



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

**Concentraciones de Elementos Traza
y Microscopía Multifotónica en Dientes
Humanos para la Estimación de la Edad**

D^a Ana Cristina Fernández Escudero

2020



**Concentraciones de elementos traza y
microscopía multifotónica en dientes
humanos para la estimación de la edad**

Tesis Doctoral

Presentada por:

D.^a Ana Cristina Fernández Escudero

Dirigida por:

Prof. Dra. D.^a María Dolores Pérez Cárceles
Prof. Dr. D. Manuel López Nicolás

UNIVERSIDAD DE MURCIA

Escuela Internacional de Doctorado
Murcia 2020

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Dña. María Dolores Pérez Cárceles y al Dr. D. Manuel López Nicolás, gracias por vuestra profesionalidad y por vuestra gran paciencia en este largo camino. He aprendido mucho a vuestro lado.

En especial a la Dra. Dña. María Dolores Pérez Cárceles por su ayuda, ánimo y esfuerzo. Ha sido un privilegio realizar esta tesis con su dirección y un enriquecimiento tanto personal como profesional durante todos estos años. La admiro. Muchas gracias.

Al Dr. D. José Manuel Bueno, por su inestimable colaboración y por su trato siempre amable, muchas gracias.

Al Dr. D. Joaquín Gómez, por su gran ayuda, por sus ánimos y por su interés mostrado, todo un privilegio. Muchas gracias.

A todas las personas de la Universidad que me han ayudado en este camino, con sus magníficas e imprescindibles aportaciones, como Isabel Legaz, Antonio Maurandi, Diego y Rafael de Paz. Y sin olvidarme de Raúl Orenes, Delia Bautista, M^a José Gabaldón, Magdalena Vázquez y al personal de la Clínica Odontológica Universitaria del Hospital Morales Meseguer. Gracias.

A Antonio, gracias por tu comprensión y ánimo, una gran suerte trabajar contigo, aprendo mucho a tu lado. A Leti y Miguel Ángel, por sus ánimos. Y a mis más que compañeros de trabajo, amigos, Emilio y Juanra, gracias por todo, por los momentos de risas y por los momentos menos buenos, que a vuestro lado son solo eso: menos buenos. Gracias por dibujarme siempre una sonrisa en la cara.

A personas tan especiales como Marta, Maca, Laura, Luis y Nacira. Por compartir momentos y experiencias únicas, gracias.

A Maribel. Cómo tú dices, gracias por ser y estar. Ya eres parte de nuestra familia.

A amigos tan maravillosos como Pepe, gracias por tu gran ayuda.

A Gemma, gracias por todo lo que me has enseñado y por lo vivido a tu lado. Ha sido un regalo de la vida conocerte.

Por tener la suerte de tener a un tesoro que se llama Eduardo. Gracias, amigo, por estar siempre.

A Lourdes, por todo el apoyo, por tu cariño, por tu infinita ayuda, por tus ánimos, por tu comprensión, por todo. Gracias. ¿Y ahora qué hacemos? Pues ver siempre la luna llena.

A mi familia. A mis *pris*, en especial a María por estar siempre y al pequeño Martín, bienvenido. A mi abuelo Pepe, por ser excepcional y por su amor, por ser el mejor ejemplo de que nunca hay que rendirse. Y a Jessi, gracias por estar ahí.

A los que siguen estando presentes en el recuerdo. A mi tío Pepe (te lo prometí) y a mis abuelas Francisca y Flora, a quienes siempre siento a mi lado y cuya llama nunca se apaga.

A mis padres y a mi hermana, porque sin vosotros no hubiese llegado hasta aquí, por habérmelo dado todo, por vuestro amor infinito. Me siento muy afortunada de teneros. Gracias a los dos por haberme dado el mejor regalo posible, Lau, que le pone el color a mi vida.

A Ennio, por poner la banda sonora a esta tesis, la música es la mejor letra.

*A mis padres y a mi hermana,
por ser el motor de mi vida*

RESUMEN

La estimación de la edad es uno de los problemas más complejos de resolver en las Ciencias Forenses, debido a la falta de consenso y precisión de los métodos, tanto en personas vivas como en fallecidas, su determinación en muchas ocasiones es crucial en la resolución de los casos. Es numerosa la metodología descrita en la literatura científica para su estimación, principalmente en huesos y en dientes. La elección de los métodos más apropiados en cada caso resulta crucial, al igual que el cumplimiento de los principios médicos, éticos y legales.

Actualmente, los dientes se han convertido en una herramienta fundamental tanto en Antropología como en Odontología Forense, principalmente en los casos donde el sujeto no puede ser identificado visualmente o por otros medios, ya que los dientes son más resistentes a situaciones extremas como desastres naturales, accidentes, incendios, etc. en comparación con los huesos que pueden sufrir un mayor número de alteraciones.

La dentina es, debido a su naturaleza, única y singular, una matriz biológica apropiada para el estudio del depósito de los elementos a largo plazo. La cual presenta una estabilidad elemental de su estructura y a su vez un importante dinamismo y diversidad en su composición.

El objetivo general de esta tesis fue analizar, mediante diferentes técnicas instrumentales, los cambios químicos que se producen en los dientes humanos con el paso de los años, con el fin de ampliar y mejorar los métodos existentes para la estimación de la edad.

El primer objetivo fue investigar en población española, un total de 25 elementos traza en 150 dentinas coronales sanas, molares y premolares. Los dientes fueron clasificados en tres grupos de edad, por sexo y por tipo de diente.

Los elementos analizados fueron agrupados en esenciales o potencialmente esenciales y en tóxicos o potencialmente tóxicos, y fueron detectados en el siguiente orden de concentración $\text{Ca} > \text{P} > \text{Mg} > \text{Na} > \text{S} > \text{K} > \text{Sr} > \text{Zn} > \text{Ba} > \text{Fe} > \text{B} > \text{Ti} > \text{Mn} > \text{Cr} > \text{Ni} > \text{Cu} > \text{Co} > \text{Se} > \text{V}$ y los tóxicos: $\text{Al} > \text{Pb} > \text{Sn} > \text{Li} > \text{As} > \text{Cd}$. Las técnicas usadas fueron Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) y Espectrometría de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES).

El segundo objetivo fue determinar la estimación de la edad a través de 11 dientes, mediante el uso de las técnicas de microscopía multifotónica: Fluorescencia por excitación de dos fotones (TPEF) y Generación de segundo armónico (SHG). En primer lugar, a partir de la comparación de ambas señales obtenidas (ratio) y con la obtención del parámetro AGIN o SAAID (Índice de Edad). Y, por otro lado, mediante la variación del tamaño de los

túbulos presentes en la dentina.

El sodio, potasio, bario, níquel y cobalto son los elementos esenciales que presentan variabilidad en función del sexo. Sodio y cobalto fueron más elevados en mujeres. El plomo fue el único elemento tóxico significativamente superior en varones.

Ambos tipos de dientes, molares y premolares son apropiados indistintamente para el estudio de los elementos traza en la dentina.

Del total de 25 elementos analizados, diez se correlacionaron significativamente con la edad, de los cuales tres son tóxicos (Pb, Sn y Li) o potencialmente tóxicos y siete esenciales (Sr, Mg, S, K, Zn, Ba, B). Sus concentraciones medias fueron significativamente superiores al aumentar el rango de edad, con excepción del B y el Zn. Los elementos tóxicos plomo, litio y estaño se correlacionan de forma significativa y positiva entre sí y con los elementos esenciales que aumentan significativamente con la edad (Sr, Mg, S, K, Zn, Ba, B).

El plomo es el elemento que mejor explica la edad en función de sus concentraciones en la dentina mediante un modelo de regresión logarítmica.

El esmalte solo proporciona señal TPEF, mientras que la dentina emite señal TPEF y SHG, esta última debido a la presencia de colágeno. Entre la ratio de las señales TPEF/SHG de áreas locales y global de la dentina no hay diferencias significativas, existiendo una correlación entre ambas cercana a 1. Por lo tanto, no es necesario realizar un análisis con microscopía multifotónica local, siendo suficiente un análisis global.

Observamos que la ratio entre ambas señales multifotónicas (TPEF/SHG) aumenta de forma progresiva y significativa desde los 18 hasta los 50 años, al igual que los valores SAAID, debido a la disminución del colágeno presente en la dentina con el paso de los años. Ambos parámetros se mantienen más estables a partir de esta edad. Por otro lado, el aumento del tamaño de los túbulos de la dentina observados mediante SHG, indican un incremento de la edad, probablemente debido al aumento de componente mineral y a la reducción de fibras de colágeno. Entre el sujeto de menor y mayor edad hay un incremento del 65% del tamaño de los túbulos dentinarios.

El análisis de los elementos traza y la microscopía multifotónica en la dentina humana son herramientas complementarias eficaces para la estimación de la edad, siendo de especial trascendencia en diferentes circunstancias en el ámbito médico-forense.

Palabras clave: Estimación de la edad; elemento traza; diente; ICP-MS; ICP-OES; microscopía multifotónica; forense.

ABSTRACT

The estimation of age is one of the most complex problems to solve in Forensic Sciences, due to the lack of consensus and precision of the methods, both in living and deceased people, its determination in many occasions is crucial in the resolution of the cases. The methodology described in the scientific literature for its estimation is numerous, mainly in bones and teeth. The choice of the most appropriate methods in each case is crucial, as is compliance with medical, ethical and legal principles.

Nowadays, dental pieces have become a fundamental tool in both Anthropology and Forensic Dentistry, mainly in case where the subject can not be identified visually or by other means, since the teeth are more resistant to extreme situations such as natural disasters, accidents, fires, etc. in comparison with bones that can suffer a greater number of alterations.

Dentine is, due to its unique and singular nature, a suitable biological matrix for the study for the long-term deposition of the elements. It has an elemental stability of its structure and at the same time an important dynamism and diversity in its composition.

The general objective of this thesis was analysed by using different instrumental techniques, the chemical changes that occur in the human teeth over the years, in order to extend and improve the existing methods for age estimation.

The first objective was to investigate in Spanish population, a total of 25 trace elements in 150 healthy coronal dentines, molars and premolars. The teeth were classified into three age groups, by sex and by tooth type.

The elements analysed were grouped into essential or potentially essential and toxic or potentially toxic, and they were detected in the following order of concentration $Ca > P > Mg > Na > S > K > Sr > Zn > Ba > Fe > B > Ti > Mn > Cr > Ni > Cu > Co > Se > V$, and the toxic: $Al > Pb > Sn > Li > As > Cd$. The techniques used were Inductively Couple Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) and Inductively Couple Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES).

The second objective was to determine the estimation of age through 11 teeth, using the techniques of multiphoton microscopy: Two Photon Excitation Fluorescence (TPEF) and Second Harmonic Generation (SHG). Firstly, from the comparison of both signals obtained (ratio) and with the obtaining of the AGIN and SAAID (Age Index). Secondly, by varying the size of the tubules present in the dentine.

Sodium, potassium, barium, nickel and cobalt are the essential elements that show variability according to sex. Sodium and cobalt were higher in women. Lead was the only

toxic element significantly higher in men.

Both types of teeth, molars and premolars, are suitable for the study of trace elements in dentine.

Of the 25 elements analysed, ten were significantly correlated with age, of which three are toxic (Pb, Sn and Li) or potentially toxic and seven essential (Sr, Mg, S, K, Zn, Ba, B). Their average concentrations were significantly higher as the age range increased, with the exception of B and Zn. The toxic elements lead, lithium and tin correlate significantly and positively with each other and with the essential elements which increase significantly with age (Sr, Mg, S, K, Zn, Ba, B).

Lead is the element that best explains age as a function of its concentrations in dentine using a logarithmic regression model.

Enamel only provides a TPEF signal, while dentine shows TPEF and SHG signals, the latter due to the presence of collagen. There are no significant differences between the ratio of TPEF/SHG signals from local areas and global dentine, with a correlation between both close to 1. Therefore, it is not necessary to perform an analysis with local multiphoton microscopy, a global analysis being sufficient.

We observe that the ratio between the two multiphoton signals (TPEF/SHG) increases progressively and significantly from 18 to 50 years of age, as do the SAAID values due to the decreases in collagen present in dentine over the years. Both parameters remain more stable after this age. On the other hand, the increase in the size of the dentine tubules observed by SHG, indicates an increase in age, probably due to the increase in the mineral component and the reduction of collagen fibres. Between the younger and older subjects there is a 65% increase in the size of the dentine tubules.

Trace elements analysis and multiphoton microscopy in human dentine are effective complementary tools for age estimation, being of particular importance in different circumstances in the medical-forensic field.

Key words: Age estimation; trace element; tooth; ICP-MS; ICP-OES; multiphoton microscopy; forensic.

ABREVIATURAS, SIGLAS Y SÍMBOLOS

<	Menor que
>	Mayor que
3D	Tres dimensiones
µg	Microgramos
µm	Micrómetros
AAS	Espectrometría de absorción atómica
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Al	Aluminio
AGEs	Productos finales de glicosilación avanzada
AGIN o SAAID	<i>SHG to autofluorescence aging index dermis</i> (Índice de Edad)
ARN	Ácido ribonucleico
As	Arsénico
ATP	Enlaces fosfato
B	Boro
Ba	Bario
Ca	Calcio
CaHAP	Hidroxiapatita
CAD	Conexión Amelodentinaria
CBE	Comité de Bioseguridad en Experimentación
Cd	Cadmio
CDC	<i>Centers for Disease Control of Prevention</i>
CEI	Comisión de Ética de Investigación
CI	Intervalo de confianza
Co	Cobalto
Cr	Cromo

Cu	Cobre
Curva ROC	Curva de Característica Operativa para el Receptor (<i>Receiver Operation Characteristic</i>)
DD	Displasia Dentinaria
DI	Dentinogénesis Imperfecta
DPD	Desoxipiridinolina
DVI	<i>Disaster Victim Identification</i>
ED	Espejo dicroico
FDI	Federación Dental Internacional (<i>World Dental Federation</i>)
Fe	Hierro
Hz	Hercio
ICP-MS	Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo
ICP-OES	Espectrometría de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo
IE	Índice de edad
ID	Identification
IPM	Intervalo <i>post mortem</i>
ITD	Dentina Intertubular
K	Potasio
kg	Kilogramos
KMO	Test de Kaiser-Meyer-Olkin
Li	Litio
LOD	<i>Limit of detection</i>
LOQ	<i>Limit of quantification</i>
LOUM	Laboratorio de Óptica de la Universidad de Murcia
Máx.	Máximo
Mg	Magnesio
mg	Miligramo

Min.	Mínimo
Mn	Manganeso
MPM	Microscopía multifotónica
n	Tamaño muestral
Na	Sodio
ncRNA	ARN no codificante
Ni	Níquel
nm	Nanómetro
p	p -valor
P	Fósforo
Pb	Plomo
PC	Componentes principales
PCA	Análisis de componentes principales
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PTD	Matriz Peritubular
r	Coefficiente de correlación
R ²	Coefficiente de determinación
R _{TS}	Ratio o razón TPEF/SHG
S	Azufre
SD	Desviación estándar
Se	Selenio
SHG	Generación de segundo armónico
sjTREC	<i>Signal joint T-cell receptor</i>
Sn	Estaño
Sr	Estroncio
Ti	Titanio
TPEF	Fluorescencia por excitación de dos fotones

