

ESTUDIO DE LA MICROESTRUCTURA DEL ESMALTE DENTAL HUMANO EN RELACIÓN CON LA MICRODUREZA Y LA COMPOSICIÓN QUÍMICA

STUDY OF THE MICROSTRUCTURE OF HUMAN TOOTH ENAMEL IN RELATION TO MICROHARDNESS AND CHEMICAL COMPOSITION

Graciela DURSO, Andrea TANEVITCH, Adrián ABAL, Gabriela LLOMPART, Patricia PEREZ, Pablo FELIPE

Cátedra de Histología y Embriología, Facultad de Odontología, Universidad Nacional de La Plata. Av. 1 y 50, La Plata (1900), Argentina

RESUMEN

Se compararon la microdureza y la composición química del esmalte radial y con bandas de Hunter-Schreger (BHS) en dientes humanos temporarios y permanentes. Las coronas dentarias fueron incluidas en resina acrílica. Se determinó la microdureza Vickers (HV) en el esmalte radial y BHS. Se realizó el análisis cuali y semicuantitativo con espectrometría de energía dispersa (EDS), para los iones Ca, P y Cl. Los valores de microdureza en el esmalte radial y BHS fueron 360,9 HV (+/- 53,0) y 276,5 HV (+/- 34,7) respectivamente en dientes temporarios y 344,2 HV (+/- 37,5) y 301,4 HV (+/- 28,2) en permanentes. La composición química para el Ca, P y Cl fue, en dientes temporarios, de 37,02%, 15,16%, 0,41% respectivamente en el esmalte radial y 37,42%, 14,99%, 0,23% en el esmalte BHS. En permanentes, los valores de esos elementos fueron 39,33%, 18,69%, 0,49% en el esmalte radial y 40,17%, 18,85% y 0,29% en el esmalte BHS. Concluimos que las variaciones en la microdureza y la composición química del esmalte radial y BHS están relacionadas con la organización de la microestructura del esmalte prismático.

Palabras clave: esmalte dental humano, esmalte con bandas, esmalte radial, microdureza, composición química

ABSTRACT

We compared the microhardness and chemical composition of radial and Hunter-Schreger Bands (HSB) of deciduous and permanent human teeth. Tooth crowns were embedded in acrylic resin. Vickers microhardness was determined in radial and HSB enamel. A qualitative and semiquantitative analysis with energy dispersive X-ray spectrometry (EDS) was carried out for Ca, P and Cl ions. Microhardness values in HSB and radial enamel were 276,5 HV (+/- 34,7) and 360,9 HV (+/- 53,0) respectively in deciduous teeth and 301,4 HV (+/- 28,2) and 344,2 HV (+/- 37,5) in permanent teeth. The chemical composition for Ca, P, Cl in deciduous teeth was, 37,02%, 15,16%, 0,41% respectively in radial enamel and 37,42%, 14,99%, 0,23% in HSB enamel. In permanent teeth values were 39,33%, 18,69% and 0,49% in radial enamel and 40,17%, 18,85% and 0,29% in HSB enamel. We conclude that variations in the microhardness values and chemical composition of radial enamel and HSB are related to the organization of the microstructure of prismatic enamel.

Keywords: human tooth enamel, enamel bands, radial enamel, microhardness, chemical composition

INTRODUCCIÓN

El esmalte dental es un tejido mineralizado cuya microestructura presenta una muy compleja organización debido a las exigencias del medio bucal y el contacto con los dientes antagonistas. Por ello, ha sido objeto de numerosas investigaciones y descripciones tanto en odontología como en otras disciplinas (antropología, paleontología, etc.) (1, 2). El estudio de la estructura histológica del esmalte puede ser abordado desde distintos aspectos. Uno de ellos posibilita el reconocimiento de patrones morfológicos funcionales, adaptaciones y/o restricciones ontogénicas o filogenéticas (3) mediante la aplicación de un sistema jerárqui-

co de clasificación (4). Este sistema incluye distintos niveles de complejidad de la microestructura del esmalte mamíferiano, permitiendo ordenar la información, desde la orientación de los cristales en un área limitada del esmalte, hasta la variación y distribución de la microestructura en toda la dentición. Además incorpora el concepto de *tipos de esmalte*, definido como el volumen de esmalte prismático, que presenta diferentes formas estructurales y diseños específicos para cumplir con funciones específicas (1).

Estudios realizados para identificar los tipos de esmalte en dientes humanos (5) evidenciaron que el esmalte radial podía ocupar todo el espesor del esmal-

Recibido 18 de Abril, 2016 - Aceptado 24 de Octubre, 2016

* Correspondencia de autor: Graciela Durso. Asignatura Histología y Embriología, Facultad de Odontología, Universidad Nacional de La Plata. Av 1 y 50, La Plata (1900) TE: 423-6776. Email: graciladurso@gmail.com

te, o bien combinarse con bandas de Hunter-Schreger (BHS) o esmalte irregular (Figs. 1 y 2). Cuando se halla presente, el esmalte BHS se localiza en la zona interna del esmalte mientras que el radial en la externa. En la porción interna de las cúspides en molares y premolares, fue reconocido el esmalte irregular (descrito como *nudoso* en la literatura odontológica).

