

### 7.2.8. Discussion

In the present work, we have studied the morphological and chemical changes of deciduous enamel surface induced by Er:YAG laser irradiation, fluoride topical application and combined treatment, as well as the effects induced by acid dissolution on treated surfaces.

In the first stage, teeth were subjected to SEM and EDS analysis, procedure recommended by the authors as a baseline to evaluate the original morphological and chemical characteristics of enamel surface. At this stage, SEM observation showed defects such as grooves and slightly exposed prisms that could be attributed to the natural wear processes.<sup>20,21</sup> The presence of scarce microfractures before treatment could be due to exposure of the tooth to masticatory or traumatic forces in the oral cavity, dental extraction process or section of the tooth during sample preparation.

The irradiation parameters were chosen according to the results of a pilot study conducted in our laboratory and designed after literature review.<sup>10-12,22,23</sup> Water irrigation was used as a cooling agent to limit the temperature rise in dental tissues,<sup>24</sup> and to avoid the formation of undesired chemical phases more susceptible to acid dissolution.<sup>13</sup> Additionally, the topical fluoride used was APF, because it could reduce enamel decalcification,<sup>25</sup> and increase the formation of calcium fluoride (CaF<sub>2</sub>).<sup>26</sup>

Morphological changes AT were more evident at higher energy densities. At 7.5 J/cm<sup>2</sup> detachment of material in small isolated zones (shallow craters) was produced. Although Apel et al.<sup>22</sup> considered this energy density as subablative for permanent teeth, this may not be applicable to deciduous enamel because it has other characteristics including a thinner thickness, a lower content of Ca and P;<sup>27</sup> thus a predominantly “prismless” outer layer.<sup>28</sup> Whereby deciduous enamel could be less resistant to the laser thermal effect than permanent enamel.

Lased surfaces with an energy density of 12.7 J/cm<sup>2</sup> showed more extended and numerous craters than those produced by laser irradiation at 7.5 J/cm<sup>2</sup>. Nevertheless, the formation of new fractures was not observed in neither of the two densities.

---

---

At the highest energy density, lased teeth showed a totally modified surface with prisms completely exposed, fractures and melting. Even at the macroscopic level, specimens of G4 and G8 showed a rough surface and a white color contrasting with the original teeth hue. In our study, the enamel morphology of specimens lased at  $39.8 \text{ J/cm}^2$  showed severe damage that does not justify its use for caries prevention per se. In fact, for preventive purposes, dental enamel is not intended to be ablated or melted, only structural and chemical changes are expected.<sup>29</sup> Furthermore, the formation of rough surfaces could influence bacterial adhesion and plaque accumulation,<sup>12,15,30</sup> also fractures could be points to initiate demineralization in deeper areas.<sup>29</sup>

Otherwise, fluoride application and the acid dissolution process did not result in morphological modifications. Nonetheless, both procedures produced chemical changes as measured by EDS, a useful analysis tool for this purpose.

According to the results of chemical composition obtained by EDS, the C at% decreased AT in G3, G4 and G8. Samples of G4 and G8 (the highest energy density) showed a significantly decrease with respect to other groups even AAD. These results could be explained by a carbonate reduction and modification of the organic matter in Er:YAG irradiated enamel, as reported by Liu and Hsu.<sup>31</sup> Additionally, the reduction of carbonates decreases the solubility of hydroxyapatite, because carbonate substitutions in the enamel surface give rise to less stability and consequently higher solubility.<sup>32</sup>

On the contrary, for G5, the C content increased after fluoride application, probably due to the intake of organic compounds from the applied APF, such as: glycerin, sodium saccharin and polaxamer. This supports the findings of G7 regarding to the non accentuated reduction of the C content after combined treatment; even though the irradiation process could have liberated carbon, when APF was applied, enamel reintegrated this element. However, the analytical technique used in our study is not capable to differentiate between carbon from the inorganic carbonates and carbon from the organic compounds inside the adamantine matrix. By contrast, the results of G8 could have been influenced by the ablation phenomenon, with possible changes in physical and chemical properties of the enamel, making it less affine to C and F uptake.

---

---

A decrease in O at% was observed in the groups with fluoride application, probably due to the release of this element resulting from the acid-base reaction of hydroxyapatite<sup>33</sup> with the phosphoric acid of the APF product.

The F content AT was higher for G7 than for G5, G6 and G8. This could be explained because the energy density employed in G7 generated a surface with morphological and chemical characteristics that promoted the adsorption of F, as observed by SEM and EDS. Nevertheless, all the groups that acquired F after APF application lost it AAD. This suggests that the majority of the F atoms were not incorporated to the hydroxyapatite structure. The above idea may be supported by the fluoride mechanisms described by other authors.<sup>12,34</sup> When fluoride is topically applied, initially there is a deposition of CaF<sub>2</sub> on the enamel surface, that serves as a reservoir of this element and only a small amount of F gets firmly bound to enamel forming fluorapatite, an almost insoluble compound.<sup>12</sup> Afterwards, during an acid attack, CaF<sub>2</sub> deposited on enamel releases F to perform its anticariogenic action.<sup>34</sup>

Besides, the higher deposition of fluoride in G7 could be associated to the P at% increase AAD probably caused by a withholding of the phosphates in the apatite structure. Nevertheless, additional studies are required to clarify it.

Trace elements increased in the irradiated groups at higher energy densities, as well as in combined treatment groups, excepting G8. However, as expected, they remained below 1.0 at%.

The Ca at% increased in enamel when irradiated at 39.8 J/cm<sup>2</sup> and after the combined treatments of G7 and G8; these values remained without change even AAD. The P at% was increased AT in G4 and G8 and AAD in G7. Despite of the increment in P at% in G4 and G8 AT, the Ca/P molar ratios were increased as a result of a great increment in the Ca at%. Additionally, G7 had also a significant increase in Ca/P molar ratio AT, at the expense of Ca at%.

The Ca/P molar ratio values achieved for G4, G7 and G8 AT were higher than those obtained by control group and close to 1.67, which is the stoichiometric ratio for pure hydroxyapatite Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>. Also, AAD the ratio in these groups was higher than in BT stage.

---



---

Because the Ca/P molar ratio has been considered a reliable mineralization indicator that allows establishment of behavior patterns, independent of variations of other elements in the teeth, the findings in G4, G7 and G8 suggest chemical changes that enhance the mineral content of the enamel structure. Because enamel Er:YAG laser irradiation results in both chemical and morphological changes, research in this field is focused on studying irradiation parameters appropriate for the supposed use, in this case for caries preventive purposes in combination with fluoride. The conditions employed in G4, G7 and G8 resulted in propitious chemical changes, however, morphological changes were adverse.

### **7.2.9. Conclusion**

Morphological changes of Er:YAG laser irradiated enamel surface were from mild to severe damages according to the used energy densities and applied protocol. Therefore, the conditions employed in this study are not recommended for the prevention of dental caries in deciduous teeth.

Er:YAG energy density influenced chemical changes in enamel to enhance its structural mineral content. The energy density of  $12.7 \text{ J/cm}^2$  caused a decrease in the C at%, as well as increased F uptake and an increase in the Ca/P molar ratio when combined with fluoride.

Acid dissolution removed fluoride from enamel surface, as showed by EDS analysis.

### **7.2.10. Acknowledgements**

The authors are thankful to the personal and patients of the Pediatric Dental Clinics of the Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM) and of the Centro de Especialidades Odontológicas del Instituto Materno Infantil del Estado de México (IMIEM), for their support in the collection of the deciduous molars.

---

---

### 7.2.11. References

1. Skeie, M.S., Raadal, M., Strand, G.V., and Espelid, I. (2006). The relationship between caries in the primary dentition at 5 years of age and permanent dentition at 10 years of age - a longitudinal study. *Int. J. Paediatr. Dent.* 16, 152-160.
  2. Clarke, M., Locker, D., Berall, G., Pencharz, P., Kenny, D.J., and Judd, P. (2006). Malnourishment in a population of young children with severe early childhood caries. *Pediatr. Dent.* 28, 254-259.
  3. Leroy, R., Cecere, S., Lesaffre, E., and Declerck, D. (2009). Caries experience in primary molars and its impact on the variability in permanent tooth emergence sequences. *J. Dent.* 37, 865-871.
  4. Kim, C., Hong, Y., Han, D.H., Hong, H.K., Kim, Y.N., and Bae, K.H. (2011). A prospective cohort study on emergence of permanent teeth and caries experience in Korean children. *Int. J. Paediatr. Dent.* 21, 254-260.
  5. Stern, R.H., and Sognaes, R.F. (1964). Laser beam effect on dental hard tissues. *J. Dent. Res.* 43, 873.
  6. Stern, R.H., Sognaes, R.F., and Goodman, F. (1966). Laser effect on *in vitro* enamel permeability and solubility. *J. Am. Dent. Assoc.* 73, 838-843.
  7. Fekrazad, R., and Ebrahimpour, L. (2013). Evaluation of acquired acid resistance of enamel surrounding orthodontic brackets irradiated by laser and fluoride application. *Lasers Med. Sci.* DOI 10.1007/s10103-013-1328-z.
  8. Ahrari, F., Poosti, M., and Motahari, P. (2012). Enamel resistance to demineralization following Er:YAG laser etching for bonding orthodontic brackets. *Dent. Res. J. (Isfahan)* 9, 472-477.
  9. Correa-Afonso, A.M., Pecora, J.D., and Palma-Dibb, R.G. (2013). Influence of laser irradiation on pits and fissures: an *in situ* study. *Photomed. Laser Surg.* 31, 82-89.
  10. Liu, J.F., Liu, Y., and Stephen, H.C. (2006). Optimal Er:YAG laser energy for preventing enamel demineralization. *J. Dent.* 34, 62-66.
  11. Castellan, C.S., Luiz, A.C., Bezinelli, L.M., et al. (2007). *In vitro* evaluation of enamel demineralization after Er:YAG and Nd:YAG laser irradiation on primary teeth. *Photomed. Laser Surg.* 25, 85-90.
-

- 
12. Bevilacqua, F.M., Zezell, D.M., Magnani, R., da Ana, P.A., and Eduardo Cde, P. (2008). Fluoride uptake and acid resistance of enamel irradiated with Er:YAG laser. *Lasers Med. Sci.* 23, 141-147.
  13. Correa-Afonso, A.M., Ciconne-Nogueira, J.C., Pecora, J.D., and Palma-Dibb, R.G. (2010). Influence of the irradiation distance and the use of cooling to increase enamel-acid resistance with Er:YAG laser. *J. Dent.* 38, 534-540.
  14. Lasmar, M.F., Reher, V.G., Lalloo, R., and Reher, P. (2012). Enamel demineralization and bracket bond strength when etching with acid and/or Er:YAG laser. *Aust. Dent. J.* 57, 190-195.
  15. Rodriguez-Vilchis, L.E., Contreras-Bulnes, R., Sanchez-Flores, I., and Samano, E.C. (2010). Acid resistance and structural changes of human dental enamel treated with Er:YAG laser. *Photomed. Laser Surg.* 28, 207-211.
  16. Souza-Gabriel, A.E., Chinelatti, M.A., Borsatto, M.C., Pecora, J.D., Palma-Dibb, R.G., and Corona, S.A. (2008). SEM analysis of enamel surface treated by Er:YAG laser: influence of irradiation distance. *Microsc. Res. Tech.* 71, 536-541.
  17. Rodriguez-Vilchis, L.E., Contreras-Bulnes, R., Olea-Mejia, O.F., Sanchez-Flores, I., and Centeno-Pedraza, C. (2011). Morphological and structural changes on human dental enamel after Er:YAG laser irradiation: AFM, SEM, and EDS evaluation. *Photomed. Laser Surg.* 29, 493-500.
  18. Kwon, Y.H., Lee, J.S., Choi, Y.H., Lee, J.M., and Song, K.B. (2005). Change of enamel after Er:YAG and CO<sub>2</sub> laser irradiation and fluoride treatment. *Photomed. Laser Surg.* 23, 389-394.
  19. Hossain, M., Nakamura, Y., Kimura, Y., Yamada, Y., Ito, M., and Matsumoto, K. (2000). Caries-preventive effect of Er:YAG laser irradiation with or without water mist. *J. Clin. Laser Med. Surg.* 18, 61-65.
  20. Lussi, A., Jaeggi, T., and Zero, D. (2004). The role of diet in the aetiology of dental erosion. *Caries Res.* 38 Suppl 1, 34-44.
  21. Rios, D., Honorio, H.M., Magalhaes, A.C., et al. (2008). Scanning electron microscopic study of the *in situ* effect of salivary stimulation on erosion and abrasion in human and bovine enamel. *Braz. Oral Res.* 22, 132-138.
  22. Apel, C., Meister, J., Ioana, R.S., Franzen, R., Hering, P., and Gutknecht, N. (2002). The ablation threshold of Er:YAG and Er:YSGG laser radiation in dental enamel. *Lasers Med. Sci.* 17, 246-252.
-