TSP	<i>Two-Step</i>
UV	Radiación ultravioleta
V	Vanadio
VIH	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
WHO	<i>World Health Organization</i>
Zn	Zinc

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	29
1.1. Estimación de la edad.....	31
1.1.1. El diente como material de identificación.....	32
1.1.2. Determinación de la edad en cadáveres.....	34
1.1.2.1. Individuos menores de 25 años.....	36
1.1.2.2. Adultos (mayores de 25 años).....	36
1.1.3. Determinación de la edad en vivos.....	39
1.1.4. Estudios bioquímicos.....	41
1.2. Histología y embriología bucodental.....	44
1.2.1. Clasificación de los dientes.....	44
1.2.2. Morfogénesis e histogénesis del órgano dentario.....	48
1.2.3. Periodoncio o periodonto.....	50
1.2.4. Esmalte.....	50
1.2.4.1. Propiedades físicas y composición química.....	51
1.2.4.2. Histofisiología del esmalte y amelogénesis.....	52
1.2.4.3. Patología y consideraciones clínicas.....	53
1.2.5. Complejo dentino-pulpar.....	53
1.2.6. Pulpa.....	54
1.2.6.1. Componentes estructurales.....	54
1.2.6.2. Histofisiología pulpar: Actividades funcionales y modificaciones con la edad.....	55
1.2.7. Dentina.....	56
1.2.7.1. Propiedades físicas y composición química.....	56
1.2.7.2. Estructura histológica de la dentina.....	57
1.2.7.2.1. Unidades estructurales básicas y secundarias.....	57
1.2.7.3. Dentinogénesis.....	58

1.2.7.3.1. Dentina primaria	59
1.2.7.3.2. Dentina secundaria	60
1.2.7.3.3. Dentina terciaria	61
1.2.7.4. Histofisiología	61
1.2.7.4.1. Actividad mecánica	62
1.2.7.4.2. Actividad defensiva	62
1.2.7.4.3. Actividad sensitiva.....	62
1.2.7.5. Patología y consideraciones clínicas	63
1.3. Elementos Químicos	63
1.4. Microscopía	74
1.4.1. Microscopía lineal.....	74
1.4.2. Microscopía multifotónica	76
1.4.2.1. Fluorescencia por excitación de dos fotones (TPEF; Two-Photon Excitation Fluorescence)	78
1.4.2.2. Generación de segundo armónico (SHG; Second Harmonic Generation)	79
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	83
3. MATERIAL Y MÉTODOS	89
3.1. Objetivo 1.....	91
3.1.1. Descripción y toma de la muestra.....	91
3.1.2. Metodología experimental.....	92
3.1.2.1. Preparación de las muestras. Obtención del bloque de dentina coronal.....	92
3.1.2.2. Digestión por microondas	94
3.1.2.3. Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) y Espectrometría de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES)	95
3.1.2.3.1. Límites de detección y de cuantificación	97
3.1.3. Análisis de los datos	98

3.1.4. Análisis estadístico	98
3.1.4.1. Análisis descriptivo de los datos	98
3.1.4.2. Análisis de comparación de medias.....	98
3.1.4.3. Análisis de correlación	99
3.1.4.4. Análisis de regresión	99
3.1.4.5. Análisis de componentes principales	99
3.1.5. Aspecto éticos y legales.....	100
3.2. Objetivo 2.....	100
3.2.1. Descripción y toma de la muestra	100
3.2.1.1. Dientes	100
3.2.2. Procedimientos experimentales	101
3.2.2.1. Determinación de los componentes del diente y obtención del segmento del diente	101
3.2.2.2. Sistema experimental. Microscopio multifotónico polarimétrico.....	102
3.2.2.3. Procedimiento experimental. Toma de imágenes	104
4. RESULTADOS	107
4.1. Objetivo 1.....	109
4.1.1. Análisis de la concentración de elementos traza en la dentina humana.....	109
A) Concentración de los elementos esenciales en el total de la muestra (n = 150)..	109
B) Concentración de los elementos tóxicos en el total de la muestra (n = 150)	110
4.1.2. Análisis de la concentración de elementos traza en la dentina humana en función de distintos parámetros	111
A) Elementos esenciales	111
a1) Concentración de los elementos esenciales en función del sexo	111
a2) Concentración de los elementos esenciales en función del rango de edad en el total de la muestra (n = 150)	113
a3) Concentración de los elementos esenciales en función del tipo de diente	117

B) Elementos tóxicos.....	119
b1) Concentración de los elementos tóxicos en función del sexo.....	119
b2) Concentración de los elementos tóxicos en función del rango de edad en el total de la muestra (n = 150).....	121
b3) Concentración de los elementos tóxicos en función del tipo de diente	123
4.1.3. Relación entre la concentración de los elementos traza en la dentina y la edad	124
A) Elementos esenciales	124
a1) Concentración de los elementos esenciales respecto al sexo en función del rango de edad.....	125
I) Concentración de los elementos esenciales en hombres en función del rango de edad	125
II) Concentración de los elementos esenciales en mujeres en función del rango de edad	128
a2) Concentración de los elementos esenciales respecto al tipo de diente en función del rango de edad.....	131
I) Concentración de los elementos esenciales en molares en función del rango de edad	131
II) Concentración de los elementos esenciales en premolares en función del rango de edad	134
B) Elementos tóxicos.....	138
b1) Concentración de los elementos tóxicos respecto al sexo en función del rango de edad.....	138
I) Concentración de los elementos tóxicos en hombres en función del rango de edad	138
II) Concentración de los elementos tóxicos en mujeres en función del rango de edad	140
b2) Concentración de los elementos tóxicos respecto al tipo de diente en función del rango de edad.....	142
I) Concentración de los elementos tóxicos en molares en función del rango de edad	142

II) Concentración de los elementos tóxicos en premolares en función del rango de edad	144
4.1.4. Análisis de correlación entre los diferentes elementos traza	146
4.1.5. Correlación entre las concentraciones de elementos traza y la edad.....	149
4.1.6. Análisis de regresión.....	149
4.1.7. Análisis de componentes principales (PCA).....	164
4.2. Objetivo 2.....	167
4.2.1. Unión esmalte-dentina, zona transición estructural entre ambas	168
4.2.2. Dentina	168
4.2.3. Ratio TPEF/SHG de la dentina	169
4.2.4. Áreas locales e imagen global	171
4.2.5. Valores Índice de edad	172
4.2.6. Tamaño de los túbulos de dentina	174
5. DISCUSIÓN.....	177
5.1. Objetivo 1: Determinación de elementos traza en dentina humana para la estimación de la edad.....	179
5.2. Objetivo 2: Microscopía multifotónica aplicada a dientes humanos para la estimación de la edad.....	190
6. CONCLUSIONES.....	195
7. BIBLIOGRAFÍA.....	199
8. ANEXO. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	227

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Métodos usados hoy en día para la estimación de la edad	41
Tabla 2. Descripción de la muestra de dientes usada en el estudio	92
Tabla 3. Límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOC) de los diferentes elementos traza	97
Tabla 4. Número de caso y edad (años) de los sujetos estudiados.....	101
Tabla 5. Valores de las concentraciones de los elementos esenciales en el total de la muestra (n = 150)	109
Tabla 6. Valores de las concentraciones de los elementos tóxicos en el total de la muestra (n = 150).....	110
Tabla 7. Valores de las concentraciones de los elementos esenciales en función del sexo	112
Tabla 8. Valores de las concentraciones de los elementos esenciales en función del rango de edad en el total de la muestra (n = 150)	114
Tabla 9. Diferencias estadísticamente significativas entre valores de las concentraciones de los elementos esenciales en el total de la muestra (n = 150), en función de los grupos de edad	117
Tabla 10. Valores de las concentraciones de los elementos esenciales en función del tipo de diente: molar y premolar	118
Tabla 11. Valores de las concentraciones de los elementos tóxicos en función del sexo	120
Tabla 12. Valores de las concentraciones de los elementos tóxicos en función del rango de edad en el total de la muestra (n = 150)	121
Tabla 13. Diferencias estadísticamente significativas entre valores de las concentraciones de los elementos tóxicos en el total de la muestra (n = 150)	122
Tabla 14. Valores de las concentraciones de los elementos tóxicos en función del tipo de diente: molar y premolar.....	123
Tabla 15. Valores de las concentraciones de los elementos esenciales en hombres en función del rango de edad	125
Tabla 16. Diferencias estadísticamente significativas entre valores de las concentraciones de los elementos esenciales en hombres en función de los grupos de edad.....	128
Tabla 17. Valores de las concentraciones de los elementos esenciales en mujeres en función del rango de edad	129

Tabla 18. Diferencias estadísticamente significativas entre valores de las concentraciones de los elementos esenciales en mujeres en función de los grupos de edad	131
Tabla 19. Valores de las concentraciones de los elementos esenciales en molares en función del rango de edad	132
Tabla 20. Diferencias estadísticamente significativas entre valores de las concentraciones de los elementos esenciales en molares en función de los grupos de edad	134
Tabla 21. Valores de las concentraciones de los elementos esenciales en premolares en función del rango de edad	135
Tabla 22. Diferencias estadísticamente significativas entre valores de las concentraciones de los elementos esenciales en premolares en función de los grupos de edad	137
Tabla 23. Valores de las concentraciones de los elementos tóxicos en hombres en función del rango de edad.....	138
Tabla 24. Diferencias estadísticamente significativas entre valores de las concentraciones de los elementos tóxicos en hombres en función de los grupos de edad.....	139
Tabla 25. Valores de las concentraciones de los elementos tóxicos en mujeres en función del rango de edad.....	140
Tabla 26. Diferencias estadísticamente significativas entre valores de las concentraciones de los elementos tóxicos en mujeres en función de los grupos de edad.....	141
Tabla 27. Valores de las concentraciones de los elementos tóxicos en molares en función del rango de edad.....	142
Tabla 28. Diferencias estadísticamente significativas entre valores de las concentraciones de los elementos tóxicos en molares en función de los grupos de edad.....	143
Tabla 29. Valores de las concentraciones de los elementos tóxicos en premolares en función del rango de edad	144
Tabla 30. Diferencias estadísticamente significativas entre valores de las concentraciones de los elementos tóxicos en premolares en función de los grupos de edad.....	145
Tabla 31. Matriz de correlación para pares de elementos tóxicos y esenciales. Coeficientes de correlación de Spearman.....	147
Tabla 32. Coeficientes de correlación significativos positivos entre las concentraciones de los elementos traza en la dentina y la edad	149
Tabla 33. Ecuaciones de regresión para la estimación de la edad en función de las concentraciones de los elementos traza en dentina humana, en todo el rango de edad.	150
Tabla 34. Ecuaciones de regresión para la estimación de la edad en función de las concentraciones de plomo por grupos de edad en dentina humana	152

Tabla 35. Ecuaciones de regresión para la estimación de la edad en función de las concentraciones de estaño por grupos de edad en dentina humana.....	153
Tabla 36. Ecuaciones de regresión para la estimación de la edad en función de las concentraciones de litio por grupos de edad en dentina humana	154
Tabla 37. Ecuaciones de regresión para la estimación de la edad en función de las concentraciones de magnesio por grupos de edad en dentina humana	155
Tabla 38. Ecuaciones de regresión para la estimación de la edad en función de las concentraciones de azufre por grupos de edad en dentina humana.....	156
Tabla 39. Ecuaciones de regresión para la estimación de la edad en función de las concentraciones de potasio por grupos de edad en dentina humana	157
Tabla 40. Ecuaciones de regresión para la estimación de la edad en función de las concentraciones de estroncio por grupos de edad en dentina humana	158
Tabla 41. Ecuaciones de regresión para la estimación de la edad en función de las concentraciones de zinc por grupos de edad en dentina humana	159
Tabla 42. Ecuaciones de regresión para la estimación de la edad en función de las concentraciones de bario por grupos de edad en dentina humana.....	160
Tabla 43. Ecuaciones de regresión para la estimación de la edad en función de las concentraciones de boro por grupos de edad en dentina humana	161
Tabla 44. Modelo de regresión logarítmica para el plomo	162
Tabla 45. Ratio de intensidades TPEF/ SHG de la dentina y desviación estándar en función de la edad	170
Tabla 46. Ratio TPEF/SHG (media) y desviación estándar en los 3 grupos de edad estudiados.....	171
Tabla 47. Valores de la ratio TPEF/SHG de imágenes locales e imagen global de la dentina	172
Tabla 48. Valores SAAID para todos los sujetos y su desviación estándar	173
Tabla 49. SAAID (media) y desviación estándar en los 3 grupos de edad estudiados ...	174
Tabla 50. Tamaño de las fibras de los túbulos de la dentina (μm) y desviación estándar en función de la edad (años)	175

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Dentición decidua	45
Figura 2. Dentición permanente.....	45
Figura 3. Nomenclatura DÍGITO DOS de una dentición permanente	46
Figura 4. Esquema de sección longitudinal de diente anterior y posterior	47
Figura 5. Esquema de la amelogénesis	53
Figura 6. Esquema de la dentinogénesis	59
Figura 7. Dentina primaria (izquierda) y dentina secundaria (derecha)	60
Figura 8. Microfotografía de la predentina que bordea la pulpa con dentina en la parte superior	60
Figura 9. Dentina reparativa.....	61
Figura 10. Sistemas ópticos para la obtención de imágenes confocales.....	77
Figura 11. Diagrama de Jablonski.....	78
Figura 12. Diagrama esquemático del proceso SHG	79
Figura 13. Estructura de tropocolágeno	80
Figura 14. Bolsa de esterilización autosellable.....	93
Figura 15. Molar.....	93
Figura 16. Autoclave Vela 170	93
Figura 17. Plataforma con pieza de mano acoplada	93
Figura 18. Bloque de dentina coronal	94
Figura 19. Baño de ultrasonidos Mestra® modelo “Calipso”	94
Figura 20. Horno JP SELECTA.....	94
Figura 21. Dentina molida en un mortero de ágata	94
Figura 22. Microondas Milestone Modelo Ultrawave	95
Figura 23. ICP-MS, Agilent 7900 Series® Instrument, Agilent Technologies, Dublin, Ireland)	96
Figura 24. ICP-OES, PerkinElmer, Waltham, MA, USA, Optima 8300	96