En el esmalte radial (Fig. 3) los ejes axiales de los prismas están orientados radialmente desde el límite amelodentinario hacia la superficie externa del esmalte (6). En cambio, en el esmalte BHS, los haces de pris-

mas exhiben cambios concordantes de orientación en su recorrido desde su nacimiento en el límite con la dentina (Fig. 4). El cambio de dirección en la orientación de los prismas en una banda es opuesta a la de la banda adyacente, produciendo así un entrecruzamiento. En algunas instancias los prismas pueden cruzar de una banda a otra. Las bandas sirven para reforzar el esmalte, inhibiendo la propagación de fracturas (6). En el esmalte irregular el entrecruzamiento de prismas no es en capas sino en haces o en prismas individuales.

El diente concentra estrés al soportar fuerzas tensionales, derivadas del contacto directo con objetos ambientales resistentes y con los dientes opuestos (los antagonistas oclusales). Cuando los dientes son degradados por medio del desgaste o abrasión no es posible la reparación de las superficies fracturadas o

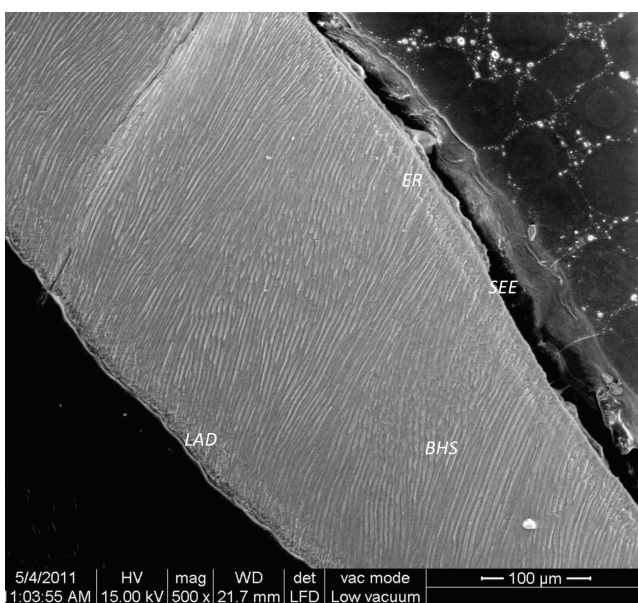


Figura 1. Micrografía al microscopio electrónico de barrido (MEB) del espesor del esmalte dental. Se observa esmalte radial (ER) en la superficie externa del esmalte (SEE), combinado con esmalte con bandas BHS. LAD: Límite amelodentinario, (x500).

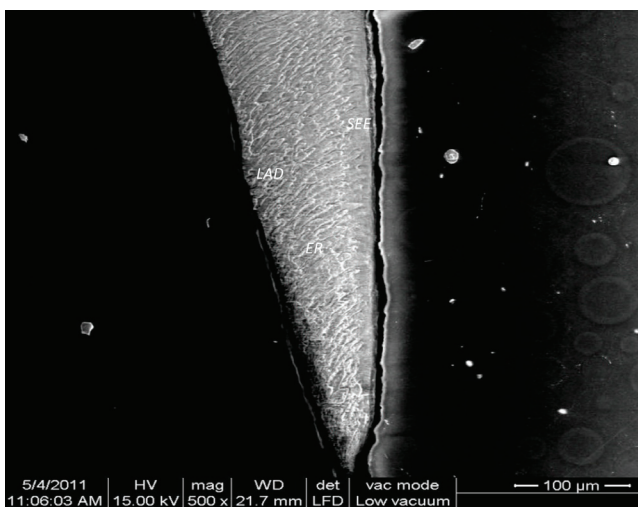


Figura 2. Micrografía al MEB de la zona cervical del esmalte dental. El esmalte radial (ER) puede ocupar todo el espesor del esmalte. Ofrece resistencia al desgaste pero puede fracturarse en el sentido de los prismas (x500).

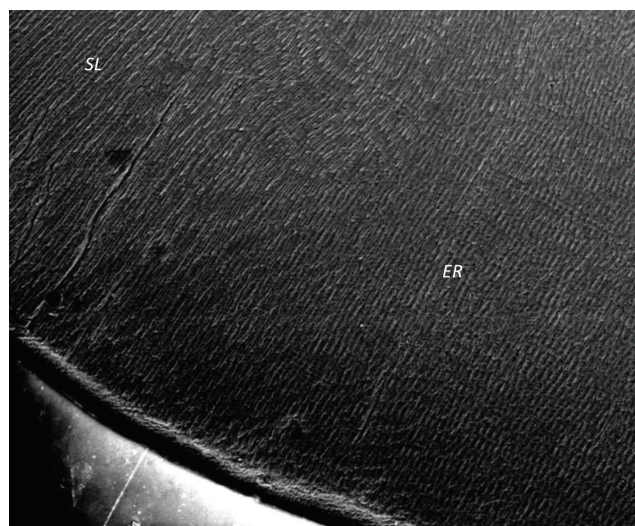


Figura 3. Esmalte radial (ER). Arriba a la izquierda, se observan prismas seccionados longitudinalmente (SL) (MEB x 300).