- 
23. Cecchini, R.C., Zezell, D.M., de Oliveira, E., de Freitas, P.M., and Eduardo Cde, P. (2005). Effect of Er:YAG laser on enamel acid resistance: morphological and atomic spectrometry analysis. *Lasers Surg. Med.* 37, 366-372.
  24. Visuri, S.R., Walsh, J.T. Jr., and Wigdor, H.A. (1996). Erbium laser ablation of dental hard tissue: effect of water cooling. *Lasers Surg. Med.* 18, 294-300.
  25. Anaraki, S.N., Serajzadeh, M., and Fekrazad, R. (2012). Effects of laser-assisted fluoride therapy with a CO<sub>2</sub> laser and Er, Cr:YSGG laser on enamel demineralization. *Pediatr. Dent.* 34, e92-96.
  26. Hayacibara, M.F., Paes Leme, A.F., Lima, Y.B., et al. (2004). Alkali-soluble fluoride deposition on enamel after professional application of topical fluoride *in vitro*. *J. Appl. Oral Sci.* 12, 18-21.
  27. De Menezes Oliveira, M.A., Torres, C.P., Gomes-Silva, J.M., et al. (2010). Microstructure and mineral composition of dental enamel of permanent and deciduous teeth. *Microsc. Res. Tech.* 73, 572-577.
  28. Ripa, L.W. (1966). The histology of the early carious lesion in primary teeth with special reference to a "prismless" outer layer of primary enamel. *J. Dent. Res.* 45, 5-11.
  29. Apel, C., Meister, J., Gotz, H., Duschner, H., and Gutknecht, N. (2005). Structural changes in human dental enamel after subablative erbium laser irradiation and its potential use for caries prevention. *Caries Res.* 39, 65-70.
  30. Ota-Tsuzuki, C., Martins, F.L., Giorgetti, A.P., de Freitas, P.M., and Duarte, P.M. (2009). In vitro adhesion of *Streptococcus sanguinis* to dentine root surface after treatment with Er:YAG laser, ultrasonic system, or manual curette. *Photomed. Laser Surg.* 27, 735-741.
  31. Liu, Y., and Hsu, C.Y. (2007). Laser-induced compositional changes on enamel: a FT-Raman study. *J. Dent.* 35, 226-230.
  32. Ibrahim, D.M., Mostafa, A.A., and Korowash, S.I. (2011). Chemical characterization of some substituted hydroxyapatites. *Chem. Cent. J.* 5, 74.
  33. Dorozhkin, S.V. (2002). A review on the dissolution models of calcium apatites. *Prog. Cryst. Growth Ch.* 44, 45-61.
  34. Tenuta, L.M., Cerezetti, R.V., Del Bel Cury, A.A., Tabchoury, C.P., and Cury, J.A. (2008). Fluoride release from CaF<sub>2</sub> and enamel demineralization. *J. Dent. Res.* 87, 1032-1036.
-

---

# **Discusión General**

---

---

## 8. Discusión General

Debido a que en la *Fase I* nuestro objetivo fue determinar la morfología, composición química, estructura y fases cristalinas características de la superficie del esmalte de los dientes temporales humanos sanos (sin alguna modificación física o química), después de la extracción de la cavidad bucal, la superficie del esmalte no fue pulida o grabada antes de la observación en SEM a fin de mantener la morfología y estructura original. El patrón “principalmente liso con algunos surcos” (Anexo 3. Figura 2a) observado en este estudio podría ser explicado por el hecho de que existe “esmalte aprismático” en la capa más externa de los dientes deciduos, donde los cristalitos están ordenados paralelos unos a otros de manera regular.<sup>108</sup> Los surcos bien definidos encontrados en algunos dientes podrían haber sido formados debido a los procesos de abrasión a los que son sometidos todos los dientes erupcionados,<sup>109</sup> como aquellos provocados por el cepillado dental o la alimentación. Estos hallazgos concuerdan con los de Neves et al.<sup>110</sup> quienes obtuvieron una imagen similar de SEM de los dientes primarios sanos sin tratamiento alguno.

El patrón de “abundantes microporosidades” (Anexo 3. Figura 2b) fue observado a lo largo de los surcos de desgaste, sugiriendo que estas áreas podrían ser más propensas a sufrir cambios morfológicos y estructurales resultantes de los factores inherentes al ambiente bucal.

Los prismas expuestos se encontraron en el tercio incisal probablemente debido a la presencia de fuerzas localizadas aplicadas en esta zona durante la función masticatoria. Como lo reportaron Kodaka et al.<sup>108</sup> estas áreas mostraron "arcadas en forma circular" (Anexo 3. Figura 2d) y prismas en forma de arcada comúnmente llamados prismas en “ojo de cerradura” (Anexo 3. Figura 2c), en los que la cabeza (verdadero prisma) y la cola (esmalte interprismático) pueden observarse claramente. No obstante, contrario a nuestro estudio, los dientes fueron grabados con EDTA previo al análisis en SEM.

Es importante resaltar que todos los patrones morfológicos mostraron defectos, como los son los surcos, las microporosidades y/o los prismas expuestos en superficies bucales “lisas”. Además, estos defectos son sitios vulnerables a la retención bacteriana y su posterior desmineralización, hecho que debe ser considerado para la prevención de caries en Odontopediatría.

---

---

En cuanto a la composición química, el esmalte dental humano ha sido analizado mediante EDS en reportes previos,<sup>111-115</sup> la mayoría de los cuales incluyendo muestras de sujetos enfermos. Adicionalmente, existen algunas variaciones en los resultados que han sido reportados en la literatura. Además, el contenido de Ca y P fue evaluado, excluyendo otros elementos que forman parte de la estructura de hidroxiapatita, tales como C y O.<sup>111, 112</sup> En nuestro estudio no existió diferencia entre dientes temporales incisivos y caninos en términos de composición química (Anexo 4. Tabla 7), a pesar de sus diferencias en formación, erupción y tiempos de exfoliación que podrían estar influenciados por distintos factores intrínsecos y extrínsecos.

Cabe mencionar que la relación molar Ca/P representa una relación independiente de la presencia o ausencia de otros elementos, lo cual constituye un criterio para comparar resultados, razón por la cual fue utilizada en nuestro estudio. La relación molar Ca/P promedio fue cercana pero ligeramente menor que el rango de 1.55-1.70 reportado por Shore et al.<sup>114</sup> para el esmalte deciduo. Por otra parte, una relación molar Ca/P alrededor de 1.74 ha sido reportada para los dientes permanentes.<sup>112</sup> Esto sugiere que existe una pequeña diferencia entre esta relación molar entre dientes temporales y permanentes, aunque se requieren estudios adicionales.

Otro punto a considerar está relacionado con el uso indistinto del término “fosfato” ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) en lugar de “fósforo” cuando se hace referencia al elemento P, lo cual conduce a interpretaciones erróneas.<sup>113, 115</sup> Por otra parte, los resultados expresados en porcentaje en peso (wt%, por su sigla en inglés) como unidad de medida han sido ampliamente difundidos. Sin embargo, el %at es una manera más directa y sencilla para relacionar el número de átomos de cada elemento, como fue empleado en esta investigación.

Con respecto a la caracterización estructural, existen ventajas importantes cuando se trabaja con esmalte pulverizado en lugar de esmalte fracturado para el análisis de XRD. Una es que todas las direcciones de los planos promueven la difracción ya que todos los granos están aleatoriamente orientados. Una segunda ventaja es que la geometría del análisis se ve favorecida cuando el polvo se aplana en el portamuestras, evitando efectos de borde tales como señales de difracción secundarias, etc. Por consiguiente, estas condiciones promueven picos de difracción más intensos y definidos así como menos ruido en el espectro para un análisis más fácil y preciso.

---

---

Los difractogramas de rayos X (Anexo 5. Figura 3) mostraron picos estrechos y bien definidos, sugiriendo un tamaño de cristalita grande. En efecto, el tamaño de cristalita calculado coincidió con el valor reportado por Leventouri et al.<sup>116</sup> en dientes temporales, el cual corresponde a una apatita bien cristalizada (>200 Å), de acuerdo a Pleshko et al.<sup>117</sup> No obstante, no pudimos determinar mediante XRD la proporción entre hidroxiapatita y apatita carbonatada ya que los parámetros de red fueron los mismos e indistinguibles entre ellos.

Asimismo, FTIR resultó ser una útil herramienta para analizar la hidroxiapatita y el contenido orgánico en el esmalte (Anexo 6. Figura 4), mostrando bandas de los grupos funcionales en concordancia con los estudios de otros autores, como lo son: hidroxilo,<sup>118</sup> fosfatos,<sup>118-121</sup> carbonatos,<sup>116, 118, 119, 122</sup> y amidas.<sup>118, 123</sup>

La relación de absorbancia de carbonato/absorbancia de fosfato, como un indicador del grado de carbonato en la hidroxiapatita,<sup>124</sup> mostró una presencia incrementada de carbonato tipo B en relación al tipo A. SØnju y Ruyter<sup>119</sup> reportaron que solamente alrededor del 11% del contenido total de carbonato en el esmalte decíduo es tipo A.

Por otro lado, ya que XPS es una técnica de superficie con la que se realiza un análisis aproximadamente de 1 a 6 nm de profundidad, decidimos pulir las muestras para eliminar el contenido orgánico encima del esmalte, reduciendo el %at de N a un mínimo de acuerdo a los resultados de nuestro estudio piloto. Se ha reportado que la completa remoción de la película adquirida se alcanza puliendo los dientes alrededor de 5 minutos con una copa de goma giratoria,<sup>125</sup> sin embargo, para evitar la contaminación, decidimos no utilizar abrasivos. La presencia de N y una elevada cantidad de C en la superficie del esmalte (Anexo 7. Tabla 8) puede ser debida a dos factores: uno es que estos elementos son parte de las proteínas que forman la película orgánica que tal vez no fue eliminada completamente y la segunda es que el XPS es sensible al carbono ambiental. Los %at de O, P y Ca fueron menores con XPS que cuando fueron analizados por EDS, probablemente debido al incremento en el %at de C. Adicionalmente, las ligeras variaciones entre las relaciones molares Ca/P podrían ser explicadas por la profundidad de análisis de cada técnica empleada, sugiriendo diferencias en el contenido mineral desde la superficie del esmalte hacia el interior. Una relación molar Ca/P menor en la superficie más

---



---

externa (XPS) sugiere la pérdida de iones de  $\text{Ca}^{2+}$  de la superficie, lo cual podría estar relacionado con defectos morfológicos microscópicos como lo son las microporosidades y los prismas expuestos. Weatherell et al.<sup>126</sup> también encontraron valores bajos de Ca/P cerca de la superficie y mencionaron que esto podría ser indicativo de una apatita deficiente de calcio.

Una ventaja de la técnica de XPS es que el estado químico o electrónico de cada elemento puede ser estudiado. Como se mencionó anteriormente, la relación promedio entre  $\text{Ca}^{2+}$  unido a  $\text{PO}_4^{3-}$  y  $\text{Ca}^{2+}$  unido a OH fue aproximadamente 10:1 (Anexo 8. Figura 5). En la hidroxiapatita pura hay 9 iones de Ca unidos a  $\text{PO}_4^{3-}$  por cada ion de Ca unido a OH. La diferencia puede deberse a sustituciones por  $\text{CO}_3^{2-}$  y otros defectos cristalinos como vacancias e intersticios.

En esta era de grandes avances tecnológicos, los hallazgos revelados en este estudio mediante diversas técnicas de caracterización deberían ser considerados como un todo para la síntesis de nuevos materiales bioactivos. Dependiendo del uso deseado, para la protección del esmalte éstos deben de tener una alta afinidad química, mientras que para reemplazar la estructura de hidroxiapatita y lograr una adecuada adhesión, los materiales deben tener una composición y una estructura similares a las descritas por los autores.