Figura 25. Sección longitudinal de diente	101
Figura 26. Esquema de microscopio multifotónico desarrollado en el Laboratorio de Óptica de la Universidad de Murcia	102
Figura 27. Microscopio invertido	103
Figura 28. Láser de femtosegundos	103
Figura 29. Concentraciones de los elementos esenciales analizados en la dentina humana, en el total de la muestra (n = 150)	110
Figura 30. Concentraciones de los elementos tóxicos analizados en la dentina humana, en el total de la muestra (n = 150)	111
Figura 31. Concentraciones de los elementos esenciales en la dentina humana, en hombres y en mujeres	113
Figura 32. Concentraciones de los elementos esenciales en la dentina humana y su relación con la edad	116
Figura 33. Concentraciones de los elementos esenciales analizados en la dentina humana, en molares y premolares	119
Figura 34. Concentraciones de los elementos tóxicos analizados en la dentina humana, en hombres y en mujeres	120
Figura 35. Concentraciones de los elementos tóxicos en dentina y su relación con la edad	122
Figura 36. Concentraciones de los elementos tóxicos analizados en la dentina humana, en molares y premolares	124
Figura 37. Concentraciones de los elementos esenciales en hombres en función del rango de edad	127
Figura 38. Concentraciones de los elementos esenciales en mujeres en función del rango de edad	130
Figura 39. Concentraciones de los elementos esenciales en molares en función del rango de edad	133
Figura 40. Concentraciones de los elementos esenciales en premolares en función del rango de edad	136
Figura 41. Concentración de los elementos tóxicos en hombres en función del rango de edad	139
Figura 42. Concentración de los elementos tóxicos en mujeres en función del rango de edad	141

Figura 43. Concentración de los elementos tóxicos en molares en función del rango de edad	143
Figura 44. Concentración de los elementos tóxicos en premolares en función del rango de edad	145
Figura 45. Diagrama representativo de las correlaciones positivas entre los elementos tóxicos y esenciales que aumentan su concentración con la edad en la dentina de los dientes humanos	148
Figura 46. Gráficos de dispersión del total de los casos (n = 150) de las concentraciones de los distintos elementos traza.....	150
Figura 47. Ecuaciones de regresión del plomo en función de la edad.....	152
Figura 48. Ecuaciones de regresión del estaño en función de la edad.....	153
Figura 49. Ecuaciones de regresión del litio en función de la edad.....	154
Figura 50. Ecuaciones de regresión del magnesio en función de la edad.....	155
Figura 51. Ecuaciones de regresión del azufre en función de la edad	156
Figura 52. Ecuaciones de regresión del potasio en función de la edad.....	157
Figura 53. Ecuaciones de regresión del estroncio en función de la edad.....	158
Figura 54. Ecuaciones de regresión del zinc en función de la edad.....	159
Figura 55. Ecuaciones de regresión del bario en función de la edad	160
Figura 56. Ecuaciones de regresión del boro en función de la edad	161
Figura 57. Valores ajustados de la concentración de plomo en función de la edad.....	163
Figura 58. Concentración de plomo ($\mu\text{g/g}$) de cada sujeto analizado en función de la edad	163
Figura 59. Línea de tendencia ajustada al modelo de regresión logarítmica propuesto para el plomo para la estimación de la edad.....	164
Figura 60 A. Gráfico de cargas factoriales global, para todo el rango de edad (18-88 años)	165
Figura 60 B. Gráfico de cargas factoriales para el rango de edad <30 años	166
Figura 60 C. Gráfico de cargas factoriales para el rango de edad 30-50 años.....	166
Figura 60 D. Gráfico de cargas factoriales para el rango de edad >50 años	167
Figura 61. Señal multifotónica emitida por la dentina	167

Figura 62. Ejemplo representativo de microscopía multifotónica correspondiente a la unión dentina-esmalte de un diente de un sujeto de 24 años.....	168
Figura 63. Imágenes obtenidas con el microscopio multifotónico (señal SHG y TPEF) de la dentina y superposición de ambas señales de un sujeto de 19 años y otro de 65 años .	169
Figura 64. Valores del cociente TPEF/ SHG en función de la edad para las muestras analizadas en el estudio	170
Figura 65. Razón TPEF/SHG media por grupos de edad; menor de 30 años, entre 30 y 50 años y mayor de 50 años	171
Figura 66. Comparación entre la razón TPEF/SHG que se ha obtenido de forma local y de forma global	172
Figura 67. Valores de SAAID en función de la edad para todas las muestras analizadas en el estudio.....	173
Figura 68. Valores medios del parámetro SAAID en los 3 grupos de edad.....	174
Figura 69. Túbulos de la dentina observados con SHG	175
Figura 70. Variación de tamaño de las fibras de los túbulos de la dentina (μm) respecto a la edad (años)	176
Figura 71. Imagen 3D de la dentina, a partir del SHG.....	176

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Estimación de la edad

La estimación de la edad tanto en personas vivas como fallecidas sigue siendo el talón de Aquiles de la Antropología y la Odontología Forense y a su vez es uno de los aspectos más importantes de estas disciplinas, ya que puede clarificar temas de importancia legal y social. Pero la falta de consenso y estandarización supone significativas limitaciones (Ritz-Timme et al., 2000; Cunha et al., 2009; Ubelaker & Khosrowshahi, 2019).

Existen numerosos procedimientos para estimar la edad de un individuo. Hay que tener en cuenta, que los métodos usados para el estudio con personas vivas son diferentes a los que se emplean para un esqueleto o cuerpo no identificado o en estudios paleodemográficos, es decir; los métodos usados en contextos históricos no son extrapolables a contextos forenses. En el caso de requerimientos judiciales, el tiempo para llevar a cabo la investigación, es muy importante (Cunha et al., 2009; Ubelaker & Khosrowshahi, 2019).

La elección de la metodología apropiada para estimar la edad obedece a diferentes factores. Dependiendo de la población de estudio, se usarán unas técnicas u otras. También será necesario tener en cuenta el estado nutricional y los factores socioeconómicos ya que estos influyen en el proceso de envejecimiento. El sexo y el rango de edad esperado son otros elementos para tener en cuenta, ya que las técnicas usadas para determinar la edad en individuos adultos son diferentes a las empleadas en individuos jóvenes (Ritz-Timme et al., 2000; Cunha et al., 2009; Ubelaker & Khosrowshahi, 2019).

La estimación de la edad en individuos adultos de edad avanzada es más complicada tanto en personas vivas como en fallecidos (Pretty & Sweet, 2001; Cunha et al., 2009), ya que es muy difícil discriminar entre personas de 70, 80 y 90 años, porque tanto el desarrollo dental como el esquelético ha finalizado. La determinación en estos casos está plagada de límites y errores, debido a que los métodos son menos precisos (Ritz-Timme et al., 2000) por lo tanto mayor es el rango de error y existirán más discrepancias entre la edad biológica o fisiológica determinada por el antropólogo u odontólogo forense y la edad cronológica actual, por lo que se debe tener en cuenta para establecer un rango de edad fiable (Cunha et al., 2009).

Los métodos para que se consideren aplicables y fiables deben estar publicados en la literatura científica, la información respecto a la exactitud de la estimación de edad tiene que estar disponible y el método ser lo suficientemente preciso. En el caso de la estimación de la edad en sujetos vivos debe cumplir los principios médicos, éticos y legales, principalmente en la elección de metodologías que puedan resultar invasivas. También es importante usar técnicas lo menos destructivas posibles tanto es sujetos vivos como en

casos arqueológicos (Ritz-Timme et al., 2000; Cunha et al., 2009).

Uno de los primeros registros de modelo para la estimación de la edad, data de 1955, en el que Brooks (Brooks, 1955) estudia el cierre de las suturas craneales y el pubis, llegando a la conclusión de que “No one age indicator is adequate”. Posteriormente, en 1965 Kerley (Kerley, 1965) llevó a cabo un estudio pionero sobre la estimación de la edad mediante métodos histológicos, en fémur, tibia y peroné, siendo considerado durante décadas, como uno de los métodos individuales más precisos y supuso la base del resto de estudios histológicos para la estimación de la edad. Sin embargo, se ha limitado su uso en investigaciones forenses debido a la especial formación que deben tener los profesionales y a la disponibilidad de las muestras requeridas (Ubelaker & Khosrowshahi, 2019; Zapico et al., 2019a).

Debido a los nuevos e importantes avances en tecnologías, los antropólogos forenses han ido adaptando los métodos tradicionales para estimar la edad con las nuevas técnicas disponibles, como el escáner 3D. También nuevos enfoques matemáticos, como la *Multivariate Adaptive Regression Splines*, juegan un papel muy importante, al igual que la combinación con otros métodos estadísticos (Ubelaker & Khosrowshahi, 2019).

Los procedimientos para la estimación de la edad los podemos dividir en dos grandes grupos: dentales y esqueléticos, siendo los primeros según muestran las investigaciones, los métodos más fiables, ya que dependen menos de factores étnicos y ambientales (Cunha et al., 2009; Ubelaker & Khosrowshahi, 2019). Los dientes y las estructuras orales en la Odontología Forense son una herramienta fundamental para la identificación en un contexto legal de aquellos individuos que no pueden ser identificados visualmente o por otros medios (Gupta et al., 2014).

1.1.1. El diente como material de identificación

La Odontología Forense es una rama de la Odontología y Estomatología y constituye una especialidad valiosa dentro de la Medicina Legal y Forense.

Las características individuales de la dentición presentan una alta variabilidad, en cuanto a tamaño forma y espacio entre los dientes entre diferentes individuos. La forma en la que los dientes se disponen en la cavidad oral es exclusiva para cada persona. Por otro lado, cada diente tiene una serie de características diferenciables que son básicas en la identificación, sumado a otras cuestiones como son las patologías o anomalías que pueden presentar los dientes, reconstrucciones, etc. Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, llegamos a la conclusión que la enorme combinación de características presentes en los 32 dientes que conforman la dentición de un adulto permite la identificación de individuos, ya

que no existen dos personas con la misma dentadura.

La dureza de las estructuras dentales permite que los dientes se conserven con el paso del tiempo, siendo resistentes tanto a la descomposición y a los efectos de agentes químicos (pH o salinidad), como físicos (como pueden ser altas temperaturas, traumatismos, radiaciones UV, etc) o biológicos (como la acción de hongos y bacterias). Haciéndolos muy útiles en los análisis *post mortem* y siendo esenciales para la identificación de restos humanos (Cunha et al., 2009; Imaizumi, 2015; Reesu et al., 2015; de BOER et al., 2018; Rubio et al., 2018; Adserias-Garriga, 2019; Shah et al., 2019).

Recientes estudios han investigado la relación entre los elementos traza en los dientes humanos y la contaminación (Fischer & Wiechuła, 2016; Shishniashvili et al., 2016; Asaduzzaman et al., 2017) y como un bioindicador del estado nutricional o de enfermedades (Terashima et al., 2017).

Diferentes métodos están siendo desarrollados continuamente para estimar la edad dental analizando los tejidos dentales mediante procedimientos histológicos, radiográficos y bioquímicos, pero ninguno es considerado muy preciso (Cugati et al., 2015; Pinchi et al., 2015; Shruthi et al., 2015; Elshehawi et al., 2016; Capitaneanu et al., 2017; Nedunchezian et al., 2018; Sirin et al., 2018).

Actualmente, la determinación de la edad dental es un procedimiento fundamental en casos donde las personas no pueden ser identificadas por ningún otro procedimiento y para la identificación de restos óseos y en estudios paleodontológicos (Przystańska et al., 2017; Ubelaker & Khosrowshahi, 2019). Y en nuevas aplicaciones como en competiciones deportivas con límites de edad (Timme et al., 2017), o en el caso de la identificación de la edad de trabajadoras sexuales menores de edad con fines de reinserción social (Prabhu et al., 2013). Los dientes, por tanto, son un importante elemento para tener en cuenta en Medicina Forense.

Enfermedades periodontales, el desgaste excesivo, un gran número de restauraciones dentales, extracciones, fisiopatías, etc., pueden ser síntomas y características que orienten que el individuo sea de edad madura (Pretty & Sweet, 2001). Además, una degeneración fisiológica observada en los dientes y en el esqueleto, conducen a identificar a personas de edad avanzada, aunque también puede estar condicionada por factores patológicos y las actividades laborales o de ocio (Ubelaker & Khosrowshahi, 2019).

La cantidad y calidad de los tratamientos dentales puede ser indicativo del estado socioeconómico o país de residencia del sujeto. Otros métodos dentales como el etiquetado de las prótesis dentales o dentaduras podrían ayudar a la identificación, al igual que aparatos ortodónticos extraíbles o materiales dentales (Pretty & Sweet, 2001).

La erosión de los dientes depende de numerosas variables como la atrición, la oclusión y la dieta. El desgaste dental puede sugerir un abuso de alcohol, un desorden dental o incluso una hernia de hiato, también el uso de pipas, boquillas, horquillas, tachuelas... Las manchas pueden indicar, el uso de tetraciclinas, tabaco o casos como la masticación de la nuez de betel (propio en países de Asia y Oceanía). La pérdida de dientes puede depender también de diferentes factores como enfermedades, infecciones o consumo de fármacos o drogas de abuso (Pretty & Sweet, 2001; Cunha et al., 2009).

La predicción de la raza o la determinación del sexo a partir de restos esqueléticos es muy importante en el estudio de determinados casos forenses o arqueológicos. Y en el caso del análisis a partir de restos calcinados puede ser complejo, ya que puede haber fragmentaciones o alteraciones del tamaño (Godinho et al., 2019).

1.1.2. Determinación de la edad en cadáveres

En Medicina Forense es fundamental el proceso de “reconstrucción del perfil biológico” del fallecido, en aras de acotar y hacer una estimación de la edad y así alcanzar una identificación positiva a través de la comparación con informes de personas desaparecidas. Tanto los métodos usados como sus rangos de error son cruciales a la hora elegir el método a poner en práctica (Cunha et al., 2009).

La Odontología Forense juega un papel muy importante en la identificación del cadáver, principalmente en situaciones de desastres masivos, como puede ser un accidente de avión o desastres naturales o crímenes violentos, incendios, etc., donde el cuerpo puede haber sufrido una gran transformación y sea casi imposible su identificación a través de un familiar (inspección visual) y/o mediante las huellas dactilares, por lo que se recurre a la identificación dental, ya que los dientes son más resistentes a este tipo de eventos en relación con otros tejidos como el hueso que pueden sufrir mayor número de alteraciones (Ritz-Timme et al., 2000). La naturaleza única de la anatomía humana y las posibles restauraciones dentales aseguran una gran precisión cuando se usan los métodos adecuadamente (Pretty & Sweet, 2001).

En los casos de desastres masivos, el proceso de identificación de víctimas de catástrofes o DVI (del inglés *Disaster Victim Identification*), tiene aún más relevancia la preparación de los especialistas que trabajan en la identificación de los restos, ya que las condiciones de trabajo y el estrés psicológico en estos casos pueden conducir a errores (Pretty & Sweet, 2001).

La identificación se puede realizar de dos formas, puede ser: comparativa o estableciendo un perfil *post mortem* completo (Pretty & Sweet, 2001).