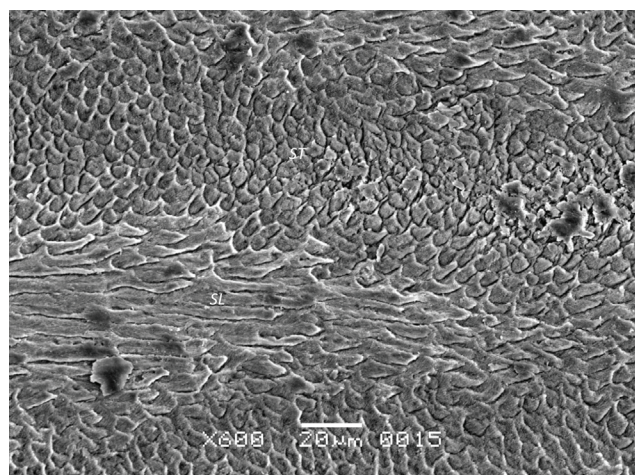


Figura 4. Esmalte BHS. Se observan zonas alternadas de prismas en sección transversal (ST) y longitudinal (SL) (MEB x 600).

gastadas. Sin embargo, existen dos soluciones filogenéticas a este problema: 1- el reemplazo continuo de dientes, como ocurre en numerosos grupos de reptiles y 2- la especialización a nivel de la microestructura del tejido (7). Esta última es la habitual en los dientes de los mamíferos, los que emplean grandes presiones oclusales en sus mecanismos masticatorios.

Bajaj y Arola (8) mostraron que el esmalte exterior presenta una menor resistencia a la creación y crecimiento de grietas mientras que el entrecruzamiento de los haces de prismas imparte un endurecimiento apreciable, sobre todo en las regiones interiores de las cúspides de esmalte. El alto grado de decusación (entrecruzamiento de prismas en el esmalte) puede aumentar la resistencia a la fractura, ofreciendo un camino "fácil" (a lo largo de los prismas) y un camino "difícil" (a través de los prismas) para las grietas que lo atraviesan. Jiang *et al.* (9) destacan que el entrecruzamiento de prismas provee un mecanismo de detención de rajaduras y potencia la resistencia a las fuerzas tensionales. Rensberger (7) sostiene que el entrecruzamiento de los prismas representa una adaptación funcional que permite minimizar los riesgos de fractura adamantina.

Por lo tanto, se necesita de la combinación de los distintos tipos de esmalte para cubrir los variados requerimientos biomecánicos (Fig. 3). El esmalte radial, con los prismas paralelos entre sí, es más resistente al desgaste mientras que el esmalte BHS y el esmalte irregular, con decusación de prismas, son resistentes a la fractura (2, 7, 10).

Un estudio comparativo del cociente de proporción entre el esmalte BHS y el espesor total del esmalte entre dientes permanentes y temporarios (11) mostró que la proporción de esmalte BHS en los permanentes fue de 0,64 mientras que en los temporarios resultó de 0,72 (Fig. 5 y Fig. 6).

El esmalte dental es el tejido calcificado de mayor dureza en el cuerpo humano debido al elevado contenido de sales minerales y a su organización cristalina (12). La dureza adamantina decrece desde la superficie libre a la conexión amelodentinaria, o sea que está en relación directa con el grado de mineralización (13). El contenido mineral del esmalte está representado por el fosfato decacálcico hidroxiapatita en una relación calcio/fósforo (Ca/P) 2,04 a 2,09 (14).

Braly *et al.* (15) sostienen que la dureza y el módulo de Young del esmalte de molares humanos disminuyen más del 50% desde la superficie oclusal hacia la unión amelo-dentinaria. Considera que posibles fuentes de estas variaciones están relacionadas con cam-

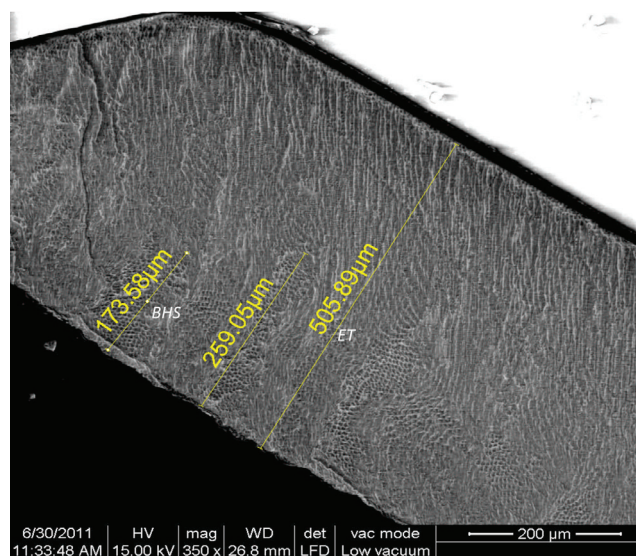


Figura 5. Espesor (en micrómetros) del esmalte BHS y total (ET) en dientes permanentes.