Por otra parte, en la *Fase II* del presente estudio se evaluaron los cambios químicos y morfológicos de la superficie de los dientes temporales inducidos por la irradiación con láser Er:YAG, la aplicación de fluoruro tópico y el tratamiento combinado, así como los efectos inducidos por la disolución ácida en las superficies tratadas. Para el cumplimiento de los objetivos se realizaron tres etapas de análisis: antes del tratamiento (BT), después del tratamiento (AT) y después de la disolución ácida (AAD).

En la primera etapa, los dientes fueron estudiados mediante SEM y EDS, procedimientos recomendados por los autores como un punto de partida o base para evaluar las características morfológicas y químicas originales de la superficie del esmalte. En esta etapa, la observación al SEM mostró defectos como surcos y prismas ligeramente expuestos (Anexo 9. Figura 6) que podrían ser atribuidos a los procesos de desgaste naturales.<sup>127, 128</sup> La presencia de escasas microfracturas antes del tratamiento podrían ser debidas a la exposición del diente a fuerzas

---

---

masticatorias o traumáticas en la cavidad oral, el proceso de extracción dental o la sección del diente durante la preparación de la muestra.

Los parámetros de irradiación fueron elegidos de acuerdo a los resultados de un estudio piloto conducido en nuestro laboratorio y diseñado después de la revisión de la literatura.<sup>70-72, 91, 129</sup> La irrigación con agua fue utilizada como un agente de enfriamiento para limitar el aumento de la temperatura en los tejidos dentales<sup>130</sup> y para evitar la formación de fases químicas no deseadas que son más susceptibles a la disolución ácida.<sup>131</sup> Adicionalmente, el fluoruro tópico utilizado fue APF, debido a que podría reducir la descalcificación del esmalte,<sup>132</sup> e incrementar la formación de  $(CaF_2)$ .<sup>133</sup>

Los cambios morfológicos del esmalte después del tratamiento (AT) fueron más evidentes a mayores densidades de energía (Anexo 9. Figura 6). A  $7.5 J/cm^2$  se produjo el desprendimiento de material en zonas aisladas (cráteres poco profundos). A pesar de que Apel et al.<sup>129</sup> consideraron esta densidad de energía como subablativa para dientes permanentes, esto tal vez no es aplicable al esmalte deciduo porque tiene otras características incluyendo un espesor más delgado, un menor contenido de Ca y P,<sup>111</sup> así como una capa exterior predominantemente “aprisísmática”.<sup>134</sup> Es por esto que el esmalte deciduo podría ser menos resistente al efecto térmico del láser que el esmalte permanente.

Las superficies irradiadas con una densidad de energía de  $12.7 J/cm^2$  mostraron cráteres más extensos y numerosos que aquellos producidos por la irradiación láser a  $7.5 J/cm^2$ . Sin embargo, no se observó la formación de nuevas fracturas en ninguna de las dos densidades.

A la densidad de energía más alta, los dientes irradiados mostraron una superficie totalmente modificada con prismas completamente expuestos, fracturas y fusión. Aún a nivel macroscópico, los especímenes de G4 y G8 mostraron una superficie rugosa y un color blanco contrastante con el matiz original del diente. En nuestro estudio, la morfología del esmalte de los especímenes irradiados a  $39.8 J/cm^2$  mostraron un daño severo que no justifica su uso para la prevención de caries *per se*. De hecho, para propósitos preventivos, se pretende que el esmalte dental no sea ablacionado o fundido, únicamente se esperan cambios estructurales y químicos.<sup>94</sup> Además, la

---

---

formación de superficies rugosas podría ocasionar adhesión bacteriana y acumulación de placa,<sup>72, 93, 135</sup> asimismo las fracturas podrían ser puntos para el inicio de la desmineralización en zonas más profundas.<sup>94</sup>

Por otro lado, la aplicación de fluoruro y el proceso de disolución ácida no produjeron modificaciones morfológicas. No obstante, ambos procedimientos produjeron cambios químicos de acuerdo a las mediciones con EDS, una herramienta de análisis útil para este propósito.

De acuerdo a los resultados de la composición química del esmalte obtenidos mediante EDS (Anexo 10. Tabla 9), el %at de C disminuyó AT en G3, G4 y G8. Las muestras de G4 y G8 (densidad de energía más alta) mostraron un decremento significativo con respecto a los demás grupos, aún AAD. Estos resultados podrían ser explicados por una reducción de carbonatos y modificación de la materia orgánica en el esmalte irradiado con Er:YAG, como lo reportaron Liu y Hsu.<sup>136</sup> Adicionalmente, la reducción de carbonatos disminuye la solubilidad de la hidroxiapatita, debido a que las sustituciones con carbonato en la superficie del esmalte generan una menor estabilidad y consecuentemente una mayor solubilidad.<sup>137</sup>

Por el contrario, para G5, el contenido de C se incrementó después de la aplicación de fluoruro, probablemente debido a la captación de compuestos orgánicos del APF aplicado, así como: glicerina, sacarina de sodio y polaxámero. Lo anterior respalda los hallazgos de G7 en cuanto a la reducción no acentuada del contenido de C después del tratamiento combinado; a pesar de que el proceso de irradiación pudo haber liberado carbono, cuando se aplicó el APF, el esmalte reintegró este elemento. De cualquier manera, la técnica analítica utilizada en nuestro estudio no es capaz de diferenciar entre carbono de los carbonatos inorgánicos y carbono de los compuestos orgánicos que se encuentran dentro de la matriz adamantina. En contraste, los resultados de G8 podrían haber sido influenciados por el fenómeno de ablación, con posibles cambios en las propiedades físicas y químicas del esmalte, haciéndolo menos afín a la captación de C y F.

Un decremento en el %at de O fue observado en los grupos con aplicación de fluoruro, probablemente debido a la liberación de este elemento, resultante de la reacción ácido-base de la hidroxiapatita<sup>138</sup> con el ácido fosfórico del producto de APF.

---

---

En la etapa AT, el contenido de F fue mayor para G7 que para G5, G6 y G8. Esto podría ser explicado porque la densidad de energía empleada en G7 generó una superficie con características morfológicas y químicas que promovió la adsorción de F, como se observó mediante SEM y EDS. Sin embargo, todos los grupos que adquirieron F después de la aplicación de APF lo perdieron AAD. Esto sugiere que la mayoría de los átomos de F no fueron incorporados a la estructura de hidroxiapatita. La idea anterior puede ser soportada por los mecanismos del fluoruro descritos por otros autores.<sup>72, 139</sup> Cuando el fluoruro es aplicado tópicamente, inicialmente hay una deposición de  $\text{CaF}_2$  en la superficie del esmalte, que sirve como un reservorio de este elemento y solamente una pequeña cantidad de F se une firmemente al esmalte formando fluorapatita, un compuesto casi insoluble.<sup>72</sup> Posteriormente, durante un ataque ácido, el  $\text{CaF}_2$  depositado en el esmalte libera F para realizar su acción anticariogénica.<sup>139</sup>

Además, una mayor deposición de fluoruro en G7 podría estar asociada al incremento del %at de P AAD, probablemente causado por una retención de los fosfatos en la estructura de la apatita. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para clarificar esto.

Los elementos traza se incrementaron en los grupos irradiados a las densidades de energía más altas, así como en los grupos de tratamiento combinado, exceptuando G8. De cualquier manera, como se esperaba, éstos permanecieron por debajo de 1.0 %at.

El %at de Ca se incrementó en el esmalte cuando fue irradiado a  $39.8 \text{ J/cm}^2$  y después de los tratamientos combinados de G7 y G8 (Anexo 11. Tabla 10); estos valores se mantuvieron sin cambio aún AAD. El %at de P se incrementó AT en G4 y G8 y AAD en G7. A pesar del incremento en el %at de P en G4 y G8 AT, las relaciones molares Ca/P se incrementaron como resultado de un gran incremento en el %at de Ca. Adicionalmente, G7 tuvo también un incremento significativo en la relación molar Ca/P AT, a expensas del %at de Ca.

Los valores de relación molar Ca/P alcanzados por G4, G7 y G8 AT fueron más altos que aquellos obtenidos por el grupo control y cercanos a 1.67, que es la relación estequiométrica para la hidroxiapatita pura  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . También, en estos grupos, AAD la relación Ca/P fue mayor que en la etapa BT.

---

---

Ya que la relación molar Ca/P ha sido considerada como un indicador confiable de la mineralización que permite establecer patrones de comportamiento, independiente de las variaciones de otros elementos en el diente, los hallazgos en G4, G7 y G8 sugieren cambios químicos que mejoran el contenido mineral de la estructura del esmalte. Debido al hecho de que la irradiación con láser Er:YAG resulta en cambios tanto químicos como morfológicos, la investigación en este campo está enfocada en estudiar los parámetros de irradiación apropiados para el uso supuesto, en este caso para propósitos de prevención de caries en combinación con fluoruro. Las condiciones empleadas en G4, G7 y G8 dieron como resultado cambios químicos favorables, sin embargo, los cambios morfológicos fueron adversos.

---

---

# **Conclusiones Generales**

---

---

## 9. Conclusiones Generales

### 9.1. Conclusiones

#### *Fase I*

- Morfológicamente, el esmalte de los dientes temporales sanos mostró dos patrones principales: “principalmente liso con algunos surcos” y “abundantes microporosidades”. “Prismas expuestos” fue un patrón secundario localizado únicamente en el tercio incisal.
- Químicamente, existieron ligeras variaciones entre las relaciones molares Ca/P encontradas mediante EDS y XPS, sugiriendo diferencias en el contenido mineral desde la superficie del esmalte hacía el interior.
- Estructuralmente, las fases cristalinas encontradas en el esmalte mediante XRD de polvos fueron hidroxiapatita y apatita carbonatada; y existió una mayor cantidad de carbonato tipo B incorporado que tipo A como se evidenció mediante FTIR.

#### *Fase II*

- Los cambios morfológicos de las superficies del esmalte irradiadas con láser Er:YAG incluyeron daños desde leves hasta severos de acuerdo a las densidades de energía utilizadas y el protocolo aplicado. Por lo tanto, las condiciones empleadas en este estudio no son recomendadas para la prevención de caries de dientes temporales.
  - La densidad de energía del láser Er:YAG influyó cambios químicos en el esmalte para mejorar su contenido mineral estructural. La densidad de energía de  $12.7 \text{ J/cm}^2$  provocó un decremento en el %at de C, así como una mayor captación de F y un incremento en la relación molar Ca/P, cuando estuvo en combinación con fluoruro.
  - La disolución ácida removió fluoruro de la superficie del esmalte, como lo muestra el análisis de EDS.
-

---

## 9.2. Limitaciones

### *Fases I y II*

En general, la recolección de los órganos dentarios limitó el tamaño de la muestra de los estudios. La mayoría de los niños que acuden a las clínicas de Odontopediatría de las instituciones públicas colaboradoras cursan con algún proceso carioso y fue difícil recolectar dientes temporales sanos con las características mencionadas en los criterios de inclusión.

### *Fase I*

A pesar de tener una muestra compuesta por 30 dientes temporales, únicamente 4 dientes pudieron ser analizados mediante cada técnica de XPS, XRD y FTIR. Los equipos que se utilizan para estos análisis tienen alta demanda y están sujetos a la disponibilidad de horarios, lo cual limitó la cantidad de muestras analizadas.

### *Fase II*

En el protocolo de investigación se tenía planeado analizar mediante XPS la superficie del esmalte de los dientes después de tratamiento y después de disolución ácida, sin embargo, con la experiencia antes mencionada en la *Fase I*, nos percatamos que no era viable analizar tantas muestras de los ocho grupos y tuvimos que eliminar esta técnica del estudio.

De igual manera, la cuantificación de los elementos en solución después del proceso de disolución ácida utilizando la técnica de Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS) no fue posible, pues a pesar de que se realizaron estudios piloto para este fin, el equipo dejó de funcionar por un periodo prolongado.

## 9.3. Recomendaciones

### *Fase I*

El conocimiento profundo del esmalte temporal es requerido para mejorar las técnicas de prevención y tratamiento, así como la síntesis de nuevos materiales bioactivos. Es por esto que se sugiere a los Odontopediatras y demás involucrados en el cuidado dental a que profundicen en el

---



---

conocimiento científico acerca de las características morfológicas, químicas y estructurales inherentes a la dentición temporal.

Es importante resaltar que los patrones microscópicos morfológicos que incluyeron defectos como surcos, microporosidades y prismas expuestos, podrían contribuir a la retención bacteriana, los procesos de desmineralización y la sensibilidad dental en la cavidad bucal. Por estas razones se recomienda que los Odontopediatras tomen en cuenta estos factores en la clínica para la prevención de la caries dental y/o de efectos adicionales no deseados.