La identificación comparativa se establece cuando los restos del cadáver y los registros dentales *ante mortem* están disponibles, estos pueden incluir moldes dentales, radiografías u odontogramas (registro de la historia clínica dental del paciente). A menudo los individuos con numerosos y complejos tratamientos dentales son más fáciles de identificar, aunque a veces un solo diente puede ser usado para una identificación si tiene características únicas, especiales y diferenciadas. De la misma manera que todos los dientes pueden no revelar suficientes detalles para extraer conclusiones positivas. Si el procedimiento exige el examen individual de cada diente y las estructuras dentales, las similitudes y las discrepancias se deben recoger durante el proceso de comparación, pudiendo encontrar discrepancias explicables, aquellas que se relacionan con el paso del tiempo entre un registro *ante mortem* y *post mortem*, o inexplicables, por ejemplo, cuando un diente no está presente en un registro *ante mortem* pero sí en el *post mortem*. La *American Board of Forensic Odontology* determina que se puede llegar a cuatro conclusiones a raíz de una identificación dental: Identificación positiva, posible identificación, evidencia insuficiente y exclusión. No está establecido un número mínimo de puntos concordantes que se requieran para una posible identificación positiva (Pretty & Sweet, 2001).

Cuando los registros dentales *ante mortem* no están disponibles y no hay otros métodos de identificación posible, se realiza un perfil dental *post mortem*. Este habitualmente proporciona información sobre la edad del fallecido, etnia, sexo o nivel socioeconómico, incluso hábitos de dieta o enfermedades dentales o sistémicas y de esta forma ayuda a delimitar el grupo de población de estudio. Si aun así no se puede obtener la identificación a partir del perfil dental resultante, se puede realizar una reconstrucción facial del individuo con la ayuda de especialistas forenses (Pretty & Sweet, 2001).

En la mayoría de las ocasiones los restos óseos no se encuentran en condiciones óptimas para la identificación, ya que las condiciones ambientales afectan especialmente al estado de conservación de los huesos y los dientes, afectando severamente la estimación de la edad en el caso de personas mayores (Ubelaker & Khosrowshahi, 2019).

Para la estimación de la edad cronológica a partir de los dientes, se debe clasificar a los sujetos en dos grandes grupos: el primer grupo en los que su dentición se encuentra en desarrollo y erupción, representado por individuos menores de 20-25 años, y el segundo grupo formado generalmente por individuos mayores de 25 años en los que la erupción y desarrollo dental ha finalizado completamente (Valenzuela-Garach & Martín-de las Heras, 2018).

1.1.2.1. Individuos menores de 25 años

En primer lugar, en el caso de fetos, se verifica el desarrollo dental y a continuación el esquelético. El método dental que se suele usar es el de Schour & Massler (1941) donde se recopila toda la información que había en aquella época sobre el desarrollo de la dentición humana y la representaron mediante un gráfico en el que se resume las etapas de la evolución dental. Los datos usados para desarrollarlo fueron en gran medida los que recopilaron de Logan & Kronfeld (1933). Estos métodos presentan importantes limitaciones. Respecto a los huesos, el método Fazekas & Kósa (1978) sobre osteología fetal en el contexto forense continúa siendo ampliamente usado (Cunha et al., 2009).

Respecto a los recién nacidos, se debe comprobar la mineralización de la cima de la corona del primer molar a través de Rayos X y diferentes elementos óseos (Cunha et al., 2009).

En cuanto a bebés y niños, la calcificación y la erupción de los dientes son los métodos más habituales. La longitud del diente ha sido demostrada como un método preciso también para estimar la edad. En bebés se debe cotejar la osificación de los huesos del cráneo. En los niños, se debe considerar la longitud de la diáfisis ósea y los centros de osificación y la fusión de la epífisis (Cunha et al., 2009).

En el caso de los adolescentes, se aplican las mismas reglas generales que para niños, estimándose la edad con la evaluación del desarrollo de los huesos de la mano y la muñeca, mediante Rayos X (Cunha et al., 2009).

En la fase de transición entre adolescente y persona adulta, entre los 20 y 25 años, algunos marcadores específicos diferencian el final de crecimiento; el tercer molar, la obliteración del eseno-occipital o sincondrosis basilar, la fusión de la epífisis esternal de la clavícula (última epífisis del cuerpo en fusionarse) y el desarrollo de la mano y la muñeca. Otros métodos como la fusión de los anillos vertebrales lumbares y las epífisis de la cresta iliaca también podrían aplicarse (Cunha et al., 2009; Ubelaker & Khosrowshahi, 2019).

1.1.2.2. Adultos (mayores de 25 años)

El primer método morfológico fue elaborado en 1950 por Gustafson (Gustafson, 1950) que evaluó macroscópicamente seis parámetros que se correlacionan con la edad cronológica que son atrición, formación de dentina secundaria, recesión periodontal, oposición de cemento, reabsorción radicular y transparencia radicular. Posteriormente, en 1971 Johanson (Johanson, 1971) aplicó estos criterios en secciones de dientes que fueron evaluados microscópicamente (Adserias-Garriga, 2019).

Una limitación del estudio de Gustafson es no haber tenido en cuenta que los

distintos parámetros pueden influir de manera diferente en el cálculo de la edad y el hecho de aplicar una única fórmula para cualquier diente (Valenzuela-Garach & Martín-de las Heras, 2018). A pesar de ello su estudio estableció la base para los métodos de desarrollo posteriores, que hoy en día se usan en la Odontología Forense (Adserias-Garriga, 2019).

Posteriormente, en 1970 Bang y Ramm (Bang & Ramm, 1970) desarrollaron un método basado en la transparencia de la raíz. Más tarde, en 1978 Maples (Maples, 1978) simplificó el método de Gustafson, usando solo la deposición de dentina secundaria y la transparencia de la raíz (Adserias-Garriga, 2019).

Ya en 1992 Lamendin et al. (Lamendin et al., 1992) desarrollaron un método macroscópico el cual mide la translucidez de la raíz y la recesión periodontal, posteriormente fue mejorado por Prince y Ubelaker en 2002 (Prince & Ubelaker, 2002) con una mayor precisión de la estimación ya que se tuvo en cuenta el sexo y la ancestralidad. Otro método fue desarrollado en 1994 por Kvaal y Solheim (Kvall & Solheim, 1994) para estimar la edad evaluando cambios progresivos en el tamaño de la pulpa debido a la deposición de dentina secundaria. Los cambios de color en los tejidos dentales también pueden ser usados para estimar la edad, mediante espectrofotometría (Adserias-Garriga, 2019).

Los cambios relacionados con la edad pueden medirse tanto en el esmalte como en la dentina. Pero esta última al estar más aislada dentro de la estructura dental, se ve menos afectada por factores externos que el esmalte (Adserias-Garriga, 2019).

Para la estimación de la edad en el caso de los adultos, diferentes autores recomiendan el uso de técnicas según el estado de conservación del cuerpo (Cunha et al., 2009).

En el caso de cuerpos bien conservados, no identificados, visualmente reconocibles, pero sin identificar, el procedimiento *Two-Step* (TSP) (Baccino & Zerilli, 1997; Baccino & Schmitt, 2006) es una buena elección en estos casos, consiste en la combinación del método de Suchey-Brooks de 1990 (Brooks & Suchey, 1990) sobre la sínfisis del pubis con el método dental de Lamendin et al. (1992). Este último método es considerado como uno de los más precisos para determinar la edad en sujetos mayores de 40 años, aunque tiene algunas limitaciones como en los casos de enfermedad periodontal. Es un método muy fácil, rápido de aplicar y fiable. Tiene un mínimo impacto sobre la variación de la población (Cunha et al., 2009).

Si no hay dientes disponibles o estos han estado enterrados un largo periodo de tiempo, en sustitución del método de Lamendin se puede realizar un análisis microscópico *osteon count*, siendo este un método más lento (Cunha et al., 2009).

En el caso de cuerpos descompuestos, como: putrefactos, momificados, saponificado, quemados y estados que alteran severamente la fisionomía y donde no es posible establecer una edad aparente, los métodos biológicos cobran más importancia. Aun así, se deben seguir realizando radiografías para confirmar si existen elementos dentales u óseos que aún puedan estar en formación o fusión (Cunha et al., 2009).

Cuando se tratan de cuerpos esqueletizados, también puede usarse el método de *Two-Step* (TSP) (Baccino & Zerilli, 1997; Baccino & Schmitt, 2006) en estos casos, excepto si alguna de las partes implicadas está dañada, entonces, deberíamos usar el cierre de las suturas (Cunha et al., 2009).

Cuando se trata de cuerpos calcinados (Cunha et al., 2009) para verificar el desarrollo dental u óseo también se hacen radiografías. La aplicabilidad de los métodos depende de lo extensa que sea la destrucción del cuerpo quemado (Ritz-Timme et al., 2000). Se usa el método de *osteon count*, cuando los huesos no están gravemente calcinados y podemos determinar el lugar anatómico y la estructura histológica del hueso (Ritz-Timme et al., 2000; Cunha et al., 2009).

En conclusión, en cadáveres recientes y esqueletizados es recomendable usar el método de Suchey-Brooks para rangos de edad entre 20-40 años, el método de Lamendin para individuos entre 40-60 años e Iscan (Işcan et al., 1984; 1985; 1987) basado en análisis de la cuarta costilla, a partir de los 60 años. En el caso de cuerpos calcinados, es recomendable usar el análisis microscópico de osteonas. Y en el caso de cuerpos en descomposición, se utilizará la metodología en función de las características del caso (Cunha et al., 2009).

En función de los restos disponibles, cráneo con dientes, sin dientes, un cráneo parcial, torso, costillas superiores y costillas inferiores, se aplicarán técnicas diferentes para la estimación de la edad (Cunha et al., 2009).

Cuando todos los dientes están presentes, el uso de Lamendin es recomendado, siempre y cuando el IPM (intervalo *post mortem*) sea de un periodo reciente, (Cunha et al., 2009), sin embargo, habrá que ser más prudentes con las conclusiones cuando se trate de IPM largos (Ritz-Timme et al., 2000).

1.1.3. Determinación de la edad en vivos

En los últimos años se está recurriendo con mayor frecuencia a la estimación de la edad en personas vivas (Cunha et al., 2009; Ubelaker & Khosrowshahi, 2019). En numerosas ocasiones se debe a la falta de documentos legales (Ritz-Timme et al., 2000), asuntos judiciales relacionados con la migración, pornografía infantil, imputabilidad por mayoría de edad, solicitud de asilo político, entre otras situaciones (Ritz-Timme et al., 2000; Cunha et al., 2009). Es una tarea difícil sobre todo cuando los orígenes ancestrales del individuo son desconocidos (Ubelaker & Khosrowshahi, 2019). Todos los métodos analizados en la revisión realizada por Ritz-Timme et al. (2000) requieren un examen radiológico y/o extracción de muestra de dentina o biopsia, siempre respetando los límites éticos y legales y siendo imprescindible una alta precisión debido al necesario cumplimiento de estas cuestiones (Cunha et al., 2009).

Habitualmente en la mayoría de los procedimientos judiciales, la meta es determinar si el individuo ha alcanzado un umbral de edad específico, por lo que explicar y conocer el error y la desviación estándar es muy importante. Incluso proporcionar un porcentaje de probabilidad de haber alcanzado cierta edad, es de gran utilidad (Cunha et al., 2009).

Los procedimientos utilizados se clasifican en tres grandes grupos:

Exámenes físicos

En el caso de menores de 25 años, el peso y la estatura deben compararse con percentiles proporcionados por WHO (*World Health Organization*) y CDC (*Centers for Disease Control of Prevention*). Se ha demostrado que factores sociales y económicos influyen en el desarrollo del cuerpo, al igual que factores fisiológicos y patológicos (Cunha et al., 2009).

En el caso de la evaluación del desarrollo sexual, se usa el método Tanner (Marshall & Tanner, 1969; 1970) originario de los años 70 y basado en el análisis de los rasgos sexuales. Aunque sigue siendo ampliamente usado, es sabido sus importantes limitaciones respecto a la raza y la variabilidad interindividual, por lo que el propio autor indica que no debería usarse para fines forenses (Cunha et al., 2009).

En adultos, aunque el desarrollo corporal, dental y sexual ha terminado, no se deberían excluir exámenes físicos completos que junto con métodos bioquímicos resultan ser muy útiles, como el estudio de hormonas en mujeres. También existe una variabilidad racial e interindividual (Ritz-Timme et al., 2000; Cunha et al., 2009).

Evaluación esquelética y dental de niños y adultos jóvenes:

Desarrollo esquelético

Uno de los métodos más utilizados para la estimación de la edad en menor de 25 años es la evaluación del crecimiento de la muñeca, algunos de los métodos más populares son: el atlas de Greulich & Pyle (1959) y Tanner-Whitehouse de 1975 (Tanner et al., 2001), aunque actualmente están siendo sustituido por métodos específicos y más adecuados para fines forenses. Hay que tener en cuenta que muchos factores influyen en el desarrollo dental y esquelético; por ejemplo, en la diferenciación del sexo, así distintos estudios demuestran que el crecimiento del esqueleto en los niños es más tardío respecto al de las niñas, alteraciones patológicas (algunas enfermedades afectan al crecimiento), estatus socioeconómico y también algunas infecciones, como el VIH, además de las diferencias étnicas, por lo que determinar la población es muy importante y estandarizar el método de acuerdo con cada una de estos factores (Cunha et al., 2009).

Desarrollo dental

Las técnicas para la estimación de edad a partir de métodos dentales solo deberían aplicarse en sujetos con buena salud dental. Con respecto a la influencia de patologías no podemos sacar conclusiones definitivas, debido a las escasas evidencias científicas. También la influencia de las distintas poblaciones es un factor muy importante para tener en cuenta. El método Demirjian desarrollado en 1973 (Demirjian et al., 1973) es uno de los más adecuados para investigaciones forenses, ya que es específico para cada género y ha sido probado en distintas poblaciones, al igual que Mincer, Harris y Berryman que en 1993 (Mincer et al., 1993) aplicaron dicho desarrollo solo para el tercer molar (Adserias-Garriga, 2019), siendo este método el más común sugerido para estimar si un sujeto ha alcanzado los 18 años (Cunha et al., 2009).

En adultos, métodos basados en el análisis de la dentina, pueden ser muy útiles, pero conlleva problemas éticos debido al daño o destrucción del diente (Cunha et al., 2009). Un estudio importante basado en la dentina es el de Kumagai et al. (2012), en el que se analizaron la concentración de 10 elementos traza en dentina humana en 121 casos para la estimación de la edad, obteniendo resultados reseñables.

En la Tabla 1 podemos ver un resumen de los diferentes métodos usados hoy en día para la estimación de la edad, en función del rango de edad de los sujetos.

Es conveniente siempre que sea posible, combinar métodos esqueléticos, dentales y bioquímicos para la estimación de la edad, siendo el trabajo multidisciplinar sumamente beneficioso.

Tabla 1*Métodos usados hoy en día para la estimación de la edad*

Age group	Method	Destructive	Ionizing radiation	Extraction
Fetal, children	Moorrees et al. [15,16]	No	Yes	No
Fetal, children	Demirjian et al. [18]	No	Yes	No
Fetal, children	Ubelaker et al. [25]	No	Yes	No
Fetal, children	AlQahtani et al. [28]	No	Yes	No
Adolescents	Mincer et al. [26]	No	Yes	No
Adolescents	De Tobel et al. [41–43]	No	No	No
Adults	Johanson et al. [45]	Yes	No	Yes
Adults	Bang and Ramm [47]	Yes	No	Yes
Adults	Lamendine et al. [50]	No	No	Yes
Adults	Prince and Ubelaker [51]	No	No	Yes
Adults	Kvaal et al. [54]	No	Yes	No
Adults	Cameriere et al. [55]	No	Yes	No
Adults	Martin-de las Heras et al. [57]	No	No	No

Nota. Se indica si es necesaria la destrucción de la muestra, si se aplica radiación por ionización y si es necesaria la extracción del diente para aplicar el método. Adaptado de Adserias-Garriga (2019) (p. 83).