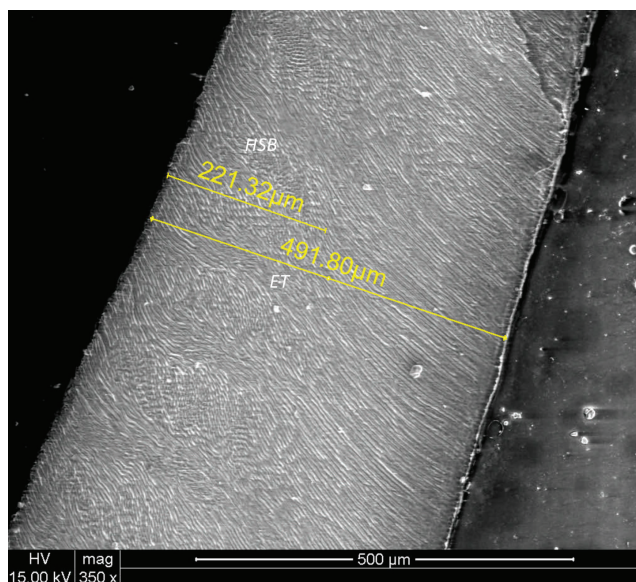


Figura 6. Espesor (en micrómetros) del esmalte BHS y total (ET) en dientes temporarios.

bios en la composición química local, en la microestructura y en la orientación de los prismas.

Por lo tanto el propósito del trabajo fue establecer la relación entre la microdureza y la composición química con la microestructura del esmalte en el nivel tipos de esmalte, en piezas dentarias permanentes y temporarias.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron coronas de piezas dentarias humanas pertenecientes al archivo de la cátedra de Histología y Embriología de la Facultad de Odontología de la Uni-

versidad Nacional de La Plata (UNLP) que fueron obtenidas con el consentimiento informado del paciente. Las piezas fueron descontaminadas en glutaraldehído al 2% durante 30 minutos, lavadas y conservadas en seco. Se seleccionaron muestras de la dentición temporaria y permanente (10 de cada dentición), con esmalte sin lesiones clínicas ni restauraciones presentes. Las coronas fueron incluidas en resina acrílica y desgastadas con lijas de granulación decreciente (de grano 600 a 1200) en un plano sagital, pulidas con alumina en suspensión y lavadas con ultrasonido (Fig. 7). La preparación de las muestras se realizó en la Facultad de Odontología. Para el registro de la microdureza Vickers (HV) se utilizó un microdurómetro Future Tech FM- 700 perteneciente al Laboratorio de Investigaciones en Metalurgia Física (LIMF) dependiente de la Facultad de Ingeniería (FI-UNLP), empleando una carga de 10 g con un tiempo de duración de 10". Las improntas fueron realizadas en el esmalte externo e interno de las caras libres (Fig. 8).

En cada una de las muestras se realizó el microanálisis elemental en el esmalte externo e interno de las caras libres (Fig. 8), considerando los iones calcio (Ca) fósforo (P), magnesio (Mg), sodio (Na) y cloro (Cl). Se obtuvieron espectros de energía dispersa (EDS) mediante un microscopio electrónico de barrido con anexo de sonda de microanálisis (ESEM FEI Quanta 200) del Servicio de Microscopía Electrónica y Microa-



Figura 7. Pieza decidua incluida en resina acrílica, desgastada y pulida.

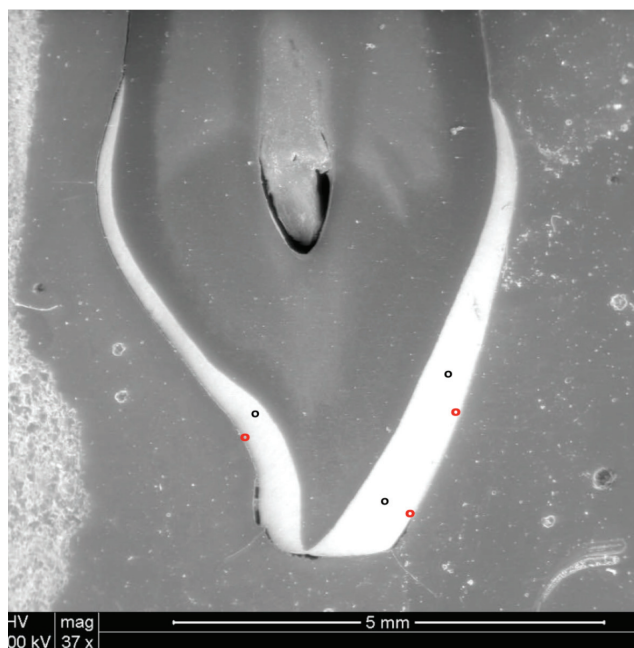


Figura 8. Zonas de registro. En rojo esmalte radial, en negro esmalte BHS.