### *Fase II*

Si bien XPS no pudo utilizarse en el presente estudio, se propone como una técnica de análisis superficial que complementaría trabajos posteriores que involucren irradiación con láser Er:YAG en dientes temporales, pues podría proporcionar información valiosa acerca de las interacciones post-tratamiento entre elementos químicos.

Se recomienda realizar la cuantificación de los elementos químicos liberados a la solución ácida con una técnica que tenga la sensibilidad adecuada (como podría ser ICP-MS), para evaluar la supuesta resistencia a la disolución que la irradiación con láser Er:YAG podría conferir al esmalte dental.

---

---

# **Referencias Bibliográficas**

---

---

## 10. Referencias Bibliográficas:

1. Palma Cárdenas A, Sánchez Aguilera F. Técnicas de ayuda odontológica y estomatológica. Madrid: Paraninfo; 2007.
  2. Escobar Muñoz F. Anatomía e histología de la dentición temporal. En: Escobar Muñoz F, editor. Odontología Pediátrica. Madrid: Ripano; 2012. p. 71-87.
  3. Mendoza Mendoza A. Desarrollo y erupción dentaria. En: Boj JR, Catalá M, García-Ballesta C, Mendoza A, editores. Odontopediatría. Barcelona: Masson; 2005. p. 55-65.
  4. Ross MH, Pawlina W. Histología. Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular. 5a. ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2007.
  5. Dongmei C. Histología con correlaciones funcionales y clínicas. Madrid: Wolters Kluwer Health España; 2011.
  6. Geneser F. Histología. 3a. ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2000.
  7. Gorritxo Gil B, Abarrategui López I. Consideraciones morfológicas de la dentición temporal. En: Boj JR, Catalá M, García-Ballesta C, Mendoza A, editores. Odontopediatría. Barcelona: Masson; 2005. p. 27-36.
  8. Kakaboura A, Papaianoulis L. Bonding of Resinous Materials on Primary Enamel. En: Eliades G, Watts DC, Eliades T, editores. Dental Hard Tissues and Bonding: Interfacial Phenomena and Related Properties. Berlin: Springer; 2005. p. 35-51.
  9. Keyes PH. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. Findings and implications. Arch Oral Biol. 1960 Mar;1:304-20.
  10. Harris NO, García-Godoy F. Odontología preventiva primaria. 5a. ed. México, DF: El Manual Moderno; 2001.
  11. Robinson C, Shore RC, Brookes SJ, Strafford S, Wood SR, Kirkham J. The chemistry of enamel caries. Crit Rev Oral Biol Med. 2000;11(4):481-95.
  12. Garcia-Godoy F, Hicks MJ. Maintaining the integrity of the enamel surface: the role of dental biofilm, saliva and preventive agents in enamel demineralization and remineralization. J Am Dent Assoc. 2008 May;139 Suppl:25S-34S.
  13. ten Cate JM, Jongebloed WL, Arends J. Remineralization of artificial enamel lesions *in vitro*. IV. Influence of fluorides and diphosphonates on short- and long-term remineralization. Caries Res. 1981;15(1):60-9.
-

- 
14. Cury JA, Tenuta LM. Enamel remineralization: controlling the caries disease or treating early caries lesions? *Braz Oral Res.* 2009;23 Suppl 1:23-30.
  15. Higashida B. *Odontología preventiva*. México: McGraw Hill; 2000.
  16. Hollister MC, Weintraub JA. The association of oral status with systemic health, quality of life, and economic productivity. *J Dent Educ.* 1993 Dic;57(12):901-12.
  17. Petersen PE. *The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century--the approach of the WHO Global Oral Health Programme*. Geneva: World Health Organization; 2003.
  18. Irigoyen-Camacho ME. [Dental caries in schoolchildren of the Federal District]. *Salud Publica Mex.* 1997 Mar-Abr;39(2):133-6.
  19. Velazquez Monroy O, Vera Hermosillo H, Irigoyen Camacho ME, Mejia Gonzalez A, Sanchez Perez TL. [Changes in the prevalence of dental caries in schoolchildren in three regions of Mexico: surveys from 1987-1988 and 1997-1998]. *Rev Panam Salud Publica.* 2003 May;13(5):320-6.
  20. Villalobos-Rodelo JJ, Medina-Solis CE, Molina-Frechero N, Vallejos-Sanchez AA, Pontigo-Loyola AP, Espinoza-Beltran JL. [Dental caries in schoolchildren aged 6-12 years in Navolato, Sinaloa, Mexico: experience, prevalence, severity and treatment needs]. *Biomedica.* 2006 Jun;26(2):224-33.
  21. Casanova-Rosado AJ, Medina-Solis CE, Casanova-Rosado JF, Vallejos-Sanchez AA, Maupome G, Avila-Burgos L. Dental caries and associated factors in Mexican schoolchildren aged 6-13 years. *Acta Odontol Scand.* 2005 Ago;63(4):245-51.
  22. Rodríguez-Vilchis LE, Contreras-Bulnes R, Arjona-Serrano J, Soto-Mendieta MR, Alanís-Tavira J. Prevalencia de caries y conocimientos sobre salud-enfermedad bucal de niños (3 a 12 años) en el Estado de México. *Rev ADM.* 2006;63(5):170-5.
  23. de la Fuente-Hernandez J, Gonzalez de Cossio M, Ortega-Maldonado M, Sifuentes-Valenzuela MC. [Dental decay and tooth loss at the high school level in Mexican students]. *Salud Publica Mex.* 2008 May-Jun;50(3):235-40.
  24. Ortega-Maldonado M, Mota-Sanhua V, Lopez-Vivanco JC. [Oral health status of adolescents in Mexico City]. *Rev Salud Publica (Bogotá).* 2007 Jul-Sep;9(3):380-7.
-

- 
25. Garcia-Cortes JO, Medina-Solis CE, Loyola-Rodriguez JP, Mejia-Cruz JA, Medina-Cerda E, Patino-Marin N et al. Dental caries' experience, prevalence and severity in Mexican adolescents and young adults. *Rev Salud Pública (Bogotá)*. 2009 Ene-Feb;11(1):82-91.
  26. Secretaría de Salud. Perfil epidemiológico de la salud bucal en México 2010. Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud, Dirección General de Epidemiología. 2011:103.
  27. Navit S, Katiyar A, Samadi F, Jaiswal JN. Rehabilitation of severely mutilated teeth under general anesthesia in an emotionally immature child. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2010 Ene-Mar;28(1):42-4.
  28. Clarke M, Locker D, Berall G, Pencharz P, Kenny DJ, Judd P. Malnourishment in a population of young children with severe early childhood caries. *Pediatr Dent*. 2006 May-Jun;28(3):254-9.
  29. Li Y, Wang W. Predicting caries in permanent teeth from caries in primary teeth: an eight-year cohort study. *J Dent Res*. 2002 Ago;81(8):561-6.
  30. Beltrán-Valladares PR, Cocom-Tun H, Casanova-Rosado JF, Vallejos-Sánchez AA, Medina-Solís CE, Maupomé G. Caries prevalence and some associated factors in 6-9-year-old schoolchildren in Campeche, Mexico. *Rev Biomed*. 2006 Enero-Marzo;17(1):25-33.
  31. Vallejos-Sanchez AA, Medina-Solis CE, Casanova-Rosado JF, Maupome G, Casanova-Rosado AJ, Minaya-Sanchez M. [Enamel defects, caries in primary dentition and fluoride sources: relationship with caries in permanent teeth]. *Gac Sanit*. 2007 May-Jun;21(3):227-34.
  32. Skeie MS, Raadal M, Strand GV, Espelid I. The relationship between caries in the primary dentition at 5 years of age and permanent dentition at 10 years of age - a longitudinal study. *Int J Paediatr Dent*. 2006 May;16(3):152-60.
  33. Leroy R, Bogaerts K, Lesaffre E, Declerck D. Effect of caries experience in primary molars on cavity formation in the adjacent permanent first molar. *Caries Res*. 2005 Sep-Oct;39(5):342-9.
  34. Leroy R, Cecere S, Lesaffre E, Declerck D. Caries experience in primary molars and its impact on the variability in permanent tooth emergence sequences. *J Dent*. 2009 Nov;37(11):865-71.
  35. Proffit WR, Fields HW. *Ortodoncia contemporánea. Teoría y práctica*. Madrid, España: Harcourt; 2001.
  36. Mandel ID. Caries prevention: current strategies, new directions. *J Am Dent Assoc*. 1996 Oct;127(10):1477-88.
-

- 
37. Featherstone JD. The science and practice of caries prevention. *J Am Dent Assoc.* 2000 Jul;131(7):887-99.
  38. Jones S, Burt BA, Petersen PE, Lennon MA. The effective use of fluorides in public health. *Bull World Health Organ.* 2005 Sep;83(9):670-6.
  39. Arnold FA, Jr., Dean HT, Jay P, Knutson JW. Effect of fluoridated public water supplies on dental caries prevalence. 1956. *Bull World Health Organ.* 2006 Sep;84(9):761-4.
  40. Pakhomov GN, Ivanova K, Moller IJ, Vrabcheva M. Dental caries-reducing effects of a milk fluoridation project in Bulgaria. *J Public Health Dent.* 1995 Otoño;55(4):234-7.
  41. Meyer-Lueckel H, Satzinger T, Kielbassa AM. Caries prevalence among 6- to 16-year-old students in Jamaica 12 years after the Introduction of salt fluoridation. *Caries Res.* 2002 May-Jun;36(3):170-3.
  42. Norma Oficial Mexicana NOM-040-SSA1-1993, Bienes y servicios. Sal yodada y sal yodada fluorurada. Especificaciones sanitarias. Ciudad de México: Diario Oficial de la Federación, (Mar. 13, 1995).
  43. Longbottom C, Ekstrand K, Zero D, Kambara M. Novel preventive treatment options. *Monogr Oral Sci.* 2009;21:156-63.
  44. Einstein A. Zur Quantentheorie der Strahlung. *Physiol Z.* 1917;18:121-8.
  45. Schawlow AL, Townes CH. Infrared and Optical Masers *Phys Rev.* 1958;112:1940-9.
  46. Maiman TH. Stimulated optical radiation in ruby. *Nature.* 1960;187:493-4.
  47. Parker S. Verifiable CPD paper: introduction, history of lasers and laser light production. *Br Dent J.* 2007 Ene 13;202(1):21-31.
  48. Ryan RW, Spetzler RF, Preul MC. Aura of technology and the cutting edge: a history of lasers in neurosurgery. *Neurosurg Focus.* 2009 Sep;27(3):E6.
  49. Bessette FM, Nguyen LC. Laser light: its nature and its action on the eye. *CMAJ.* 1989 Dic 1;141(11):1141-8.
  50. Aoki A, Sasaki KM, Watanabe H, Ishikawa I. Lasers in nonsurgical periodontal therapy. *Periodontol 2000.* 2004;36:59-97.
  51. Welch AJ, Torres JH, Cheong WF. Laser physics and laser-tissue interaction. *Tex Heart Inst J.* 1989;16(3):141-9.
  52. Wu EC, Wong BJ. Lasers and optical technologies in facial plastic surgery. *Arch Facial Plast Surg.* 2008 Nov-Dic;10(6):381-90.
-

- 
53. Takac S, Stojanovic S, Muhi B. [Types of medical lasers]. *Med Pregl*. 1998 Mar-Apr;51(3-4):146-50.
  54. Mazer JM. [Indications for medical lasers in dermatology]. *Presse Med*. 2002 Feb 9;31(5):223-31.
  55. Goldman L, Hornby P, Meyer R, Goldman B. Impact of the laser on dental caries. *Nature*. 1964 Jul 25;203:417.
  56. Stern RH, Sognaes RF. Laser Beam Effect on Dental Hard Tissues. *J Dent Res*. 1964;43(5):873.
  57. Myers TD, Myers WD, Stone RM. First soft tissue study utilizing a pulsed Nd:YAG dental laser. *Northwest Dent*. 1989 Mar-Apr;68(2):14-7.
  58. Dederich DN, Bushick RD. Lasers in dentistry: separating science from hype. *J Am Dent Assoc*. 2004 Feb;135(2):204-12; quiz 29.
  59. Walsh LJ. The current status of laser applications in dentistry. *Aust Dent J*. 2003 Sep;48(3):146-55; quiz 98.
  60. Stern RH, Sognaes RF, Goodman F. Laser effect on *in vitro* enamel permeability and solubility. *J Am Dent Assoc*. 1966 Oct;73(4):838-43.
  61. Featherstone JD, Nelson DG. Laser effects on dental hard tissues. *Adv Dent Res*. 1987 Oct;1(1):21-6.
  62. Hicks MJ, Flaitz CM, Westerman GH, Berg JH, Blankenau RL, Powell GL. Caries-like lesion initiation and progression in sound enamel following argon laser irradiation: an *in vitro* study. *ASDC J Dent Child*. 1993 May-Jun;60(3):201-6.
  63. Goodman BD, Kaufman HW. Effects of an argon laser on the crystalline properties and rate of dissolution in acid of tooth enamel in the presence of sodium fluoride. *J Dent Res*. 1977 Oct;56(10):1201-7.
  64. Featherstone JD, Barrett-Vespone NA, Fried D, Kantorowitz Z, Seka W. CO<sub>2</sub> laser inhibitor of artificial caries-like lesion progression in dental enamel. *J Dent Res*. 1998 Jun;77(6):1397-403.
  65. Kantorowitz Z, Featherstone JD, Fried D. Caries prevention by CO<sub>2</sub> laser treatment: dependency on the number of pulses used. *J Am Dent Assoc*. 1998 May;129(5):585-91.
-