1.1.4. Estudios bioquímicos

Estudios bioquímicos en tejidos mineralizados, principalmente en los dientes, se han usado hasta ahora como una herramienta para la estimación de la edad junto con otros métodos complementarios (Martín-de las Heras et al., 1999), estas nuevas metodologías se basan en el proceso natural de envejecimiento (Zapico et al., 2019a).

A comienzos de la década del 2000, estas técnicas empezaron a tenerse en cuenta para la estimación de la edad, principalmente se centran en el estudio de ADN (Cunha et al., 2009; Ubelaker & Khosrowshahi, 2019).

Una fuente excepcional para la extracción de ADN es el diente, debido a la naturaleza resistente de este, superior a la del tejido óseo. El análisis se lleva a cabo mediante la técnica de reacción de la cadena de la polimerasa (PCR). La muestra de ADN genómico se puede comparar tanto con un progenitor como con un hermano. Además de este, la muestra contiene ADN mitocondrial con un alto número de copias, que salvo mutaciones se hereda de la madre, y se usa en los casos donde el ADN genómico está muy deteriorado. El ADN puede ayudar tanto a identificar una víctima, incluyendo casos

donde no hay comparación *ante mortem* posible, como a vincularla al escenario de un crimen, incluso cuando el cuerpo ha sido trasladado o quemado (Pretty & Sweet, 2001).

Diversos estudios han señalado a la racemización del ácido aspártico como una de las técnicas más precisas para la estimación de la edad en diferentes tejidos, especialmente en dentina. Fue descubierta por primera vez en 1975 (Helfam & Bada, 1975), consiste en la conversión natural de la forma L a D del ácido aspártico con la edad, siendo este aminoácido el que tiene una de las tasas más altas de racemización. Por tanto, un aumento de ácido D-aspártico es directamente proporcional a la edad, con una precisión de ± 3 años según los estudios. Un factor muy importante para tener en cuenta en el uso de esta técnica es la temperatura de conservación de los restos, ya que no es adecuada para cuerpos expuestos a altas temperaturas y largos IPM (Martín-de las Heras et al., 1999; Ritz-Timme et al., 2000; Pretty & Sweet, 2001; Cunha et al., 2009; Ubelaker & Khosrowshahi, 2019; Zapico et al., 2019a).

Otros estudios bioquímicos utilizados para la estimación de la edad se pueden resumir en los siguientes:

La acumulación de plomo en la dentina ha demostrado relacionarse con la edad, aunque presenta una alta dependencia con la población estudiada (Ubelaker & Khosrowshahi, 2019; Zapico et al., 2019b).

Los enlaces de colágeno reducidos se han estudiado en diferentes tejidos, aunque no está clara su aplicación forense en la estimación de la edad (Zapico et al., 2019b). Martín-de las Heras et al. (1999) en su estudio sí demostraron la relación del número de enlaces de desoxipiridinolina (DPD) en dentina con la edad con finalidad forense, a mayor edad mayor número de enlaces. Sin embargo, la precisión de la técnica es más baja y sería necesario realizar más estudios al respecto (Zapico et al., 2019b).

Otro ejemplo es el análisis de la composición dental con microespectrometría Raman, la cual requiere un amplio conocimiento de técnicas químicas (Ubelaker & Khosrowshahi, 2019; Zapico et al., 2019b).

Los productos finales de glicosilación avanzada (AGEs) de la reacción de Maillard, aumentan con la edad. Los cambios de color a amarillento o parduzco, causados por el avance de la edad fueron estudiados en tejidos duros, como el diente. En este caso la temperatura de conservación del cuerpo no es un factor tan determinante como en la racemización del ácido aspártico, sin embargo, la precisión de los estudios es baja y está afectada por factores tafonómicos o de fosilización. Tampoco esta técnica es adecuada para muestras con amplios IPM y personas que presenten alguna patología previa como diabetes mellitus (Ubelaker & Khosrowshahi, 2019; Zapico et al., 2019a).

Otro método es el *estudio del acortamiento de los telómeros con la edad*, principalmente en muestras de sangre, piel y dientes. Las dos principales ventajas que presenta, es que no existen diferencias entre poblaciones y la técnica que se aplica está estandarizada (*Southern blot*). Sin embargo, los estudios al respecto presentan también una baja precisión y presentan dependencia de factores tafonómicos, al igual que de factores genéticos, epigenéticos y ambientales, incluido el dimorfismo sexual y las enfermedades (Ubelaker & Khosrowshahi, 2019; Zapico et al., 2019a).

Las mutaciones del ADN mitocondrial han demostrado tener una clara correlación con la edad en diferentes tejidos. En los últimos años, estudios en dentina y pulpa dental presentan unos resultados prometedores (Ubelaker & Khosrowshahi, 2019; Zapico et al., 2019a).

Signal joint T-cell receptor (sjTREC) excision circles disminuyen al aumentar la edad, este método solo es posible aplicarlo en sangre y también presenta una baja precisión, se observa una dependencia del tiempo posiblemente debida a un deterioro del material con el paso de este (Ubelaker & Khosrowshahi, 2019; Zapico et al., 2019a).

Recientes estudios epigenéticos pueden proporcionar marcadores innovadores y relevantes para la estimación de la edad. Como se ha demostrado con la *metilación del genoma humano*, el cual cambia con la edad, principalmente en estudios en sangre y saliva. Dos recientes estudios en 2016 se han realizado en dientes y han demostrado una buena correlación de niveles de metilación con la edad, una alta precisión y un rango bajo de error. Otros estudios epigenéticos son los cambios en la conformación de cromatina y en las histonas y *Noncoding RNAs (ncRNA)* (ARN no codificante) cadena no codificante. Son necesarias más investigaciones epigenéticas para que puedan ser aplicadas de manera generalizada a la estimación forense de la edad (Ubelaker & Khosrowshahi, 2019; Zapico et al., 2019a).

Estudios más extensos sobre métodos bioquímicos son necesarios, ya que podrían ser útiles en combinación con otros métodos antropológicos y odontológicos forenses (Martín-de las Heras et al., 1999; Zapico et al., 2019a).

1.2. Histología y embriología bucodental

En los seres humanos la función más relevante de los dientes es la masticación. La presencia de dos denticiones a lo largo de la vida corresponde a la necesidad de acomodarse al crecimiento de los maxilares y de la cara.

1.2.1. Clasificación de los dientes

Según su permanencia en la cavidad bucal, podemos clasificar los dientes humanos como dientes primarios (deciduos) y dientes permanentes.

Los dientes temporarios o comúnmente llamados de leche aparecen entre los 6 y 8 meses de vida hasta los 3 años, donde se pueden distinguir 3 periodos, englobando un ciclo de 8 años:

- Crecimiento de la corona y de la raíz. Tarda 1 año aproximadamente en completarse.
- Maduración de la raíz. Unos 3 años y medio, aproximadamente.
- Resorción de la raíz y exfoliación. 3 años y medio de duración.

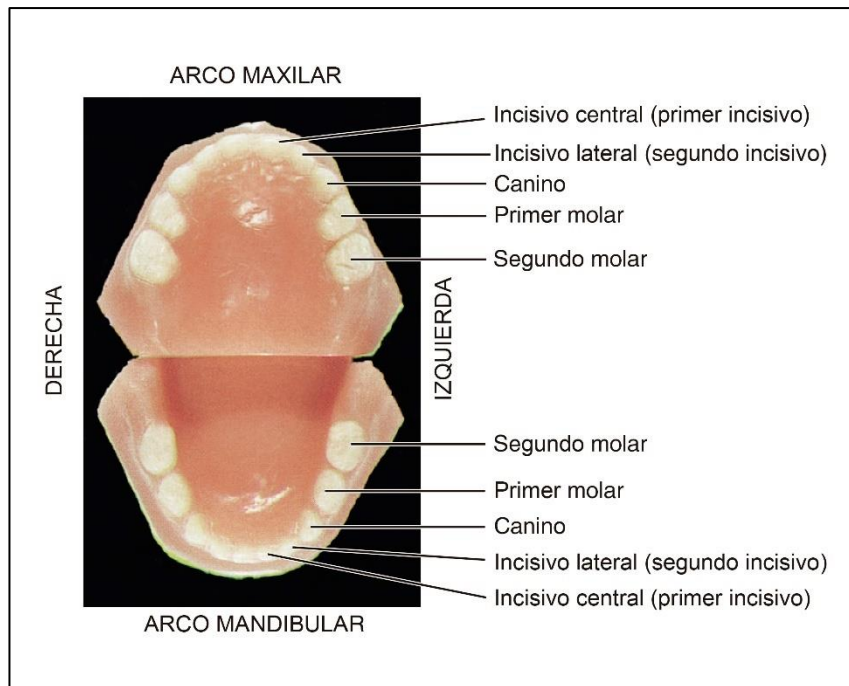
A través de un proceso llamado rizoclasia, los dientes permanentes ejercen presión sobre los primarios provocando la caída de estos últimos, este fenómeno es denominado exfoliación de los dientes de leche y se produce hasta los 12 años, durante este periodo, el sujeto tendrá una dentición mixta.

La dentición primaria consta de 20 dientes, 10 por cada arcada y donde la mineralización finaliza alrededor de los 6 meses después de la erupción. En cada arcada encontramos: dos incisivos centrales, dos incisivos laterales, dos caninos, dos premolares y dos segundos molares (de Ferraris & Muñoz, 2009). En la Figura 1 podemos observar su distribución en el arco maxilar y en el arco mandibular.

En contraposición, los dientes permanentes cuentan con 32 dientes que reemplazan a los primarios a partir de los 6 años, no se completa hasta los 17 o 21 años aproximadamente y su mineralización no acaba hasta los 2 o 3 años posteriores a su erupción (de Ferraris & Muñoz, 2009). En la Figura 2 podemos observar su distribución en el arco maxilar y en el mandibular, distribuidos en igual número de dientes en ambos. En cada arco encontramos: dos incisivos centrales, dos incisivos laterales, dos caninos, dos primeros premolares, dos segundos premolares, dos primeros molares, dos segundos molares y dos terceros molares.

Figura 1

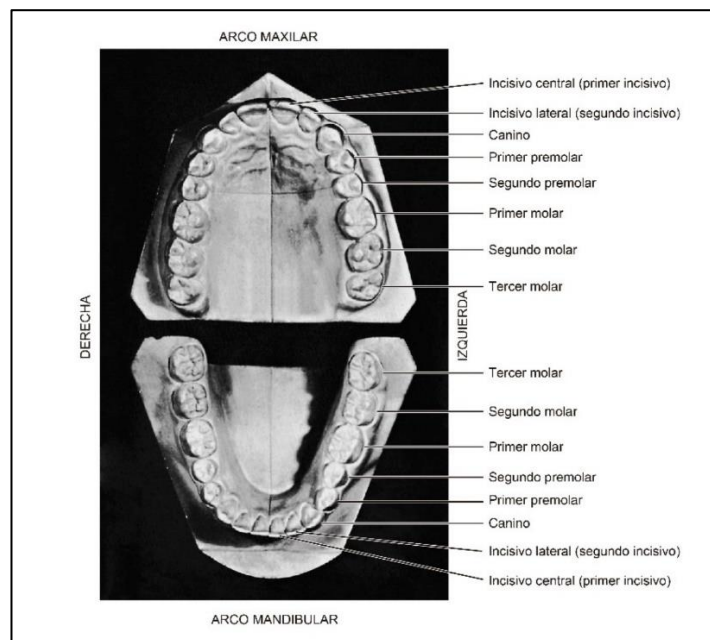
Dentición decidua



Nota. Figura extraída de Nelson (2014) y adaptada al español (p. 3).

Figura 2

Dentición permanente

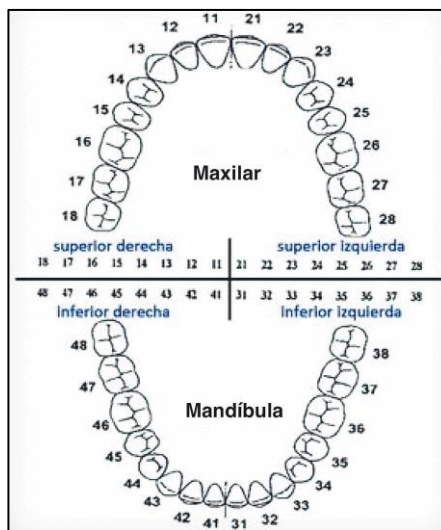


Nota. Figura extraída de Nelson (2014) y adaptada al español (p. 3).

Para representar los diferentes tipos de dientes humanos, tanto primarios como permanentes el método de DÍGITO DOS (Figura 3) es el más usado y aceptado por la Federación Dental Internacional (FDI) desde 1971, que la introdujo como estándar a nivel mundial. El sistema FDI o método de DÍGITO DOS, también es conocido como notación ISO-3950 (Federación Dental Internacional, 2015).

Figura 3

Nomenclatura DÍGITO DOS de una dentición permanente



Nota. Figura extraída de Adriano-Anaya et al. (2015) (p. 257).

Los dientes presentan dos tipos de raíz, los incisivos y caninos son unirradiculares, los premolares y molares son birradiales.

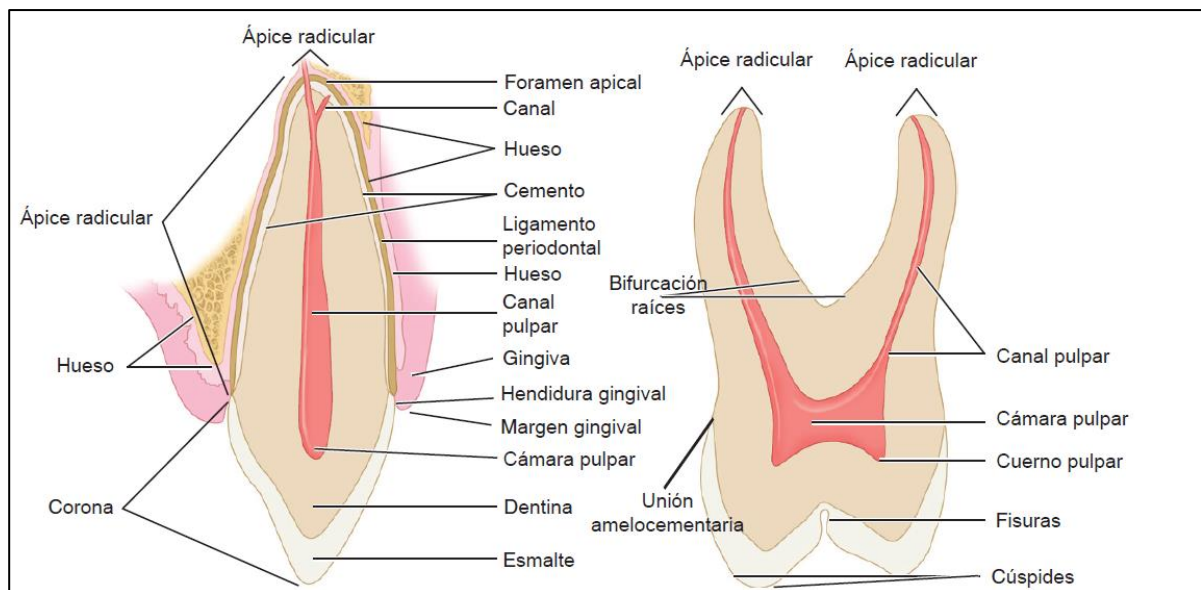
En la Figura 4 se representan de forma esquemática las secciones longitudinales de los dientes anteriores y posteriores.