nálisis (SeMFi-LIMF, FI- UNLP). Los datos fueron analizados con software estadístico y análisis de variancia (ANOVA) y en los casos de diferencia estadística fue empleado el test de Bonferroni. Se aceptó un error menor de 0,05 ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Los valores de microdureza en el esmalte radial y BHS fueron 360,9 HV (+/- 53,0) y 276,5 HV (+/- 34,7) en dientes temporarios y 344,2 HV (+/- 37,5) y 301,4 HV (+/- 28,2) en permanentes (Tabla 1). Se encontró diferencia significativa entre la microdureza del esmalte radial y BHS, tanto en temporarios como en permanentes; no se halló diferencia significativa entre el esmalte radial de permanentes y temporarios pero sí en BHS ($p < 0,05$). Los espectros del microanálisis por EDS muestran picos para sodio, magnesio, fósforo, cloro y calcio, tanto en el esmalte radial y como en el BHS de ambas denticiones (Figs. 9 y 10). El análisis

	ESMALTE BHS		ESMALTE RADIAL	
	Permanentes	Temporarios	Permanentes	Temporarios
Media	301,4	276,5	344,2	360,9
De	28,2	34,7	37,5	53,0

Tabla 1. Valores promedio de microdureza Vickers (HV) y desviación estándar (DE) del esmalte con bandas y radial en dientes permanentes y temporarios.

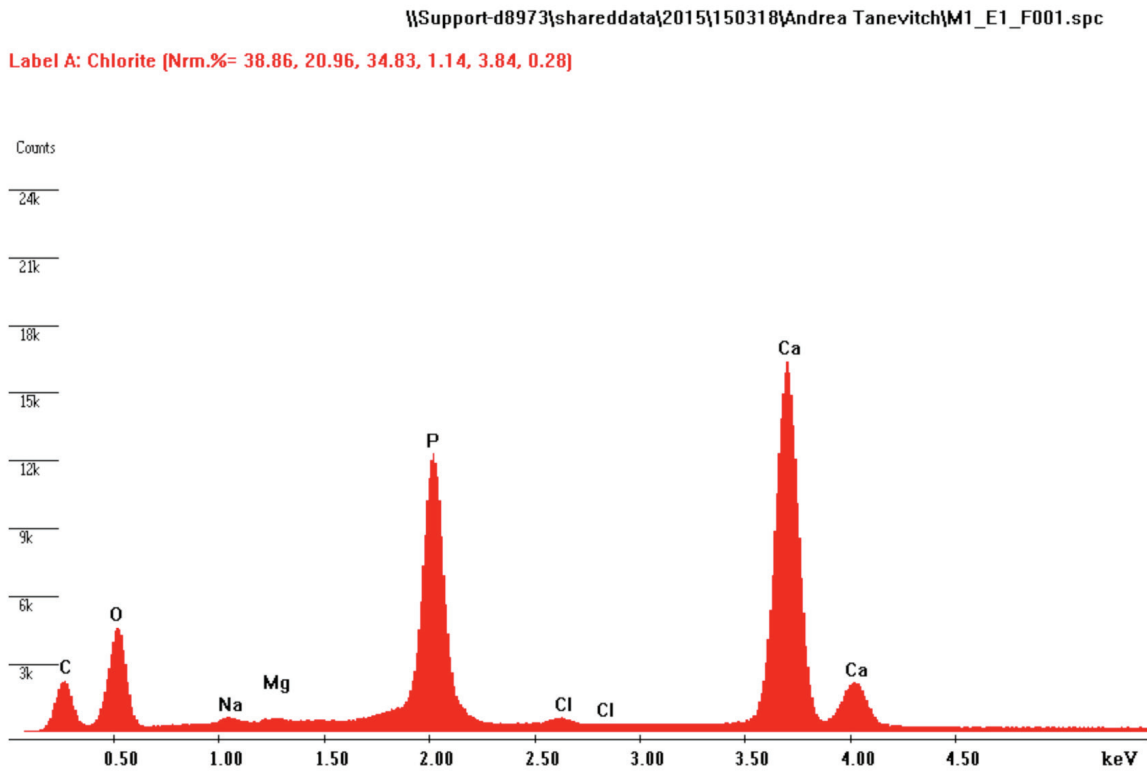


Figura 9. Espectrometría de energía dispersa (EDS) en el esmalte de dientes permanentes