- 
66. Fried D, Featherstone JD, Le CQ, Fan K. Dissolution studies of bovine dental enamel surfaces modified by high-speed scanning ablation with a  $\lambda = 9.3$ -microm TEA CO<sub>2</sub> laser. *Lasers Surg Med.* 2006 Oct;38(9):837-45.
  67. Esteves-Oliveira M, Zezell DM, Meister J, Franzen R, Stanzel S, Lampert F et al. CO<sub>2</sub> Laser (10.6 microm) parameters for caries prevention in dental enamel. *Caries Res.* 2009;43(4):261-8.
  68. Chen CC, Huang ST. The effects of lasers and fluoride on the acid resistance of decalcified human enamel. *Photomed Laser Surg.* 2009 Jun;27(3):447-52.
  69. Tagomori S, Iwase T. Ultrastructural change of enamel exposed to a normal pulsed Nd:YAG laser. *Caries Res.* 1995;29(6):513-20.
  70. Castellan CS, Luiz AC, Bezinelli LM, Lopes RM, Mendes FM, De PEC et al. *In vitro* evaluation of enamel demineralization after Er:YAG and Nd:YAG laser irradiation on primary teeth. *Photomed Laser Surg.* 2007 Abr;25(2):85-90.
  71. Liu JF, Liu Y, Stephen HC. Optimal Er:YAG laser energy for preventing enamel demineralization. *J Dent.* 2006 Ene;34(1):62-6.
  72. Bevilacqua FM, Zezell DM, Magnani R, da Ana PA, Eduardo Cde P. Fluoride uptake and acid resistance of enamel irradiated with Er:YAG laser. *Lasers Med Sci.* 2008 Abr;23(2):141-7.
  73. Hicks J, Flaitz C, Ellis R, Westerman G, Powell L. Primary tooth enamel surface topography with *in vitro* argon laser irradiation alone and combined fluoride and argon laser treatment: scanning electron microscopic study. *Pediatr Dent.* 2003 Sep-Oct;25(5):491-6.
  74. Westerman GH, Hicks MJ, Flaitz CM, Ellis RW, Powell GL. Argon laser irradiation and fluoride treatment effects on caries-like enamel lesion formation in primary teeth: an *in vitro* study. *Am J Dent.* 2004 Ago;17(4):241-4.
  75. Apel C, Birker L, Meister J, Weiss C, Gutknecht N. The caries-preventive potential of subablative Er:YAG and Er:YSGG laser radiation in an intraoral model: a pilot study. *Photomed Laser Surg.* 2004 Ago;22(4):312-7.
  76. Featherstone JDB, Fried D, Duhn C. Surface dissolution kinetics of dental hard tissue irradiated over a fluence range of 1-8 J/cm<sup>2</sup>. *Proc SPIE.* 1998;3248:146-51.
  77. Hsu CY, Jordan TH, Dederich DN, Wefel JS. Effects of low-energy CO<sub>2</sub> laser irradiation and the organic matrix on inhibition of enamel demineralization. *J Dent Res.* 2000 Sep;79(9):1725-30.
-



- 
78. Ying D, Chuah GK, Hsu CY. Effect of Er:YAG laser and organic matrix on porosity changes in human enamel. *J Dent.* 2004 Ene;32(1):41-6.
  79. Fowler BO, Kuroda S. Changes in heated and in laser-irradiated human tooth enamel and their probable effects on solubility. *Calcif Tissue Int.* 1986 Abr;38(4):197-208.
  80. Ishikawa I, Aoki A, Takasaki AA. Potential applications of Erbium:YAG laser in periodontics. *J Periodontal Res.* 2004 Ago;39(4):275-85.
  81. Mehl A, Folwaczny M, Haffner C, Hickel R. Bactericidal effects of 2.94 microns Er:YAG-laser radiation in dental root canals. *J Endod.* 1999 Jul;25(7):490-3.
  82. Oho T, Morioka T. A possible mechanism of acquired acid resistance of human dental enamel by laser irradiation. *Caries Res.* 1990;24(2):86-92.
  83. Wigdor HA, Walsh JT, Jr., Featherstone JD, Visuri SR, Fried D, Waldvogel JL. Lasers in dentistry. *Lasers Surg Med.* 1995;16(2):103-33.
  84. Aoki A, Ishikawa I, Yamada T, Otsuki M, Watanabe H, Tagami J et al. Comparison between Er:YAG laser and conventional technique for root caries treatment *in vitro*. *J Dent Res.* 1998 Jun;77(6):1404-14.
  85. Cozean C, Arcoria CJ, Pelagalli J, Powell GL. Dentistry for the 21st century? Erbium:YAG laser for teeth. *J Am Dent Assoc.* 1997 Ago;128(8):1080-7.
  86. Hibst R, Keller U. Experimental studies of the application of the Er:YAG laser on dental hard substances: I. Measurement of the ablation rate. *Lasers Surg Med.* 1989;9(4):338-44.
  87. Keller U, Hibst R. Experimental studies of the application of the Er:YAG laser on dental hard substances: II. Light microscopic and SEM investigations. *Lasers Surg Med.* 1989;9(4):345-51.
  88. Kim JH, Kwon OW, Kim HI, Kwon YH. Acid resistance of erbium-doped yttrium aluminum garnet laser-treated and phosphoric acid-etched enamels. *Angle Orthod.* 2006 Nov;76(6):1052-6.
  89. Kwon YH, Lee JS, Choi YH, Lee JM, Song KB. Change of enamel after Er:YAG and CO<sub>2</sub> laser irradiation and fluoride treatment. *Photomed Laser Surg.* 2005 Ago;23(4):389-94.
  90. Correa AM, Ciconne-Nogueira JC, Pecora JD, Palma-Dibb RG. Influence of the irradiation distance and the use of cooling to increase enamel-acid resistance with Er:YAG laser. *J Dent.* 2010 Mar 25;38:534-40.
-

- 
91. Cecchini RC, Zezell DM, de Oliveira E, de Freitas PM, Eduardo Cde P. Effect of Er:YAG laser on enamel acid resistance: morphological and atomic spectrometry analysis. *Lasers Surg Med.* 2005 Dic;37(5):366-72.
  92. Kameyama A, Koga H, Takizawa M, Takaesu Y, Hirai Y. Effect of Er:YAG laser irradiation on acid resistance to bovine dentin *in vitro*. *Bull Tokyo Dent Coll.* 2000 May;41(2):43-8.
  93. Rodriguez-Vilchis LE, Contreras-Bulnes R, Sanchez-Flores I, Samano EC. Acid resistance and structural changes of human dental enamel treated with Er:YAG laser. *Photomed Laser Surg.* 2010 Abr;28(2):207-11.
  94. Apel C, Meister J, Gotz H, Duschner H, Gutknecht N. Structural changes in human dental enamel after subablative erbium laser irradiation and its potential use for caries prevention. *Caries Res.* 2005 Ene-Feb;39(1):65-70.
  95. Hossain M, Nakamura Y, Kimura Y, Yamada Y, Ito M, Matsumoto K. Caries-preventive effect of Er:YAG laser irradiation with or without water mist. *J Clin Laser Med Surg.* 2000 Abr;18(2):61-5.
  96. Kohara EK, Hossain M, Kimura Y, Matsumoto K, Inoue M, Sasa R. Morphological and microleakage studies of the cavities prepared by Er:YAG laser irradiation in primary teeth. *J Clin Laser Med Surg.* 2002 Jun;20(3):141-7.
  97. Borsatto MC, Corona SA, Ramos RP, Liporaci JL, Pecora JD, Palma-Dibb RG. Microleakage at sealant/enamel interface of primary teeth: effect of Er:YAG laser ablation of pits and fissures. *J Dent Child (Chic).* 2004 May-Ago;71(2):143-7.
  98. Wanderley RL, Monghini EM, Pecora JD, Palma-Dibb RG, Borsatto MC. Shear bond strength to enamel of primary teeth irradiated with varying Er:YAG laser energies and SEM examination of the surface morphology: an *in vitro* study. *Photomed Laser Surg.* 2005 Jun;23(3):260-7.
  99. Borsatto MC, Corona SA, Chinelatti MA, Ramos RP, de Sa Rocha RA, Pecora JD et al. Comparison of marginal microleakage of flowable composite restorations in primary molars prepared by high-speed carbide bur, Er:YAG laser, and air abrasion. *J Dent Child (Chic).* 2006 May-Ago;73(2):122-6.
  100. Kornblit R, Bossu M, Mari D, Rocca JP, Polimeni A. Enamel and dentine of deciduous teeth Er:YAG laser prepared. A SEM study. *Eur J Paediatr Dent.* 2009 Jun;10(2):75-82.
-

- 
101. Zhang S, Chen T, Ge LH. Scanning electron microscopy study of cavity preparation in deciduous teeth using the Er:YAG laser with different powers. *Lasers Med Sci.* 2012 Ene;27(1):141-4.
  102. Keller U, Hibst R, Geurtsen W, Schilke R, Heidemann D, Klaiber B et al. Erbium:YAG laser application in caries therapy. Evaluation of patient perception and acceptance. *J Dent.* 1998 Nov;26(8):649-56.
  103. Krause F, Braun A, Lotz G, Kneist S, Jepsen S, Eberhard J. Evaluation of selective caries removal in deciduous teeth by a fluorescence feedback-controlled Er:YAG laser *in vivo*. *Clin Oral Investig.* 2008 Sep;12(3):209-15.
  104. Genovese MD, Olivi G. Laser in paediatric dentistry: patient acceptance of hard and soft tissue therapy. *Eur J Paediatr Dent.* 2008 Mar;9(1):13-7.
  105. Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-013-SSA2-1994, Para la prevención y control de enfermedades bucales. Ciudad de México: Diario Oficial de la Federación, (Ene. 6, 1995).
  106. AMM. Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial. Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. Fortaleza, Brasil: Asociación Médica Mundial; 2013.
  107. Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación en Salud. Ciudad de México: Diario Oficial de la Federación, (Ene. 6, 1987).
  108. Kodaka T, Nakajima F, Higashi S. Structure of the so-called 'prismless' enamel in human deciduous teeth. *Caries Res.* 1989;23(5):290-6.
  109. Fava M, Watanabe I-S, Fava-de-Moraes F, Costa LRdRSd. Prismless enamel in human non-erupted deciduous molar teeth: a scanning electron microscopic study. *Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo.* 1997;11:239-243.
  110. Neves Ade A, Castro Rde A, Coutinho ET, Primo LG. Microstructural analysis of demineralized primary enamel after *in vitro* toothbrushing. *Pesqui Odontol Bras.* 2002 Abr-Jun;16(2):137-43.
  111. De Menezes Oliveira MA, Torres CP, Gomes-Silva JM, Chinelatti MA, De Menezes FC, Palma-Dibb RG et al. Microstructure and mineral composition of dental enamel of permanent and deciduous teeth. *Microsc Res Tech.* 2010 May;73(5):572-7.
-