En ambas denticiones llamamos dientes anteriores a los incisivos centrales y laterales y a los caninos, mientras que los premolares y molares se conocen como dientes posteriores.

Tanto los dientes primarios como los permanentes se forman de la misma manera, salvo que la mineralización de la corona en los dientes primarios comienza intrauterinamente y se completa poco después del nacimiento. En cambio, en los permanentes comienza en el momento del nacimiento, excepto algunas excepciones. Este hecho es de gran importancia, ya que los dientes primarios suelen afectarse por alteraciones sistémicas prenatales, en cambio la mineralización de los permanentes puede afectarse por trastornos postnatales (Chiego, 2014).

Figura 4

Esquema de sección longitudinal de diente anterior y posterior



Nota. Figura extraída de Nelson (2014) y adaptada al español (p. 5).

Según sus propiedades físicas:

La dureza es la resistencia superficial de una sustancia a ser rayada o a sufrir deformaciones, motivadas por presiones. Algunos estudios no observan diferencias significativas entre la dureza de la dentina y del esmalte entre los primarios y los permanentes. Por otra parte, los dientes primarios son más permeables, debido al mayor espesor causado por la mayor amplitud de las cámaras pulpares.

La radioopacidad es ligeramente inferior en los dientes deciduos al de los permanentes, posiblemente por las variaciones del componente mineral. Respecto al color, los primarios presentan un color blanco-azulado o blanco-grisáceo, dicha tonalidad tiene relación con el menor espesor de las estructuras y menor grado de mineralización.

Las diferencias entre la composición química del esmalte, dentina y cemento de los dientes primarios respecto a los permanentes no difieren significativamente, si bien estas desigualdades se deben al distinto grado de mineralización. Los elementos que presentan las mayores concentraciones son el calcio y el fósforo, ya que son los principales componentes de la hidroxiapatita.

El agua que hay en la periferia del cristal constituye la capa de solvatación o de hidratación, que tiene por función facilitar el transporte de iones desde y hacia el cristal de la hidroxiapatita.

Algunos elementos están unidos al componente mineral o a la matriz orgánica desde

su formación, otros son absorbidos por la superficie a lo largo de la vida, mediante la remineralización, relacionándose así con el ambiente en el que se desarrolla el individuo. El fenómeno de la remineralización tiene una relación directa con el grado de permeabilidad del esmalte y ocurre solo en un pequeño espesor de su superficie (de Ferraris & Muñoz, 2009).

1.2.2. Morfogénesis e histogénesis del órgano dentario

Durante la vida prenatal, es la región bucomaxilofacial la primera del organismo que experimenta la maduración del sistema neuromuscular, esto es debido a que la boca tiene relación con diferentes reflejos vitales, tales como la respiración, la succión y la deglución, los cuales deben haberse completado al nacer. Todos estos reflejos se desarrollan entre la semana 14 y la 32 de vida intrauterina. Es alrededor de la sexta semana cuando se produce el primer signo de desarrollo de los órganos dentarios y odontogénesis (de Ferraris & Muñoz, 2009).

El mecanismo de la erupción dentaria comprende una serie de fenómenos mediante el cual el diente que se está formando dentro del maxilar, se traslada, aún incompleto, mediante movimientos desde el lugar en el que se desarrolla a través del hueso y de los tejidos blandos hacia la cavidad bucal, hasta que ocupa su lugar en la arcada dentaria (de Ferraris & Muñoz, 2009).

Podemos distinguir tres etapas, la etapa preeruptiva, donde se completa la formación de la corona y comienza la de la raíz, la prefuncional, donde se forma la raíz y el ligamento periodontal y por último la posteruptiva o funcional, que comprende desde que el diente entra en oclusión hasta la pérdida de este por diferentes causas (de Ferraris & Muñoz, 2009).

La cronología de la erupción dentaria puede verse afectada por varios factores; genéticos, deficiencias nutricionales, pérdida de algún diente primario a causa de traumatismos graves, dientes retenidos o anquilosados, etc. (de Ferraris & Muñoz, 2009).

Los dientes se desarrollan a partir de los brotes epiteliales. Presentan dos capas germinativas, las cuales participan en la formación de los dientes: el epitelio ectodérmico, que origina el esmalte y ectomesénquima que forma los tejidos restantes; el complejo dentinopulpar, cemento, hueso alveolar y ligamento periodontal (de Ferraris & Muñoz, 2009).

Podemos distinguir dos grandes fases: morfogénesis o morfodiferenciación, consiste en el desarrollo y formación de los patrones coronarios y radiculares, y, por otro lado, la histogénesis o citodiferenciación la cual conlleva a la formación de los distintos tipos

de tejidos dentarios: esmalte, dentina y pulpa.

Respecto al desarrollo y formación del patrón coronario, el ciclo vital de los órganos dentarios comprende una serie de modificaciones químicas, morfológicas y funcionales, estas continúan a lo largo de toda la vida del diente.

Los gérmenes dentarios evolucionan en una serie de etapas, aunque realmente es un proceso continuo; una etapa se transforma paulatinamente en la siguiente, pero se divide para su mejor estudio. Estadio de brote macizo o yema dentaria, estadio de casquete, estadio de campana y estadio de folículo dentario, terminal o maduro (de Ferraris & Muñoz, 2009). Cada estadio se define de acuerdo con la forma del órgano del esmalte derivado del ectodermo, que es la parte del diente en desarrollo (Chiego, 2014).

Las células ectodérmicas se transforman en el órgano del esmalte y permanecen unidas a la lámina. La mesénquima forma la papila dental (Chiego, 2014), de donde saldrá la futura dentina y donde la porción central de la papila se transformará en la pulpa dentaria (de Ferraris & Muñoz, 2009).

La elaboración de la matriz orgánica la llevan a cabo los odontoblastos para la dentina y los ameloblastos para el esmalte, inmediatamente es seguida por las fases iniciales de su mineralización. El mecanismo de formación de la corona es el siguiente: primero se depositan unas laminillas de dentina y luego se forma una de esmalte (de Ferraris & Muñoz, 2009).

Una vez formado el patrón de la corona y comenzado el proceso de histogénesis dental mediante los mecanismos de dentinogénesis y amelogénesis, comienza el desarrollo y la formación del patrón radicular (de Ferraris & Muñoz, 2009).

En cuanto a la formación del patrón radicular, la vaina epitelial de Hertwig desempeña un papel fundamental como inductora y modeladora de la raíz del diente (de Ferraris & Muñoz, 2009).

La histogénesis se basa en la citodiferenciación que lleva a la formación de los distintos tipos de tejidos dentarios. La amelogénesis es la histogénesis del esmalte. La formación de la dentina es la dentinogénesis y la formación del periodoncio de inserción es la cementogénesis. Estos tres serían los tejidos duros y la pulpa el blando. La corona está recubierta por el esmalte y la raíz por el cemento. Ambas (corona y raíz) están unidas por la línea cervical, también llamada como unión amelocementaria, que es claramente visible en cada diente (de Ferraris & Muñoz, 2009).

1.2.3. Periodoncio o periodonto

El periodoncio es el conjunto de tejidos que conforman el órgano de sostén y protección del elemento dentinario. Lo podemos dividir en dos: el periodoncio de inserción (o aparato de sostén) formado por el cemento, el ligamento periodontal y el hueso alveolar. El hueso alveolar y el cemento están unidos mediante un tejido conectivo fibroso que es el ligamento periodontal. Por otro lado, tenemos el periodoncio de protección que comprende la encía y la unión dentogingival, que une la encía al diente. Estas estructuras aíslan del medio séptico bucal al periodoncio de inserción (de Ferraris & Muñoz, 2009).

En las enfermedades periodontales se produce la destrucción del periodoncio de inserción y la pérdida del diente.

1.2.4. Esmalte

El esmalte o también llamado tejido adamantino, es una matriz de alto contenido inorgánico y de escaso metabolismo; se forma por la secreción y síntesis de unas células llamadas ameloblastos, este es un proceso complejo en el que intervienen proteínas estructurales y dos proteinasas. Los ameloblastos desaparecen cuando el diente irrumpe en la cavidad bucal, a través de un proceso denominado apoptosis. Por eso el esmalte biológicamente no se puede regenerar, no hay crecimiento ni nueva posición del esmalte después de la erupción (Chiego, 2014).

El esmalte, cubre a la dentina en su parte coronaria ofreciendo protección al tejido conectivo subyacente integrado en el complejo dentino-pulpar.

Es el tejido más duro del organismo ya que está formado por millones de prismas altamente mineralizados, por lo que es el más frágil, presentando una gran tendencia a las macro y micro fracturas. La dureza del esmalte se debe a que es en un 95% matriz inorgánica y la materia orgánica de origen proteico representa entre un 0,36 y un 2%. Los cristales de hidroxiapatita compuestos por fosfato de calcio representan el componente inorgánico del esmalte, estos cristales son 30 veces más grandes que los que forman la hidroxiapatita de la dentina (pequeños y delgados), el tamaño de los cristales explica su extrema dureza (Chiego, 2014). El esmalte posee unas características que hacen de él un tejido único: es de naturaleza ectodérmica (de Ferraris & Muñoz, 2009).

Las células que le dan origen no quedan incorporadas, por lo tanto, el esmalte es, una estructura acelular, avascular y sin inervación. El esmalte frente a una noxa no tiene capacidad de repararse, aunque sí puede darse el fenómeno de remineralización, como hemos comentado anteriormente (de Ferraris & Muñoz, 2009).

1.2.4.1. Propiedades físicas y composición química

La dureza del esmalte corresponde a 5 en la escala de Mohs. El esmalte es translúcido, debido a su alto grado de mineralización, el color varía entre blanco amarillento a un blanco grisáceo, este color depende de las estructuras subyacentes, especialmente de la dentina. A mayor mineralización, mayor translucidez (de Ferraris & Muñoz, 2009).

El esmalte actúa como membrana semipermeable, los diminutos espacios alrededor de los prismas o entre ellos, contribuyen a la microporosidad del esmalte. Disminuyendo esta capacidad conforme aumenta la edad (Chiego, 2014). El esmalte es la estructura más radioopaca del organismo humano debido a su alto grado de mineralización.

El esmalte está constituido químicamente por una matriz orgánica (1-2%), una matriz inorgánica (95%) y agua (3-5%). Respecto a la matriz, el componente orgánico más importante es de naturaleza proteica y constituye un complejo sistema de multiagregados polipeptídicos (de Ferraris & Muñoz, 2009).

Respecto a la matriz inorgánica, está constituida por sales minerales cálcicas de fosfato y carbonato, la fórmula general es $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Dichas sales se depositan en la matriz del esmalte, dan origen rápidamente a un proceso de cristalización que transforma la masa mineral en cristales de hidroxiapatita. Existen también sales minerales de calcio como carbonatos y sulfatos y oligoelementos como potasio, magnesio, hierro, flúor, manganeso, cobre, etc. En la estructura de la hidroxiapatita se pueden ir incorporando otros iones, como puede ser el flúor, sustituyendo a los grupos hidroxilos en el cristal de hidroxiapatita y convertirlo en un cristal de fluorhidroxiapatita que lo vuelve más resistente a la acción de los ácidos, ya que los hace menos solubles a estos, y, por tanto, más resistente a la caries, debido a que hace los cristales más pequeños y aumenta su velocidad de remineralización. Se dice que la sustitución óptima es cuando el flúor reemplaza uno de cada 40 iones de OH^- (de Ferraris & Muñoz, 2009).

Este hecho se fundamenta en la propiedad física de la semiimpermeabilidad del esmalte, mayor en los primarios que en los permanentes, por lo que su velocidad de difusión es mayor en dientes jóvenes. Esta propiedad permite un intercambio iónico entre el esmalte y la saliva. Los cristales de sales minerales en el esmalte son más voluminosos que los existentes en la dentina y el tejido óseo (de Ferraris & Muñoz, 2009).

El flúor y los carbonatos, desde el punto de vista clínico, son muy importantes debido a que desempeñan un papel antagónico respecto a la caries, el flúor aumenta la resistencia a los ácidos en cambio los carbonatos hacen al diente más susceptible a las caries. El agua es el tercer componente de la composición del esmalte. Por debajo y más hacia el interior, en el cristal, se ubica la denominada capa de iones y compuestos adsorbidos, en la que

cación Ca^{2+} puede ser sustituido por Na^+ , Mg^{2+} e H_3O^+ y el anión OH^- por F^- , Cl^- ... El porcentaje de agua en el esmalte disminuye progresivamente con la edad (de Ferraris & Muñoz, 2009).

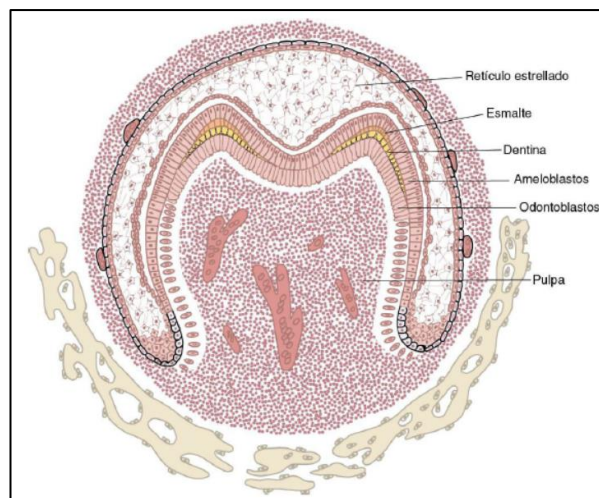
1.2.4.2. Histofisiología del esmalte y amelogénesis

Los prismas es la unidad estructural básica del esmalte, son estructuras compuestas por cristales de hidroxiapatita. El esmalte prismático está formado por el conjunto de prismas que constituye la mayor parte de esta matriz extracelular mineralizada. Por otro lado existe el denominado esmalte aprismático, en la conexión amelodentinaria (CAD) y en la periferia de la corona, en que la sustancia adamantina mineralizada no constituye ni configura prismas.

La amelogénesis es el mecanismo de formación del esmalte (Figura 5). Los ameloblastos inician el depósito del esmalte después de haber acumulado unas pocas micras de dentina, estableciendo la unión amelodentinaria (Chiego, 2014). Comprende dos etapas: la primera de elaboración de una matriz orgánica extracelular y una segunda de mineralización casi inmediata de la misma. Los ameloblastos son las células formadoras del esmalte, son la unidad funcional, debido a que es la única célula responsable de la secreción de la matriz orgánica del esmalte.