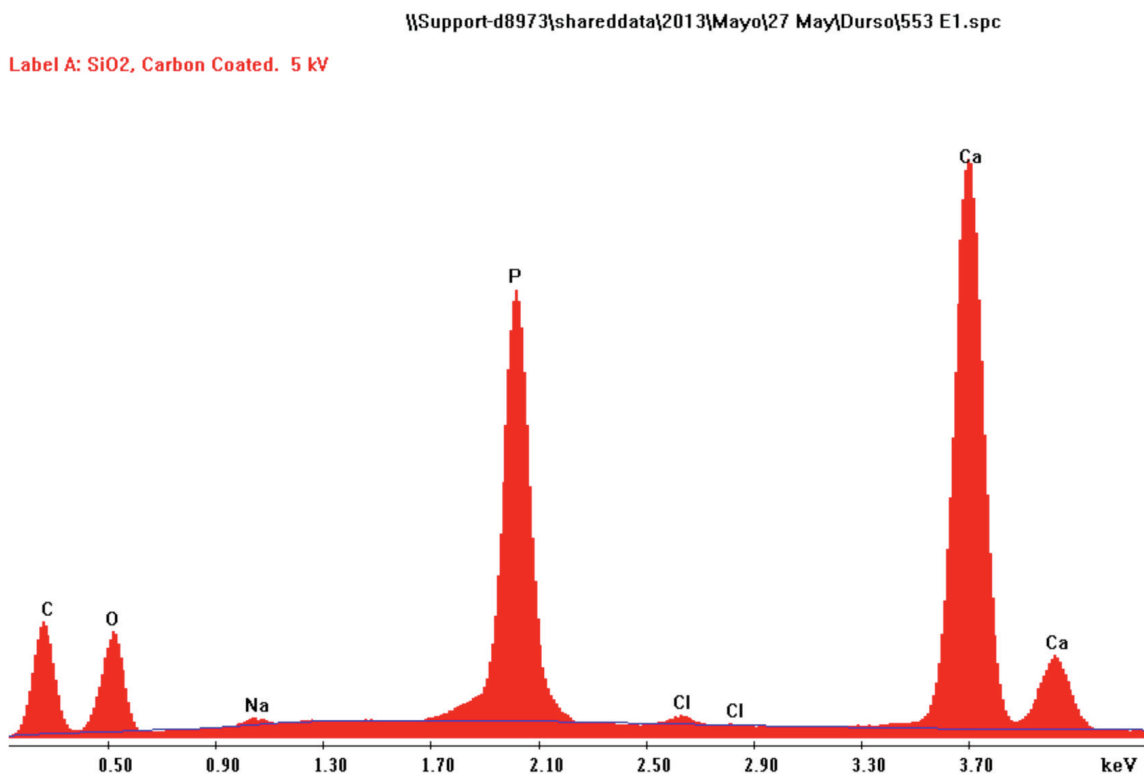


Figura 10. Espectrometría de energía dispersa (EDS) en el esmalte de dientes deciduos

semicuantitativo mostró mayor relación porcentual de calcio en el esmalte de piezas permanentes que en deciduas. Los valores porcentuales relativos a cada dentición se muestran en las Tablas 2 y 3. Se encontró mayor proporción de sodio en el esmalte BHS, tanto en piezas permanentes como deciduas, a la vez que la proporción de cloro en ese tipo de esmalte, fue menor (Tabla 4). Sin embargo, comparando los tipos de esmalte de piezas temporarias y deciduas, no se encontró diferencia significativa en el valor porcentual del sodio, ni el cloro. La relación Ca/P en el esmalte radial fue de 2,11 en temporarios y de 2,26 en permanentes, mientras que en el esmalte BHS fue de 2,21 en temporarios y de 2,13 en permanentes. Se encontró diferencia significativa entre el calcio (Ca) del esmalte de permanentes y temporarios ($p < 0,05$) (Tabla 4).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El contenido mineral del esmalte le confiere la dureza necesaria al tejido para cumplir su función biomecánica. Por ello, es importante considerar la microdureza en términos de resistencia al desgaste. Rensberger (7) sostiene que tipo de desgaste en el esmalte de mamíferos está fuertemente influenciado por la dirección de los prismas. En este sentido, consideramos que los distintos valores de microdureza hallados en el esmalte radial y el esmalte BHS tienen relación, por un lado, con los cambios en la dirección de los prismas en cada tipo de esmalte y por el otro, con su comportamiento anisotrópico como fue demostrado por Staines *et al.* (16). La menor resistencia al desgaste encontrada en la zona interna del esmalte de piezas permanentes y temporarias utilizando microdureza, concuerda con lo

	Elemento	Na	Mg	P	Cl	Ca	Ca/P
Esmalte Radial	Promedio	0,73*	0,24*	15,16*	0,41*	37,02*	2,21*
	DE	0,20	0,11	1,03	0,14	3,84	0,32
Esmalte BHS	Promedio	0,87*	0,30*	14,99*	0,23*	37,42*	2,26*
	DE	0,13	0,08	0,63	0,09	4,92	0,39

Tabla 2. Valores relativos promedio (peso%) y desviación estándar (DE) de la composición elemental del esmalte radial y BHS en dientes temporarios. * La diferencia es significativa ($p < 0,05$)

	Elemento	Na	Mg	P	Cl	Ca	Ca/P
Esmalte Radial	Promedio	0,67*	0,28*	18,69*	0,49*	39,33*	2,11*
	DE	0,11	0,08	2,78	0,15	2,64	0,08
Esmalte BHS	Promedio	0,79*	0,31*	18,85*	0,29*	40,17*	2,13*
	DE	0,14	0,06	0,79	0,09	3,24	0,11