- 
112. Mahoney EK, Rohanizadeh R, Ismail FS, Kilpatrick NM, Swain MV. Mechanical properties and microstructure of hypomineralised enamel of permanent teeth. *Biomaterials*. 2004 Sep;25(20):5091-100.
  113. Zilberman U, Zilberman S, Keinan D, Elyiahu M. Enamel development in primary molars from children with familial dysautonomia. *Arch Oral Biol*. 2010 Nov;55(11):907-12.
  114. Shore RC, Backman B, Elcock C, Brook AH, Brookes SJ, Kirkham J. The structure and composition of deciduous enamel affected by local hypoplastic autosomal dominant amelogenesis imperfecta resulting from an ENAM mutation. *Cells Tissues Organs*. 2010;191(4):301-6.
  115. Keinan D, Smith P, Zilberman U. Microstructure and chemical composition of primary teeth in children with Down syndrome and cerebral palsy. *Arch Oral Biol*. 2006 Oct;51(10):836-43.
  116. Leventouri T, Antonakos A, Kyriacou A, Venturelli R, Liarokapis E, Perdikatsis V. Crystal structure studies of human dental apatite as a function of age. *Int J Biomater*. 2009;698547.
  117. Pleshko N, Boskey A, Mendelsohn R. Novel infrared spectroscopic method for the determination of crystallinity of hydroxyapatite minerals. *Biophys J*. 1991 Oct;60(4):786-93.
  118. Chang MC, Tanaka J. FT-IR study for hydroxyapatite/collagen nanocomposite cross-linked by glutaraldehyde. *Biomaterials*. 2002 Dic;23(24):4811-8.
  119. SØnju Clasen AB, Ruyter IE. Quantitative determination of type A and type B carbonate in human deciduous and permanent enamel by means of Fourier transform infrared spectrometry. *Adv Dent Res*. 1997 Nov;11(4):523-7.
  120. Segvich SJ, Smith HC, Kohn DH. The adsorption of preferential binding peptides to apatite-based materials. *Biomaterials*. 2009 Mar;30(7):1287-98.
  121. Markovic M, Fowler BO, Tung MS. Preparation and comprehensive characterization of a calcium hydroxyapatite reference material. *J Res Natl Inst Stand Technol*. 2004 Nov-Dic;109(6):553-68.
  122. Rey C, Collins B, Goehl T, Dickson IR, Glimcher MJ. The carbonate environment in bone mineral: a resolution-enhanced Fourier Transform Infrared Spectroscopy Study. *Calcif Tissue Int*. 1989 Sep;45(3):157-64.
  123. Polyanichko AM, Wieser H. Vibrational circular dichroism and its applications to protein studies. En: Uversky VN, Permyakov EA, editores. *Methods in protein structure and stability analysis: vibrational spectroscopy*. New York: Nova Publishers; 2007. p. 267-302.
-

- 
124. Boskey AL, Mendelsohn R. Infrared spectroscopic characterization of mineralized tissues. *Vib Spectrosc.* 2005 Jul 29;38(1-2):107-14.
  125. Saxton CA. The effects of dentifrices on the appearance of the tooth surface observed with the scanning electron microscope. *J Periodontal Res.* 1976 Abr;11(2):74-85.
  126. Weatherell JA, Robinson C, Hallsworth AS. Variations in the chemical composition of human enamel. *J Dent Res.* 1974 Mar-Abr;53(2):180-92.
  127. Lussi A, Jaeggi T, Zero D. The role of diet in the aetiology of dental erosion. *Caries Res.* 2004;38 Suppl 1:34-44.
  128. Rios D, Honorio HM, Magalhaes AC, Silva SM, Delbem AC, Machado MA et al. Scanning electron microscopic study of the *in situ* effect of salivary stimulation on erosion and abrasion in human and bovine enamel. *Braz Oral Res.* 2008 Abr-Jun;22(2):132-8.
  129. Apel C, Meister J, Ioana RS, Franzen R, Hering P, Gutknecht N. The ablation threshold of Er:YAG and Er:YSGG laser radiation in dental enamel. *Lasers Med Sci.* 2002;17(4):246-52.
  130. Visuri SR, Walsh JT, Jr., Wigdor HA. Erbium laser ablation of dental hard tissue: effect of water cooling. *Lasers Surg Med.* 1996;18(3):294-300.
  131. Correa-Afonso AM, Ciconne-Nogueira JC, Pecora JD, Palma-Dibb RG. Influence of the irradiation distance and the use of cooling to increase enamel-acid resistance with Er:YAG laser. *J Dent.* 2010; 38:534-540.
  132. Anaraki SN, Serajzadeh M, Fekrazad R. Effects of laser-assisted fluoride therapy with a CO<sub>2</sub> laser and Er, Cr:YSGG laser on enamel demineralization. *Pediatr Dent.* 2012 Jul-Aug;34(4):e92-6.
  133. Hayacibara MF, Paes Leme AF, Lima YB, Goncalves NC, Queiroz CS, Gomes MJ et al. Alkali-soluble fluoride deposition on enamel after professional application of topical fluoride in vitro. *J Appl Oral Sci.* 2004 Mar;12(1):18-21.
  134. Ripa LW. The histology of the early carious lesion in primary teeth with special reference to a "prismless" outer layer of primary enamel. *J Dent Res.* 1966 Ene-Feb;45(1):5-11.
  135. Ota-Tsuzuki C, Martins FL, Giorgetti AP, de Freitas PM, Duarte PM. *In vitro* adhesion of *Streptococcus sanguinis* to dentine root surface after treatment with Er:YAG laser, ultrasonic system, or manual curette. *Photomed Laser Surg.* 2009 Oct;27(5):735-41.
  136. Liu Y, Hsu CY. Laser-induced compositional changes on enamel: a FT-Raman study. *J Dent.* 2007 Mar;35(3):226-30.
-

- 
137. Ibrahim DM, Mostafa AA, Korowash SI. Chemical characterization of some substituted hydroxyapatites. *Chem Cent J*. 2011;5(1):74.
  138. Dorozhkin SV. A review on the dissolution models of calcium apatites. *Prog Cryst Growth Ch*. 2002;44(1):45-61.
  139. Tenuta LM, Cerezetti RV, Del Bel Cury AA, Tabchoury CP, Cury JA. Fluoride release from  $\text{CaF}_2$  and enamel demineralization. *J Dent Res*. 2008 Nov;87(11):1032-6.
-

---

# **Anexos**

---

## 11. Anexos

### 11.1. Anexo 1. Formato de asentimiento informado del paciente menor de edad para la donación de órganos dentarios.



Universidad Autónoma del Estado de México  
Facultad de Odontología

Folio:

Doctorado en Ciencias de la Salud

## ASENTIMIENTO INFORMADO DEL PACIENTE MENOR DE EDAD PARA LA DONACIÓN DE ÓRGANOS DENTARIOS

Nombre(s) del paciente

Apellido paterno

Apellido materno

en forma voluntaria y sin alguna presión asiento en donar # \_\_\_\_\_ órgano(s) dentario(s).

Estoy de acuerdo en que estas muestras sean utilizadas en algún proyecto de investigación del Doctorado en Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma del Estado de México, y sé que con esto estaré contribuyendo en la búsqueda de nuevos métodos para prevenir la caries dental.

Declaro que no he recibido dinero por la donación que hago y sé que las muestras no serán vendidas o distribuidas con fines comerciales.

Se me ha hecho saber que todos mis datos personales serán guardados en secreto y confidencialidad.

He sido informado(a) acerca del proyecto de investigación vigente en el que podrían ser incluidos los dientes que dono, entiendo claramente toda la información de este documento y me han sido aclaradas todas las dudas que tenía sobre mi participación.

Además mi padre/madre \_\_\_\_\_

Nombre(s) del padre o tutor

Apellido paterno

Apellido materno

conoce las condiciones de la presente donación y cuento con su consentimiento informado por escrito.

Fecha de nacimiento del paciente: \_\_\_\_\_

Género:  masculino  femenino



**11.2. Anexo 2. Formato de consentimiento informado del padre o tutor del paciente menor de edad para la donación de órganos dentarios.**



Universidad Autónoma del Estado de México  
Facultad de Odontología

Folio:

Doctorado en Ciencias de la Salud

**CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PADRE O TUTOR  
DEL PACIENTE MENOR DE EDAD  
PARA LA DONACIÓN DE ÓRGANOS DENTARIOS**

Nombre(s) del padre o tutor

Apellido paterno

Apellido materno

como representante legal de \_\_\_\_\_, en

Nombre(s) del paciente

Apellido paterno

Apellido materno

forma voluntaria y sin alguna presión consiento que él (ella) done # \_\_\_\_\_ órgano(s) dentario(s).

Autorizo que las muestras donadas sean utilizadas en algún proyecto de investigación del programa de Doctorado en Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma del Estado de México, contribuyendo con esto en la búsqueda de nuevas alternativas para la prevención de la caries dental.

Declaro que no he percibido alguna retribución económica debido a la donación y es de mi conocimiento que las muestras no serán vendidas o distribuidas con fines de lucro. Se me ha hecho saber que mi identidad y la del paciente menor de edad al que represento serán guardadas en estricta confidencialidad. Además, he sido informado(a) acerca del proyecto de investigación vigente en el podrían ser incluidas las muestras donadas, he comprendido toda la información del presente documento y me han sido aclaradas todas las dudas acerca de éste.

Ciudad:

Fecha:

\_\_\_\_\_  
Firma del padre o tutor

**Testigos:**

Relación con el paciente: \_\_\_\_\_

Relación con el paciente: \_\_\_\_\_

Nombre: \_\_\_\_\_

Nombre: \_\_\_\_\_

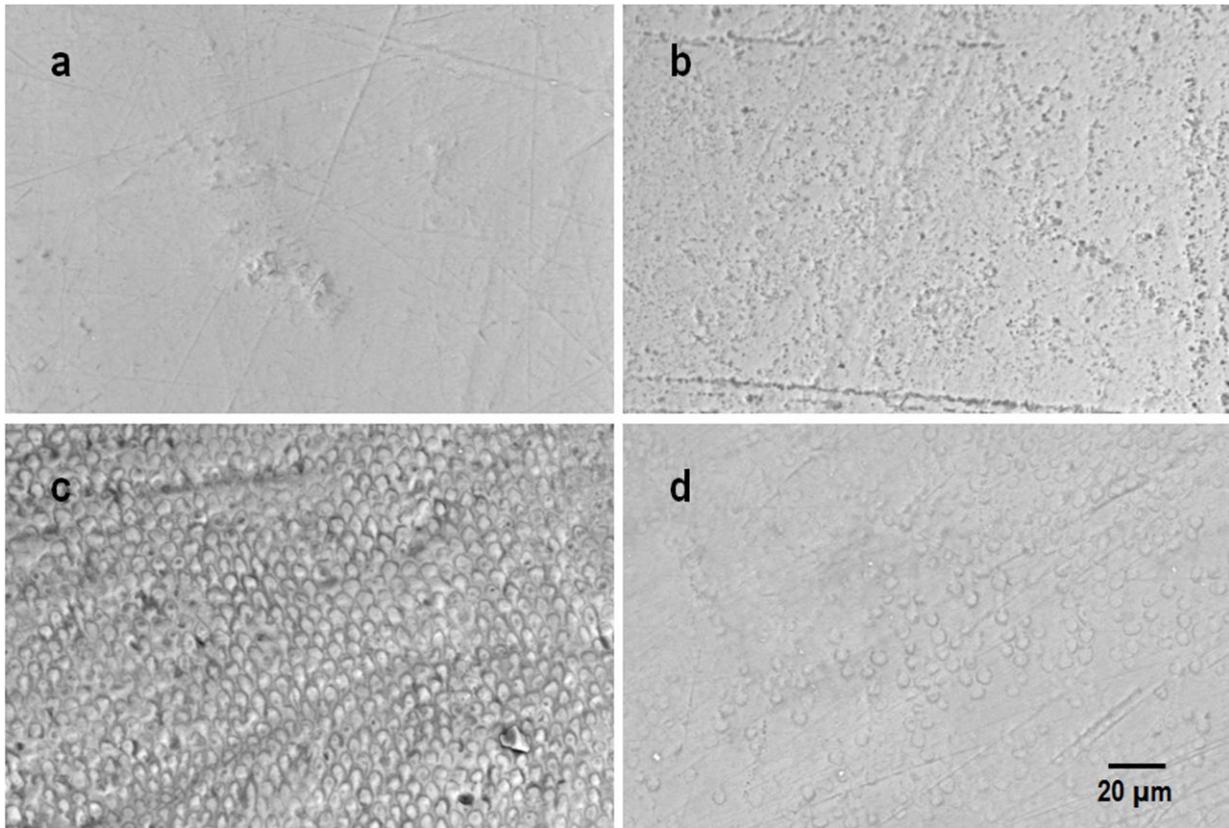
Dirección: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