La secreción del ameloblasto no se realiza de forma continua, sino que es rítmica. La materia orgánica sufre cambios en su desarrollo. El esmalte recién formado es un material relativamente blando, conforme va madurando aumenta el contenido inorgánico, la mayor parte del componente orgánico se va degradando y eliminando al igual que el agua también se va perdiendo, alcanzando finalmente una dureza como la de la apatita, el contenido de materia inorgánica final es del 95%.

La función biológica fundamental del esmalte es servir de soporte y estructura donde se ejercen las fuerzas de masticación. El proceso de envejecimiento en el esmalte se caracteriza por el desgaste progresivo de las zonas más sometidas a masticación. Durante el envejecimiento se van produciendo diferentes cambios, como en la composición química, también existe una menor incidencia de la caries unida a una remineralización continua (de Ferraris & Muñoz, 2009).

Figura 5*Esquema de la amelogénesis*

Nota. Figura extraída Chiego (2014) (fig. 5.13).

1.2.4.3. Patología y consideraciones clínicas

El esmalte por su alto contenido inorgánico es particularmente vulnerable a la desmineralización provocada por los ácidos elaborados a partir de los carbohidratos, por las bacterias que existen en la placa bacteriana. El resultado es la caries dental, la mayor parte de la desmineralización se produce por debajo de la superficie del esmalte, por lo que existe un cierto tiempo, en el que por encima permanece una capa superficial que está bien mineralizada. De ahí la importancia de eliminar la placa adherida a la superficie libre del esmalte con un cepillado correcto, para prevenir el inicio de la caries (de Ferraris & Muñoz, 2009).

1.2.5. Complejo dentino-pulpar

El complejo dentino pulpar es una verdadera unidad biológica que conforman estructural, embriológica y funcionalmente el tejido pulpar y dentinario. La pulpa mantiene la vitalidad de la dentina y la dentina protege la pulpa.

Ambos tejidos, tienen su origen embriológico en la papila dentinaria (tejido ectomesenquimático). Por todo ello se considera como un tejido biológico único, una sola estructura integrada, pero de características histológicas diferentes por lo que se describe por separado (de Ferraris & Muñoz, 2009).

1.2.6. Pulpa

La pulpa dentaria es el tejido conectivo blando y laxo localizado en la parte central de cada diente. La cavidad contenida dentro de la corona es la cámara pulpar y aloja la pulpa coronaria. Esta cavidad puede dividirse en porción coronal y porción radicular, siendo esta la que aloja la pulpa radicular. La pulpa coronal es más extensa y contiene más elementos que la radicular, que actúa como un tubo de conducción para transportar sangre hacia y desde el área coronal por el conducto apical.

En la zona de la corona encontramos los cuernos pulpares, los cuales se dirigen hacia las cúspides. Dependiendo del tipo de diente pueden salir 2 o 3 conductos, los cuales penetran en las raíces (de Ferraris & Muñoz, 2009; Chiego, 2014).

1.2.6.1. Componentes estructurales

La pulpa es un tejido conectivo especializado, contiene nervios, vasos sanguíneos de pared delgada y terminaciones nerviosas encerradas dentro de la dentina (Chiego, 2014).

Está formada por un 75% de agua y por un 25% de materia orgánica, esta última constituida por células y matriz extracelular, representada por sustancia fundamental y fibras (de Ferraris & Muñoz, 2009).

Las poblaciones celulares de la pulpa son las siguientes: odontoblastos, fibroblastos, células ectomesenquimáticas o células madre de pulpa dental, macrófagos, células dendríticas y otras células. También encontramos fibras colágenas, reticulares, elásticas y de oxitalán y sustancia fundamental o matriz extracelular amorfa, constituida por proteoglicanos y agua (de Ferraris & Muñoz, 2009; Chiego, 2014).

Las células predominantes son los fibroblastos; secretan distintos tipos de fibras y sustancia fundamental. En la pulpa adulta se transforman en fibrocitos. Son multifuncionales, forman y degradan el colágeno y también forman, mantienen y regulan el recambio de la matriz extracelular, fibrilar y amorfa (Chiego, 2014).

Los odontoblastos son los segundos más frecuentes, pertenecen tanto a la dentina como a la pulpa y forman dentina durante toda la vida, lo que acaba provocando con el tiempo un menor crecimiento de la pulpa, por lo que disminuye la capacidad de la pulpa para responder a las lesiones y autorrepararse (Chiego, 2014).

Las fibras de colágeno están constituidas por colágeno tipo I, el cual representa un 60% aproximadamente del colágeno pulpar. La densidad y el diámetro de las fibras aumentan con la edad.

Las fibras reticulares están formadas por delgadas fibrillas de colágeno tipo III asociadas a fibronectina. El fibroblasto sintetiza ambos tipos de colágeno I y III. Estas fibras también aumentan de diámetro con la edad, pero en menor proporción que lo hacen las fibras colágenas. En el adulto, el colágeno tipo III será sustituido por el tipo I, por lo que estas fibras también se pueden llamar fibras precolágenas (de Ferraris & Muñoz, 2009).

1.2.6.2. Histofisiología pulpar: Actividades funcionales y modificaciones con la edad

La pulpa presenta las siguientes actividades funcionales: inductora, protectora, formativa, nutritiva, y defensiva o reparativa (mediante la formación de dentina reactiva o reparativa). Todas estas características son importantes para la producción y el mantenimiento de la dentición. La pulpa puede regresar después de un traumatismo o con la edad (Chiego, 2014).

El mecanismo inductor del complejo dentino-pulpar se pone de manifiesto durante la amelogénesis, ya que para que se produzca la síntesis y el depósito del esmalte es necesario el depósito de dentina. La pulpa tiene como función esencial formar dentina, esto se produce mientras dura su vitalidad. La pulpa nutre la dentina a través de las prolongaciones odontoblásticas y de los metabolitos. La pulpa mediante los nervios sensitivos responde, ante los diferentes estímulos o agresiones, con dolor dentinario o pulpar (de Ferraris & Muñoz, 2009).

Distinguimos entre el dolor dentinal que es agudo y de corta duración, y el dolor pulpar que es sordo y pulsátil, persistiendo durante cierto tiempo. El tejido pulpar tiene una capacidad reparativa, formando dentina ante las agresiones. Y la formación de dentina terciaria, elaborada por los nuevos odontoblastos que se originan de las células ectomesenquimáticas o células madre de la pulpa (de Ferraris & Muñoz, 2009).

El tejido y la cavidad pulpares experimentan variaciones estructurales y funcionales en relación con la edad. Se produce, por tanto, una disminución en la capacidad de respuesta biológica al avanzar la edad. Una disminución de la irrigación e inervación y también la disminución gradual de la población celular del tejido conectivo pulpar. No obstante, la capacidad de autodefensa o de regeneración del tejido, aparte de la edad biológica, depende también del estado general de salud del organismo y cómo sea el daño tisular (de Ferraris & Muñoz, 2009).

1.2.7. Dentina

La dentina o también llamada sustancia ebúrnea o marfil, es el eje estructural del diente y constituye el tejido mineralizado que conforma la mayor parte del volumen de este (de Ferraris & Muñoz, 2009). Está formada por apatito y colágeno (Martínez-Ojeda et al., 2020). Es un tejido vivo y sensible no expuesto habitualmente al ambiente bucal (Chiego, 2014).

El espesor de la dentina varía según el diente. El espesor de esta es mayor en los dientes de mayor edad respecto a dientes jóvenes, debido al crecimiento aposicional que presenta la dentina secundaria (de Ferraris & Muñoz, 2009).

En la dentina distinguimos dos componentes básicos: la matriz mineralizada y los conductos o túbulos dentinarios y que alojan a los procesos odontoblásticos. Los odontoblastos participan tanto en la producción de la matriz de colágeno como en el proceso de calcificación de la dentina, por lo que son responsables de la formación y del mantenimiento de esta. Los odontoblastos se encuentran separados de la dentina mineralizada por una zona de matriz orgánica que no está mineralizada, la predentina.

Los túbulos son los responsables de la hidratación de los dientes y la transmisión física de las señales (Martínez-Ojeda et al., 2020). Los túbulos de la dentina tienen aproximadamente entre 0,8-2,5 mm de diámetro interno, están rellenos por el fluido citoplasmático de los odontoblastos. La matriz peritubular (PTD) está formada por finos cilindros mineralizados, esta posee una cantidad mucho más pequeña de colágeno, alrededor del 10% está presente aquí. La matriz fuera de estos cilindros peritubulares es la dentina intertubular (ITD) un 30% de su volumen está formado por las fibras de colágeno mineralizado tipo I (Elbaum et al., 2007).

1.2.7.1. Propiedades físicas y composición química

La dentina presenta un color blanco amarillento, pero puede variar de una persona a otra y también a lo largo de la vida de un individuo. Si la pulpa se extrae, los dientes presentarán un color grisáceo. Con la edad, la dentina se vuelve poco a poco amarillenta (de Ferraris & Muñoz, 2009).

La dentina se deposita mediante crecimiento aposicional y produce líneas de incremento, al igual que el hueso, pero a diferencia de este, la dentina no se remodela (Chiego, 2014).

El grado de mineralización también determina la dureza, la dentina presenta una dureza mucho menor que la del esmalte y es algo mayor respecto al hueso y el cemento. La radioopacidad también depende del contenido mineral, y resulta menor a la de esmalte

y ligeramente superior a la del hueso y cemento. La presencia de elasticidad en la dentina es debido a las fibras de colágeno que existe en su seno y al agua que contiene, esta propiedad permite compensar la rigidez que presenta el esmalte, amortiguando los impactos masticatorios. La permeabilidad de la dentina es mayor que la del esmalte debido a la presencia de túbulos dentinarios, que permite el paso a distintos elementos o solutos (de Ferraris & Muñoz, 2009; Chiego, 2014).

La composición química de la dentina es la siguiente: aproximadamente un 70% de materia inorgánica (principalmente cristales de hidroxiapatita), 18% de materia orgánica (principalmente fibras de colágeno) y 12% de agua. Es un tejido dinámico, es decir, metabólicamente activo, al contrario que el esmalte. Por tanto, permite que se forme tejido dentinario durante toda la vida y que pueda repararse cuando sufre algún daño (formación de dentina reparativa) (de Ferraris & Muñoz, 2009).

La matriz orgánica está constituida principalmente por colágeno tipo I que es sintetizado por los odontoblastos y representa el 90% de dicha matriz. Los colágenos tipo III, IV, V, VI se han observado en pequeñas proporciones y diferentes circunstancias (de Ferraris & Muñoz, 2009).

Además de los cristales de hidroxiapatita hay cierta cantidad de fosfatos amorfos, sulfatos, carbonatos y elementos traza, como flúor, cobre, zinc, hierro, magnesio, etc. Existe también un reservorio de calcio en la matriz orgánica para la formación de hidroxiapatita (de Ferraris & Muñoz, 2009).

1.2.7.2. Estructura histológica de la dentina

Está constituida por unidades estructurales básicas y secundarias. Estructuras básicas: túbulos dentinarios, dentina intratubular o peritubular, la matriz intertubular o dentina intertubular. Unidades estructurales secundarias: líneas incrementales o de crecimiento, dentina interglobular o espacios de Czermack, zona granulosa de Tomes, líneas o bandas dentinarias de Schreger y la conexión amelodentinaria y cementodentinaria.

1.2.7.2.1. Unidades estructurales básicas y secundarias

Respecto a las unidades estructurales básicas, tenemos los túbulos o conductillos dentinarios que son estructuras cilíndricas delgadas que se extienden por todo el espesor de la dentina desde la pulpa hasta la unión amelodentinaria o cementodentinaria. Los túbulos alojan en su interior el proceso odontoblástico (de Ferraris & Muñoz, 2009).

La dentina intratubular o peritubular es la matriz dentinaria que rodea

inmediatamente el túbulo dentinario. La dentina peritubular se encuentra en los túbulos a lo largo de la dentina, excepto en las inmediaciones de la pulpa (Chiego, 2014).

En cuanto a la otra unidad básica, la matriz intertubular o dentina intertubular, se distribuye entre las paredes de los túbulos dentinarios y las fibras colágenas, que es su componente fundamental y constituyen una malla de fibras sobre la cual se van depositando los cristales de hidroxiapatita similares a los que existen en la dentina intratubular. Está compuesta del mismo tipo de fibras de la materia orgánica que la dentina intratubular, sin embargo, esta se encuentra algo menos calcificada (de Ferraris & Muñoz, 2009; Chiego, 2014).

En cuanto a las unidades estructurales secundarias, las cuales se originan a partir de las unidades estructurales básicas, tenemos: líneas incrementales o de crecimiento, espacios de Czermack, zona granulosa de Tomes, líneas o bandas dentinarias de Schreger, conexión amelodentinaria y cementodentinaria.

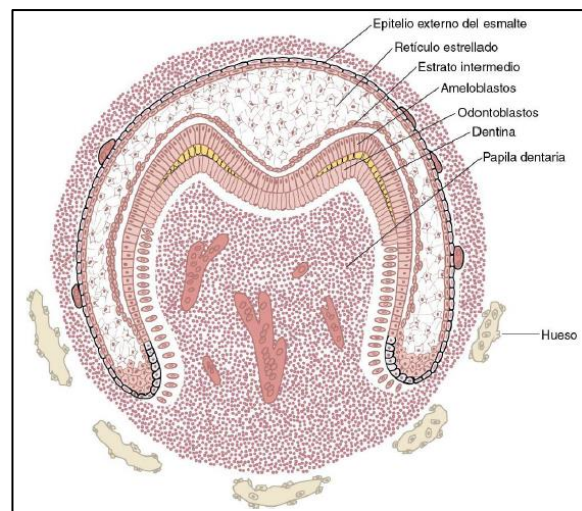
Dentro de las líneas incrementales o de crecimiento hay dos tipos de líneas incrementales por aposición, al igual que el hueso: las líneas de Von Ebner o de imbricación y las líneas de Owen o de contorno. En la formación de la dentina se van alternando periodos de formación y de descanso, por tanto, no es un proceso continuo sino es rítmico. Los espacios de Czermack, se originan por un defecto de mineralización de la dentina debido a la fusión de calcosferitos (núcleos de cristalización globulares).

1.2.7.3. Dentinogénesis

La dentinogénesis (Figura 6) es el conjunto de mecanismos por el cual la papila dental elabora una matriz orgánica por medio de los odontoblastos, que posteriormente se calcifica para formar la dentina y en el que incluye la formación de la dentina del manto, la dentina circumpular y la dentina radicular (de Ferraris & Muñoz, 2009).

Podemos distinguir cuatro etapas en el ciclo vital de los odontoblastos: las células mesenquimáticas indiferenciadas, preodontoblastos, odontoblastos jóvenes y odontoblastos secretores.

Desde el punto de vista de su formación en los dientes humanos conocemos tres tipos de dentina: la primaria, la secundaria y la dentina terciaria que se produce como respuesta a una agresión.