Tabla 3. Valores relativos promedio (peso%) y desviación estándar (DE) de la composición elemental del esmalte radial y BHS en dientes permanentes. * La diferencia es significativa ($p < 0,05$)

Elemento	Na	Mg	P	Cl	Ca	Ca/P
Esmalte Radial Temporarios	0,73	0,24	15,16	0,41	37,02 ^a	2,21
Esmalte Radial Permanentes	0,67	0,28	18,69	0,49	39,33 ^a	2,11
Esmalte BHS Temporarios	0,87	0,30	14,99	0,23	37,42 ^b	2,26
Esmalte BHS Permanentes	0,79	0,31	18,85	0,29	40,17 ^b	2,13

Tabla 4. Análisis elemental comparativo del esmalte radial y BHS de permanentes y temporarios

^a Existe diferencia significativa en el Calcio del esmalte radial de temporarios y permanentes

^b Existe diferencia significativa en el Calcio del esmalte BHS de temporarios y permanentes

informado por otros estudios utilizando nanodureza (17). No obstante, la microdureza del esmalte BHS de dientes permanentes resultó mayor que el de temporarios. Esto podría estar relacionado con la diferente inclinación de las bandas (son más curvadas hacia la cúspide) y el menor espesor del esmalte de los dientes temporarios (18), como también con la densidad del empaquetamiento de BHS en dientes permanentes observada por Lynch *et al.* (19).

Según Boyde y Fortelius (20) el factor más importante en la resistencia a la abrasión del esmalte es la dirección del eje del prisma respecto a la superficie oclusal. Los prismas del esmalte cuya orientación resulta perpendicular a la superficie masticatoria (como en el esmalte radial), ofrecen gran resistencia a la abrasión. En este trabajo, esto se expresó en los mayores valores de microdureza encontrados en el esmalte radial de ambas denticiones. Debemos considerar que los prismas están constituidos por un empaquetamiento de cristales, cuya orientación varía en la cabeza y la cola. Al estudiar la microestructura de esmalte con relación al microdesgaste, Maas (21) sostiene que las diferentes respuestas a la abrasión de los esmaltes prismáticos y no prismáticos reflejan la influencia de la estructura, pero en el nivel de organización de cristalitas más que a nivel prismas. Los cambios, más acentuados en BHS, crean una interfase con un mayor contenido de proteína del (más acentuados en BHS) crean una interfase con un mayor contenido de proteína del esmalte (22) determinando la menor resistencia al desgaste.

Sin embargo, otro factor que puede influir en la respuesta mecánica de los tipos de esmalte es la composición química, como fue reportado por Cuy *et al.* (17). Nuestros resultados son consonantes con lo señalado por De Menezes *et al.* (23) en relación a la mayor

mineralización del esmalte de dientes permanentes, quedando demostrado por una relación porcentual (peso%) de calcio más elevada en ambos tipos de esmalte de la dentición permanente. Estudios realizados por Cárdenas *et al.* (24) demuestran que algunos elementos varían en su concentración (g%) desde la superficie externa hacia el límite amelodentinario. Uno de ellos es el sodio, donde la menor concentración se observa en la superficie externa del esmalte. Esto coincide con los resultados obtenidos en este estudio, donde la mayor cantidad porcentual de sodio se encontró en BHS, tanto en temporarios como en permanentes. Esta observación revalida los resultados mostrados por Kunin *et al.* (25) donde el contenido de óxido de sodio, óxido de magnesio, óxido de potasio y flúor se incrementa significativamente desde las capas superficiales del esmalte hacia la profundidad. Asimismo, Kunin *et al.* (25) y Cárdenas *et al.* (24) coinciden que el contenido de fósforo y calcio muestra una disminución desde la superficie hacia la proximidad del límite con la dentina. En nuestro estudio, la proporción de calcio del esmalte de piezas permanentes fue mayor que en deciduas, aunque la relación Ca/P no mostró diferencia significativa. Posibles causas se encuentran en las variaciones individuales como la edad, el medio ambiente bucal al que estuvo expuesto el diente, en la técnica empleada y en las limitaciones de este trabajo.

Nuestros resultados confirman que el esmalte BHS resulta menos resistente al desgaste que el esmalte radial. Las diferencias encontradas en los valores de la microdureza y la composición química del esmalte radial y BHS en cada dentición, están relacionadas con la organización de la microestructura de cada tipo de esmalte. Estas características contribuyen a la integridad del tejido adamantino.