Firma: \_\_\_\_\_

Firma: \_\_\_\_\_

**11.3. Anexo 3. Figura 2. Patrones morfológicos de la superficie del esmalte de los dientes deciduos: a) principalmente liso con algunos surcos; b) abundantes microporosidades; c) prismas expuestos en “ojo de cerradura” y d) prismas expuestos con formas circulares irregulares.**



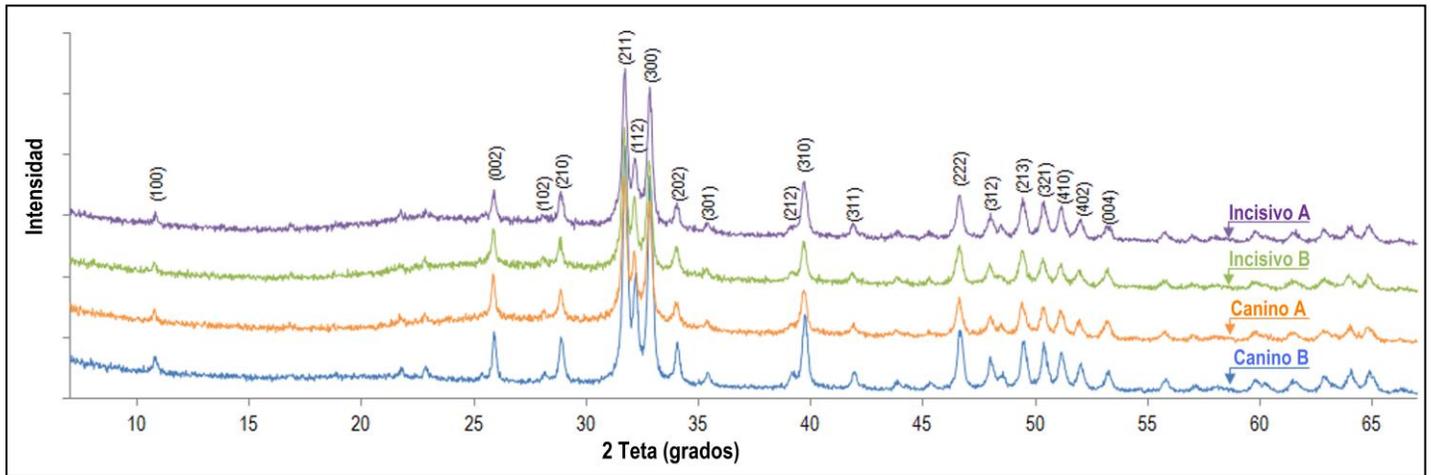
**11.4. Anexo 4. Tabla 7. Medias y desviaciones estándar de los porcentajes atómicos de los elementos y las relaciones molares Ca/P de la superficie del esmalte deciduo analizada mediante EDS.**

	%at de C	%at de O	%at de P	%at de Ca	%at de Elementos traza <sup>a</sup>	relación molar Ca/P
Incisivos (n=15)	19.40±7.51	55.58±7.06	10.20±0.97	14.09±1.81	0.73±0.20	1.38±0.13
Caninos (n=15)	15.18±6.06	58.77±6.44	10.72±1.06	14.68±2.12	0.65±0.13	1.36±0.08
valor P*	0.081	0.250	0.305	0.461	0.174	0.902
Total (n=30)	17.29±7.04	57.18±6.83	10.46±1.03	14.38±1.96	0.69±0.17	1.37±0.11

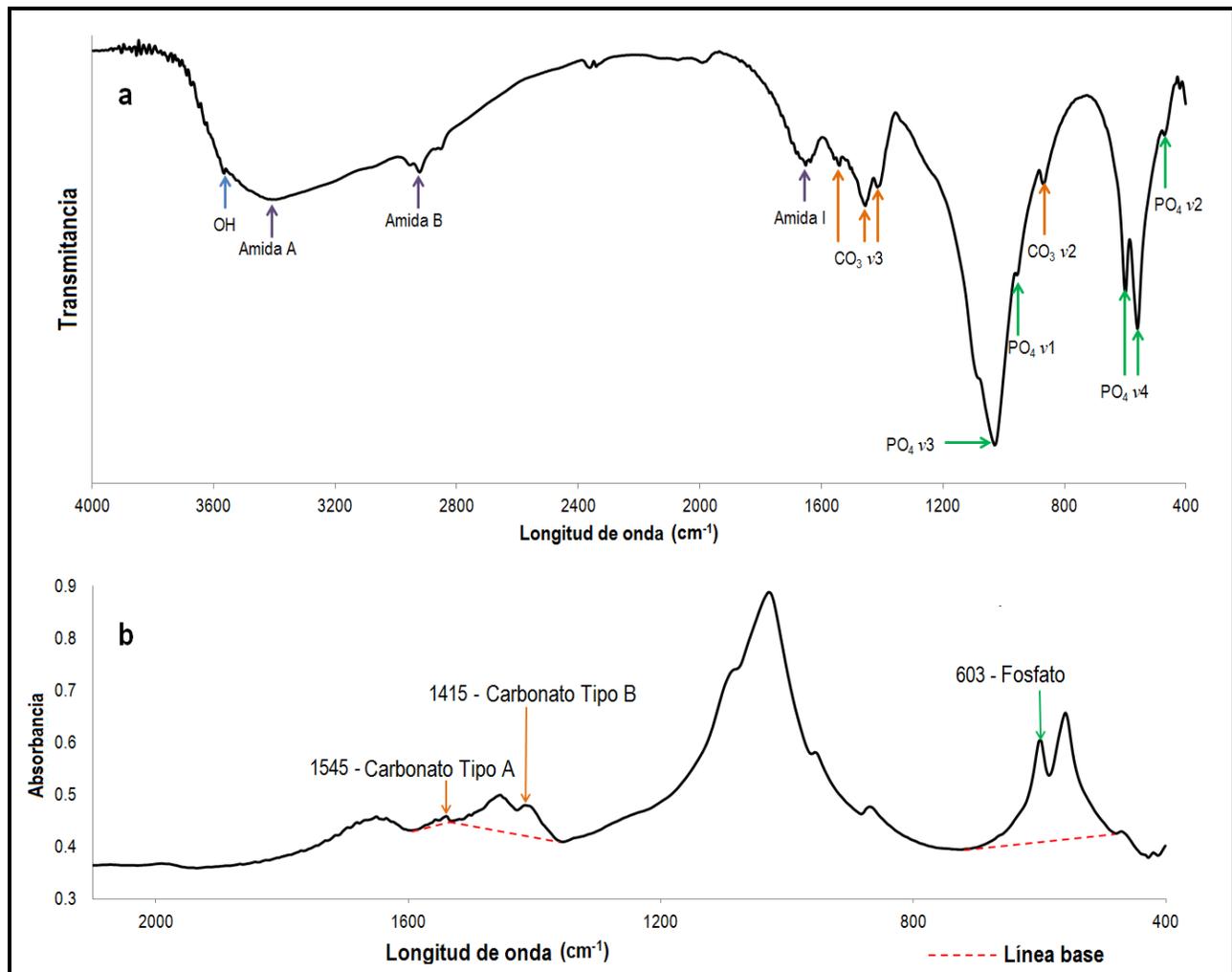
<sup>a</sup> %at menor a 1.0 (Cl + Na + Mg).

\* Test *U* de Mann-Whitney ( $\alpha=0.05$ )

**11.5. Anexo 5. Figura 3. Difractogramas de rayos X del polvo de esmalte de los dientes deciduos incisivos y caninos.**



11.6. Anexo 6. Figura 4. Espectros infrarrojo del esmalte de incisivo decíduo: a) espectro de escaneo amplio y b) espectro de escaneo estrecho.



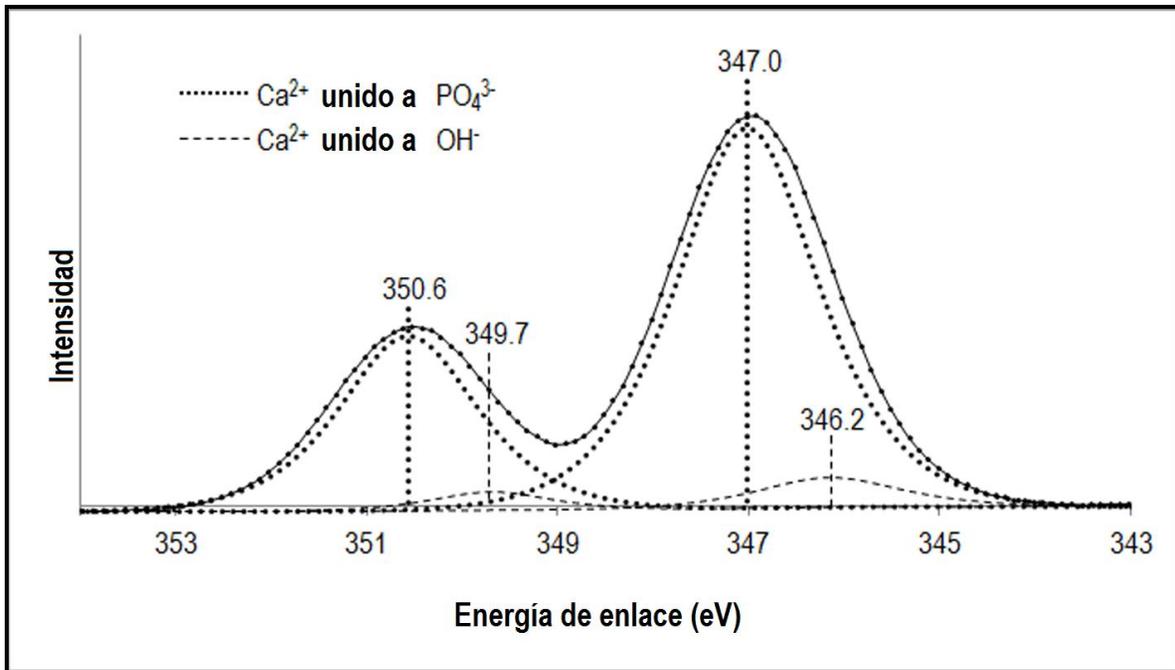
---

**11.7. Anexo 7. Tabla 8. Medias de los porcentajes atómicos de los elementos y de la relación molar Ca/P de la superficie del esmalte temporal analizada mediante XPS.**

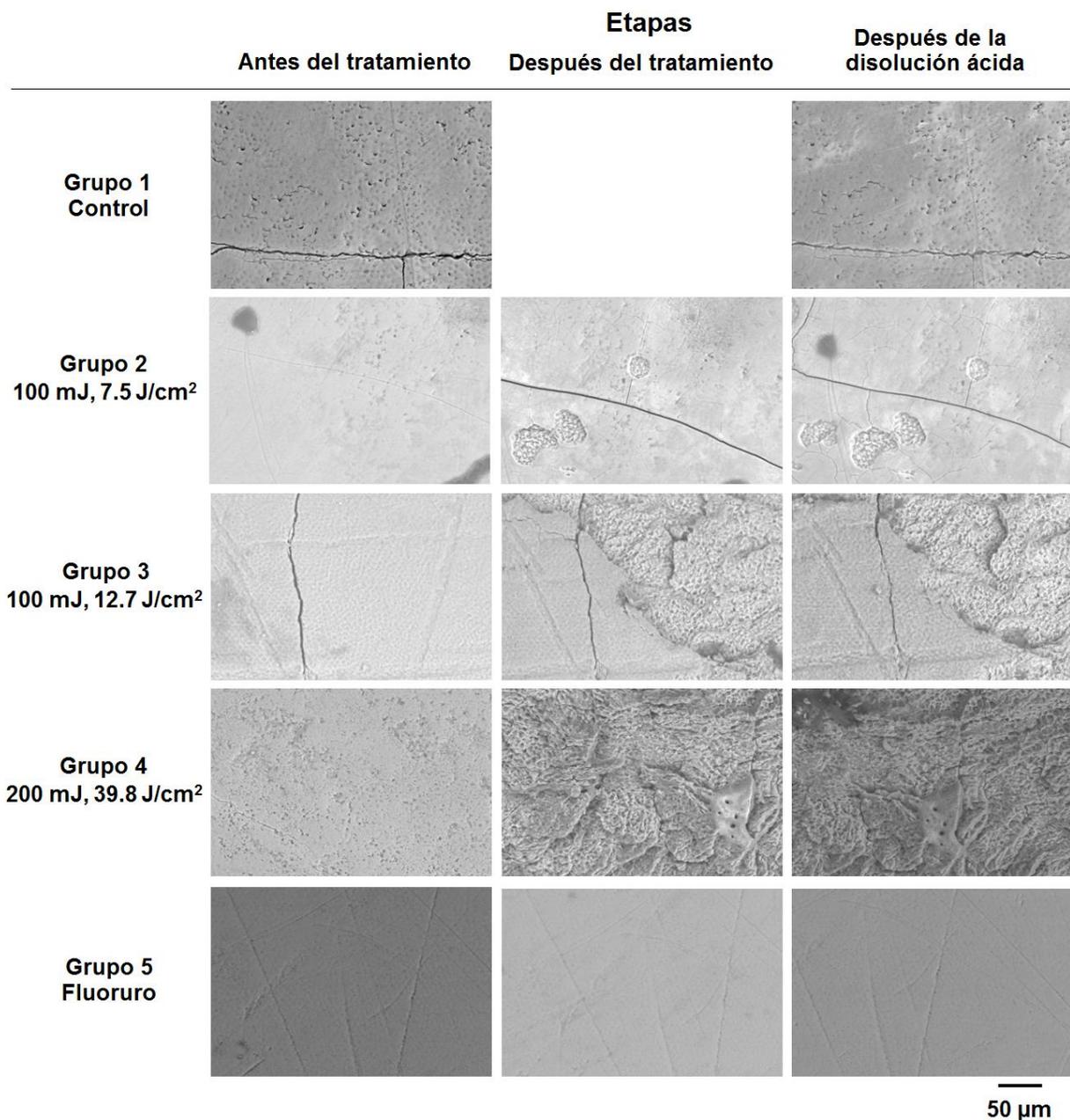
<b>C 1s</b>	<b>O 1s</b>	<b>P 2p3/2</b>	<b>Ca 2p3/2</b>	<b>N 1s</b>	<b>relación molar</b>
<b>%at</b>	<b>%at</b>	<b>%at</b>	<b>%at</b>	<b>%at</b>	<b>Ca/P</b>
54.54	24.66	8.28	8.79	3.73	1.03