BILIOGRAFÍA

1. Goin F, Durso G, Anselmino C, Batista S, Tanevitch A, Abal A. (2007) Microestructura del esmalte dentario: definiciones y conceptos. *RAOA* 95 (5): 393-398.
2. Shimizu D, Spears IR, Macho GA. (2005) Effect of prism orientation and loading direction on contact stresses in prismatic enamel of primates: implication for interpreting wear patterns. *Am. J. Phys. Anthropol.* Apr; 126(4): 427-34.
3. Koenigswald W, Goin F. (2000) Enamel differentiation in South American marsupials and comparison of placental and marsupial enamel. *Paleontographica Abt. A.B.*; 225: 137-141.
4. Koenigswald W, Clemens W. (1992) Levels of complexity in the microstructure of mammalian enamel and their application in studies of systematics. *Scanning Microscopy.* 6: 195- 218.
5. Durso G, Abal A. (2008) Variabilidad de la morfología de los prismas del esmalte humano. *Acta Microscópica* 17: 1-8.
6. Koenigswald W, Sander P. (1997) Glossary of terms used for enamel microstructures. In Koenigswald W SP, editor. Tooth enamel microstructure. Rotterdam: Balkema; p. 267-297.
7. Rensberger J. (1997) Mechanical adaptation in enamel. In Koenigswald W SP, editor. Tooth enamel microstructure. Rotterdam: Balkema; p. 227-257.
8. Bajaj D, Arola D. (2009) Role of prism decussation on fatigue crack growth and fracture of human enamel. *Acta Biomater.* oct.; 5(8): 3045-56.

9. Jiang Y, Spears IR, Macho GA. (2003) An investigation into fractured surfaces of enamel of modern human teeth: a combined SEM and computer visualization study. *Arch. Oral Biol.* ; 48: 449-457.
10. Xu HH, Smith DT, Jahanmir S, Romberg E, Kelly JR, Thomson VP, Rekow ED. (1998) Indentation damage and mechanical properties of human enamel and dentin. *J Dent Res.* Mar; 77(3): 472-80.
11. Tanevitch A, Durso G, Batista S, Abal A, Llompert G, Llompert J, Martínez C, Licata L. (2013) Enamel microstructure of deciduous teeth: Types of enamel and resistance to abrasion. *e-Universitas UNR Journal.* Vol.1 11(6):1718-22
12. Bhaskar SN. (1986). *Histología y Embriología Bucal de Orban.* Buenos Aires. 9th ed. Buenos Aires: El Ateneo
13. Gomez de Ferraris ME, Campos Muñoz A. (2002) *Histología y Embriología Bucodental.* 2nd ed. Madrid: Médica Panamericana.
14. Hedge M, Moany A. (2012) Remineralization of enamel subsurface lesions with casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate: A quantitative energy dispersive X-ray analysis using scanning electron microscopy. An in vitro study. *J Conserv.Dent.* Jan-Mar; 15(1): 61-67.
15. Braly A, Darnell LA, Mann AB, Teaford MF, Wieths TP. (2007) The effect of prism orientation on the indentation testing of human molar enamel. *Arch. Oral Biol.* Sep; 52(9):856-60.
16. Staines M, Robinson WH, Hood JAA. (1981) Spherical indentation of tooth enamel. *J Mater Sci.* ;16:2551-2556
17. Cuy JL, Mann AB, Livi KJ, Teaford MF, Weihs TP(2002) Nanoindentation mapping of the mechanical properties of human molar tooth enamel. *Arch Oral Biol.* Apr; 47(4):281-91.
18. Durso G, Tanevitch A, Batista S, Abal A, Llompert G, Llompert J, Martínez C, Licata L, Perez P. (2013) Estudios sobre la microestructura del esmalte en dientes deciduos. *Publicación Informativa y Científica de la Facultad de Odontología UNLP.* Junio; 1: 23-28.
19. Lynch C, O'Sullivan V, Dockery P, McGillycuddy C, Sloan A. (2010) Hunter-Schreger Band patterns in human tooth enamel. *J Anat.* Aug; 217(2): 106-115.
20. Boyde A, Fortelius M. (1986) Development, structure and function of rhinoceros enamel. *Zool J Linn Soc* (87): 181-214
21. Ten Cate A (1989) *Histología Oral. Desarrollo, estructura y función.* Buenos Aires. Médica Panamericana, 2° ed. pp 252-273
22. Maas, MC (1991) Enamel structure and microwear: an experimental study of the response of enamel to shearing force. *Am. J. Phys. Anthropol.* May; 85(1): 31-4
23. De Menezes Oliveira MA, Torres CP, Gomes-Silva JM, Chinelatti MA, De Menezes FC, Palma-Dibb RG, Borsato MC. (2010) Microstructure and mineral composition of dental enamel of permanent and deciduous teeth. *Microsc Res Tech.* May; 73(5): 572-7.
24. Cárdenas JM, Murga HM, Villagrán Rueda S, Cárdenas GM, Gutierrez Cantú F, Guerrero Barrera A. (2010) Distribución de elementos químicos en el esmalte dental. *Revista de Ciencias Basicas UJAT.* Junio; 9(1): 3-11.
25. Kunin AA, Evdokimova AY, Moiseeva NS. (2015) Age-related differences of tooth enamel morphochemistry in health and dental caries. *EPMA J.* Jan 29; 6 (1):3. eCollection 2015.