---

11.8. Anexo 8. Figura 5. Deconvolución del espectro XPS del calcio de la superficie del esmalte.



**11.9. Anexo 9. Figura 6. Micrografías SEM representativas de las superficies del esmalte de los grupos control, irradiados y con fluoruro. Antes del tratamiento, los dientes mostraron superficies lisas o microporosidades, así como algunos defectos. Después del tratamiento, se observaron signos de daño en el esmalte irradiado, incluyendo cráteres, prismas completamente expuestos, fracturas y fusión. No se observaron cambios morfológicos con la aplicación de fluoruro ni después de la disolución ácida. Magnificación original = 400x.**





**11.10. Anexo 10. Tabla 9. Porcentajes atómicos (%at) de C, O, F y elementos traza de la superficie del esmalte de los dientes temporales, analizada antes del tratamiento, después del tratamiento y después de la disolución ácida mediante EDS (media  $\pm$  desviación estándar).**

%at Elemento Químico	Etapa	Grupos																
		G1		G2		G3		G4		G5		G6		G7		G8		
C	BT	15.76 $\pm$ 7.71	A a	18.34 $\pm$ 8.42	A a	16.45 $\pm$ 8.96	A a	16.70 $\pm$ 3.87	A a	15.57 $\pm$ 7.40	A a	17.70 $\pm$ 7.77	A a	16.66 $\pm$ 4.54	A a	13.48 $\pm$ 5.98	A a	*
	AT	15.76 $\pm$ 7.71	A,B,C a	13.71 $\pm$ 3.32	A,B,C a	9.41 $\pm$ 3.03	A,B b	1.57 $\pm$ 2.12	D b	23.24 $\pm$ 8.37	C b	17.79 $\pm$ 6.97	A,C a	13.56 $\pm$ 4.13	A,B,C a	1.33 $\pm$ 1.89	D b	**
	AAD	15.53 $\pm$ 5.97	A,B a	16.86 $\pm$ 6.61	A,B a	17.60 $\pm$ 7.45	A,B a	5.91 $\pm$ 1.46	C c	20.85 $\pm$ 7.93	A,B a,b	21.66 $\pm$ 5.91	A a	12.88 $\pm$ 4.31	B a	0.39 $\pm$ 0.80	D b	**
O	BT	58.09 $\pm$ 6.82	A,B a	54.77 $\pm$ 6.62	A a	56.63 $\pm$ 5.90	A,B a	60.93 $\pm$ 5.33	A,B a	59.41 $\pm$ 6.10	A,B a	55.31 $\pm$ 6.00	A a	63.92 $\pm$ 0.89	B a	63.50 $\pm$ 1.09	A,B a	**
	AT	58.09 $\pm$ 6.82	A,B,C a	62.16 $\pm$ 3.53	A,B b	60.96 $\pm$ 2.44	A,B a	65.72 $\pm$ 3.96	B a	48.84 $\pm$ 5.58	C,D b	47.09 $\pm$ 4.39	D b	42.98 $\pm$ 5.56	D b	59.00 $\pm$ 1.87	A b	**
	AAD	59.13 $\pm$ 5.62	A,B,C a	58.44 $\pm$ 4.57	A,B a,b	57.07 $\pm$ 5.19	A,B a	65.34 $\pm$ 2.18	C a	56.25 $\pm$ 6.31	A,B a	54.28 $\pm$ 3.38	A a	59.85 $\pm$ 3.99	A,B,C c	60.95 $\pm$ 0.27	B c	**
F	BT	0.00	A a	0.00	A a	0.00	A a	0.00	A a	0.00	A a	0.00	A a	0.00	A a	0.00	A a	
	AT	0.00	A a	0.00	A a	0.00	A a	0.00	A a	2.45 $\pm$ 1.42	B b	6.82 $\pm$ 3.74	B b	17.69 $\pm$ 6.62	C b	3.36 $\pm$ 2.86	A,B b	**
	AAD	0.00	A a	0.00	A a	0.00	A a	0.00	A a	0.00	A a	0.00	A a	0.00	A a	0.00	A a	
Elementos traza	BT	0.67 $\pm$ 0.10	A a	0.67 $\pm$ 0.10	A a	0.67 $\pm$ 0.11	A a	0.57 $\pm$ 0.14	A,B a	0.64 $\pm$ 0.16	A,B a	0.59 $\pm$ 0.12	A,B a	0.46 $\pm$ 0.16	B,C a	0.33 $\pm$ 0.16	C a	*
	AT	0.67 $\pm$ 0.10	A a	0.63 $\pm$ 0.12	A a	0.84 $\pm$ 0.15	A,B b	0.84 $\pm$ 0.15	A,B b	0.69 $\pm$ 0.11	A a	0.76 $\pm$ 0.12	A,B b	0.96 $\pm$ 0.19	B b	0.53 $\pm$ 0.30	A a	**
	AAD	0.70 $\pm$ 0.12	A a	0.65 $\pm$ 0.08	A,B a	0.71 $\pm$ 0.15	A a,b	0.64 $\pm$ 0.15	A,B a	0.62 $\pm$ 0.13	A,B a	0.63 $\pm$ 0.16	A,B a	0.71 $\pm$ 0.06	A c	0.45 $\pm$ 0.30	B a	*

Las letras mayúsculas en una fila son para la comparación por elemento químico de diferentes grupos en la misma etapa. Letras mayúsculas iguales están después de las medias que no difieren estadísticamente.

\*Test de Bonferroni,  $p < 0.05$ ; \*\*Test T2 de Tamhane,  $p < 0.05$ .

Las letras minúsculas en una columna son para la comparación por elemento químico de diferentes etapas en el mismo grupo. Letras minúsculas iguales están después de las medias que no difieren estadísticamente (análisis de varianza de medidas repetidas [ANOVA],  $p < 0.05$ ).

EDS, espectroscopía de rayos X por dispersión de energía; BT, antes del tratamiento; AT, después del tratamiento; AAD, después de la disolución ácida.

**11.11. Anexo 11. Tabla 10. Porcentajes atómicos (%at) de Ca, P y relación molar Ca/P de la superficie del esmalte de los dientes temporales, analizada antes del tratamiento, después del tratamiento y después de la disolución ácida mediante EDS (media  $\pm$  desviación estándar).**

%at Elemento Químico	Etapa	Grupos									
		G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8		
Ca	BT	15.25 $\pm$ 2.71 A,B a	15.66 $\pm$ 2.53 A,B a	15.62 $\pm$ 2.86 A,B a,b	12.93 $\pm$ 3.28 A,B a	14.55 $\pm$ 2.63 A,B a	15.99 $\pm$ 2.26 A a	11.29 $\pm$ 3.44 B a	13.48 $\pm$ 4.38 A,B a	*	
	AT	15.25 $\pm$ 2.71 A a	14.08 $\pm$ 2.14 A a,b	17.30 $\pm$ 1.43 A,B a	19.94 $\pm$ 2.58 B,C b	15.04 $\pm$ 2.49 A a	17.10 $\pm$ 2.98 A,B a	15.59 $\pm$ 2.58 A b	22.38 $\pm$ 1.99 C b	*	
	AAD	14.40 $\pm$ 2.01 A a	14.07 $\pm$ 2.71 A,B b	14.68 $\pm$ 2.57 A,B b	17.51 $\pm$ 1.41 B b	13.03 $\pm$ 1.89 A a	13.96 $\pm$ 3.54 A,B a	16.12 $\pm$ 2.70 A,B b	23.61 $\pm$ 0.92 C b	**	
P	BT	10.23 $\pm$ 1.39 A,B a	10.56 $\pm$ 1.35 A a	10.63 $\pm$ 1.48 A a,b	8.87 $\pm$ 1.91 A,B a	9.83 $\pm$ 1.66 A,B a	10.41 $\pm$ 1.23 A,B a	7.67 $\pm$ 1.98 B a	9.21 $\pm$ 2.65 A,B a	**	
	AT	10.23 $\pm$ 1.39 A,B,C a	9.42 $\pm$ 1.49 A a	11.50 $\pm$ 0.97 B,C a	11.94 $\pm$ 1.50 C,D b	9.74 $\pm$ 1.41 A,B a	10.44 $\pm$ 1.13 A,B,C a	9.23 $\pm$ 0.98 A a	13.41 $\pm$ 1.20 D b	*	
	AAD	10.26 $\pm$ 1.03 A a	9.98 $\pm$ 1.45 A a	9.94 $\pm$ 1.37 A b	10.60 $\pm$ 0.64 A a,b	9.24 $\pm$ 1.37 A a	9.47 $\pm$ 1.55 A a	10.45 $\pm$ 0.98 A b	14.61 $\pm$ 0.61 B b	*	
relación molar Ca/P	BT	1.49 $\pm$ 0.11 A a	1.48 $\pm$ 0.09 A a	1.46 $\pm$ 0.10 A a	1.45 $\pm$ 0.09 A a	1.48 $\pm$ 0.09 A a,b	1.53 $\pm$ 0.10 A a	1.46 $\pm$ 0.18 A a	1.45 $\pm$ 0.11 A a	*	
	AT	1.49 $\pm$ 0.11 A a	1.50 $\pm$ 0.14 A,B a	1.51 $\pm$ 0.06 A,B a	1.67 $\pm$ 0.08 B,C b	1.54 $\pm$ 0.10 A,B,C a	1.63 $\pm$ 0.17 A,B,C a	1.69 $\pm$ 0.18 C b	1.67 $\pm$ 0.09 B,C b	*	
	AAD	1.40 $\pm$ 0.09 A b	1.40 $\pm$ 0.11 A a	1.47 $\pm$ 0.10 A,B a	1.65 $\pm$ 0.08 C b	1.41 $\pm$ 0.06 A b	1.45 $\pm$ 0.16 A a	1.54 $\pm$ 0.14 A,B,C c	1.62 $\pm$ 0.11 B,C b	*	

Las letras mayúsculas en una fila son para la comparación por elemento químico de diferentes grupos en la misma etapa. Letras mayúsculas iguales están después de las medias que no difieren estadísticamente.

\*Test de Bonferroni,  $p < 0.05$ ; \*\*Test T2 de Tamhane,  $p < 0.05$ .

Las letras minúsculas en una columna son para la comparación por elemento químico de diferentes etapas en el mismo grupo. Letras minúsculas iguales están después de las medias que no difieren estadísticamente (análisis de varianza de medidas repetidas [ANOVA],  $p < 0.05$ ).

EDS, espectroscopía de rayos X por dispersión de energía; BT, antes del tratamiento; AT, después del tratamiento; AAD, después de la disolución ácida.