Figura 6*Esquema de la dentinogénesis*

Nota. Figura extraída de Chiego (2014) (p. 65).

1.2.7.3.1. Dentina primaria

La dentina primaria (Figura 7) es la primera que se forma y representa la mayor parte del volumen de esta, delimita la cámara de la pulpa en los dientes ya formados. Dependiendo del momento en que se forme y por la disposición de las fibras, podemos distinguir entre dentina del manto y circumpulpar:

La dentina del manto o palial, es la primera que se forma, se encuentra por debajo del esmalte y el cemento. Presenta un alto número de túbulos y abundante sustancia fundamental y se encuentra menos calcificada que la circumpulpar. La matriz orgánica está formada por fibras colágenas.

La dentina circumpulpar se comienza a depositar una vez que se forma la dentina del manto, forma el mayor volumen de dentina, se extiende desde la zona del manto hasta la predentina y presenta las características histológicas típicas de la dentina en general.

La predentina (Figura 8) es una capa de dentina sin mineralizar, situada entre los odontoblastos de la pulpa y la dentina circumpulpar. La primera capa de matriz extracelular formada por los odontoblastos es la predentina, a medida que esta se va calcificando, tarda unas 24 horas, se va formando nueva predentina. Su presencia es muy importante ya que es una fuente de producción continua de dentina (de Ferraris & Muñoz, 2009; Chiego, 2014).

Figura 7

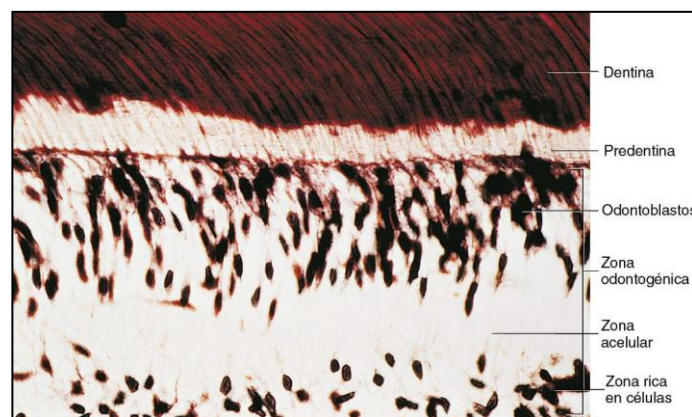
Dentina primaria (izquierda) y dentina secundaria (derecha)



Nota. Figura extraída de Chiego (2014) (p. 104).

Figura 8

Microfotografía de la predentina que bordea la pulpa con dentina en la parte superior



Nota. Figura extraída de Chiego (2014) (p. 105).

1.2.7.3.2. Dentina secundaria

La dentina secundaria (Figura 7) o también llamada dentina adventicia, regular o fisiológica, es la dentina que se produce después de la completa formación de la raíz del diente. Esta dentina es depositada mucho más lentamente que la primaria, pero su producción continúa durante toda la vida del diente.

La dentina secundaria se forma por toda la periferia de la cámara pulpar, por dentro de la circumpulpar.

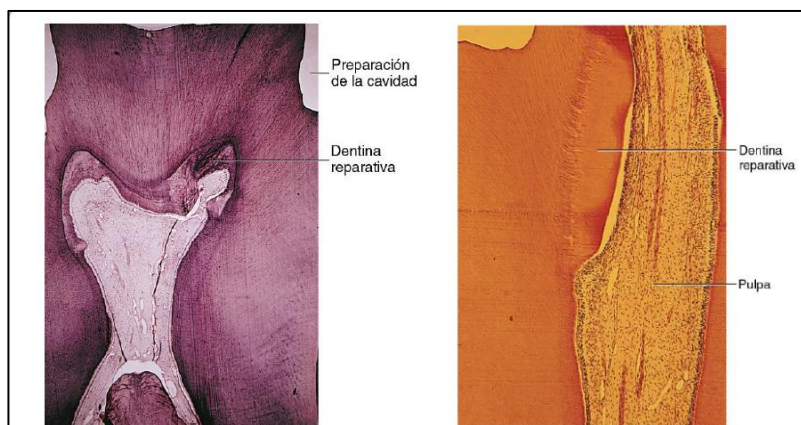
1.2.7.3.3. Dentina terciaria

La dentina terciaria también es conocida como dentina de respuesta, reparativa (Figura 9). En la terminología actual, podemos distinguir entre reactiva o de respuesta, cuando los odontoblastos originales realizan la función de depósito y el de reparativa cuando los odontoblastos que han sido reclutados recientemente inician el depósito de dentina (Chiego, 2014). La dentina terciaria, se forma únicamente en los sitios donde existe una noxa o estímulo localizado, es la dentina más interna y deforma la cámara pulpar. Los odontoblastos que están directamente implicados por el estímulo externo son los encargados de producir esta dentina, de manera que sea posible aislar la pulpa de la zona afectada (de Ferraris & Muñoz, 2009).

La duración e intensidad del estímulo determinará la cantidad y calidad de la dentina terciaria producida. Si se forma lentamente debido a menos estímulos, es más regular, semejante a la primaria y secundaria y cuanto mayor es el daño, más rápida e irregular será la deposición de dentina reparativa (de Ferraris & Muñoz, 2009; Chiego, 2014). La formación de esta dentina, como hemos dicho, ofrece una protección pulpar de acuerdo con su espesor, aun así, la pulpa subyacente puede inflamarse (de Ferraris & Muñoz, 2009).

Figura 9

Dentina reparativa



Nota. Figuras extraídas de Chiego (2014) (p. 126 y p. 104).

1.2.7.4. Histofisiología

La dentina se considera un tejido vivo, por tener incluida las prolongaciones citoplasmáticas de los odontoblastos funcionales y por el licor dentinario que la nutre. Mientras dure la vitalidad de la pulpa, es decir durante toda la vida del diente, se producirá el depósito de los distintos tipos de dentina. La vitalidad de la pulpa decrece con la edad y

los túbulos dentinarios disminuyen progresivamente su diámetro, debido al continuo depósito de la dentina peritubular y por la aposición de los cristales de hidroxiapatita (de Ferraris & Muñoz, 2009).

1.2.7.4.1. Actividad mecánica

La dureza y la elasticidad son dos propiedades físicas esenciales imprescindibles para mantener la función mecánica del diente, lo adquiere debido a la composición química y estructura histológica de la dentina. Por tanto, se considera la dentina como el eje estructural del diente sobre el que se estructuran el resto de los tejidos duros (de Ferraris & Muñoz, 2009).

1.2.7.4.2. Actividad defensiva

Respecto a la actividad defensiva, la dentina responde defendiéndose antes las distintas agresiones que actúan sobre ella, formando además de dentina terciaria, dentina transparente o esclerótica y dentina opaca o tractos desvitalizados:

Los estímulos nocivos, además de provocar la aparición de dentina terciaria, pueden inducir a cambios en la morfología de los túbulos de la dentina primaria y secundaria. Esta dentina, llamada transparente o esclerótica hace alusión a cuando la dentina presenta túbulos ocluidos con mineral, este proceso aumenta con la edad (Chiego, 2014). La permeabilidad de la dentina dependerá entre otros factores de la composición de los tejidos duros del diente, de la edad del tejido pulpar, el contenido en fluoruros, la higiene oral, la saliva y la dieta (de Ferraris & Muñoz, 2009).

La dentina opaca o tractos desvitalizados o muertos, se forma cuando los odontoblastos se defienden de una lesión relativamente intensa y estos retraen sus prolongaciones (de Ferraris & Muñoz, 2009).

Tanto la dentina translúcida como la dentina opaca son consideradas “dentinias de remineralización”. Ambas dentinas son menos permeables y más resistentes que la normal, por lo que le confiere una mayor protección en casos de filtración o invasión bacteriana (de Ferraris & Muñoz, 2009).

1.2.7.4.3. Actividad sensitiva

Respecto a su actividad sensitiva, la dentina es un tejido muy sensible y los estímulos externos recibidos por las terminaciones nerviosas de la pulpa producen siempre una sensación de dolor. La propagación del estímulo nervioso se encuentra en estrecha

relación con la estructura de la dentina, pero actualmente no se conoce totalmente la forma en que se transmiten los impulsos (de Ferraris & Muñoz, 2009).

1.2.7.5. Patología y consideraciones clínicas

Las modificaciones que afectan a la formación de la dentina son fundamentalmente de origen genético y se clasifican en dos grandes grupos: dentinogénesis imperfecta (DI) y displasia dentinaria (DD), siendo esta última menos frecuente. En relación con las alteraciones patológicas. La caries dental, afecta tanto a la dentina como al esmalte, la caries resulta fundamentalmente de la desmineralización ácida del componente mineral que posee la matriz dentinaria al que posteriormente sigue la degradación del componente orgánico. La alta permeabilidad que posee la dentina es clave en el proceso de extensión de la caries (de Ferraris & Muñoz, 2009).

El diente puede considerarse como un registro perfecto para la evaluación retrospectiva del estado de salud en un paciente determinado, ya que cuando existen enfermedades febriles de larga duración o periodos de nutrición inadecuada, queda marcado como líneas de contorno acentuadas, o en mayor número, tanto en la dentina como en el esmalte (de Ferraris & Muñoz, 2009).

1.3. Elementos Químicos

El término oligoelemento o elemento traza se refiere a los elementos químicos que en muy pequeñas cantidades son indispensables para las funciones fisiológicas (Real Academia Española, s.f.). Desde el punto de vista de la química analítica, es un elemento que presenta una concentración media de <100 partes por millón o <100 partes por billón. En bioquímica, un oligoelemento es un mineral alimenticio que se necesita en cantidades muy pequeñas pero es imprescindible para el crecimiento, desarrollo y la fisiología del organismo (Al-Fartusie & Mohssan, 2017) y representan solo el 0,02% del peso corporal total (Prashanth et al., 2015).

Los elementos traza esenciales desempeñan numerosas funciones imprescindibles en el cuerpo humano. El inicio del conocimiento sobre su papel en los humanos se remonta a hace unos 100 años; en 1908 en la reunión de la *Texas Dental Society* en El Paso (EE. UU.), donde se tiene constancia del inicio de las investigaciones sobre la influencia de la presencia de los elementos traza en enfermedades dentales (Prashanth et al., 2015). Las principales funciones que presentan son como cofactores de algunas enzimas que participan en el metabolismo y el crecimiento celular, la mayoría implicadas en el metabolismo de las proteínas, los carbohidratos y los lípidos. Algunos elementos donan o

aceptan electrones en las reacciones redox. Otros tienen importantes acciones en procesos biológicos y son los responsables de la estabilidad de importantes moléculas biológicas. También son imprescindibles para el crecimiento y desarrollo de la función muscular y nerviosa y síntesis de algunas hormonas y tejido conectivo. Los elementos traza esenciales, aunque son imprescindibles en nuestro cuerpo, en niveles excesivos pueden llegar a ser tóxicos para nuestra salud (Al-Fartusie & Mohssan, 2017), y en niveles deficientes pueden causar enfermedades (Prashanth et al., 2015).

Cualquier sustancia que tiene un efecto de detrimento en el medio ambiente y perjudica la calidad de vida puede considerarse como un contaminante. Y por tanto, cualquier sustancia de este tipo que esté presente en el ambiente, más allá de un cierto límite puede tener efectos graves y duraderos en la salud humana (Zahra & Kalim, 2017).

El término biotoxicidad se aplica a los efectos adversos de los metales pesados en el cuerpo humano cuando se acumulan por encima de los niveles apropiados. Su almacenamiento puede tener una amplia variedad de efectos tóxicos, tanto neurotóxicos como cancerígenos, mutagénicos o teratogénicos. A pesar de la conciencia que existe en la actualidad a sus efectos nocivos, la exposición a metales pesados continúa existiendo, particularmente en países menos desarrollados, ya que son numerosas las actividades realizadas por el hombre las responsables del incremento de la concentración de los metales pesados en el medio ambiente (Zahra & Kalim, 2017).

Se ha demostrado la correlación entre el contenido de los elementos traza en el cuerpo humano y muchas enfermedades comunes, entre ellas el cáncer. Por lo que, estudios en mayor profundidad sobre la relación con el cáncer permitirá comprender la etiopatogenia del cáncer y llegar a ofrecer un diagnóstico más rápido y conseguir desarrollar tratamientos eficaces (Al-Fartusie & Mohssan, 2017). Es importante saber cómo el cuerpo absorbe una sustancia, la utiliza y si la libera y cómo (Mahurpawar, 2015).

Calcio. Es un elemento alcalinotérreo de la tabla periódica, de aspecto sólido blanco, de número atómico 20 y símbolo Ca, que en disolución forma cationes divalentes. Es el mineral más abundante en el cuerpo humano, se encuentra mayoritariamente en huesos y dientes, es esencial también para la contracción de los músculos, la función del sistema nervioso, sangre, secreción de hormonas y enzimas (Antoine et al., 2012).

El calcio es el componente principal junto al fósforo, de la fase inorgánica de los huesos y los dientes: la hidroxiapatita (de Ferraris & Muñoz, 2009). Una ingesta adecuada de calcio es fundamental para la salud de los huesos y de los dientes (Heaney, 2006).

Fósforo. El fósforo es un elemento perteneciente al grupo 15 de la tabla periódica, de número atómico 15 y símbolo P. Se encuentra omnipresente en la naturaleza y es el segundo mineral más abundante en el cuerpo humano, el fósforo representa aproximadamente el 1% del peso corporal total. Con una distribución tanto extracelular como intracelular, el fósforo funciona como un componente estructural de los huesos y dientes y del ADN/ARN permitiendo la bipolaridad de las membranas lipídicas y las lipoproteínas circulantes (Calvo & Lamberg-Allardt, 2015).

Metabólicamente, el fósforo es imprescindible en multitud de mecanismos del organismo, como en la producción y almacenamiento de energía en enlaces fosfato (ATP), regulador de la transcripción genética, regulador el pH sanguíneo, en la activación de la catálisis enzimática y permitiendo la transducción de señales de vías reguladoras que afectan a una variedad de funciones orgánicas que van desde la excreción renal hasta la respuesta inmune (Calvo & Lamberg-Allardt, 2015).

Magnesio. El magnesio es un elemento químico con símbolo Mg y número atómico 12, es el noveno elemento más abundante del universo, el octavo mineral más predominante en la tierra y el cuarto mineral más abundante en el cuerpo humano. Es necesario en más de 300 sistemas enzimáticos que regulan diferentes reacciones bioquímicas en el cuerpo, tales como síntesis de proteínas, la función muscular y nerviosa, el control de la glucosa en la sangre y la regulación de la presión arterial (Al-Fartusie & Mohssan, 2017).

Los efectos del magnesio en el cuerpo son similares a los del calcio (Watts, 1990). El déficit de magnesio es poco común, puede ocurrir principalmente debido a la baja ingestión de alimentos o en persona con problemas con el alcohol. Los síntomas son pérdida de apetito, náuseas, fatiga, hormigueo, latidos rápidos del corazón y delirios, entre otros. Y una deficiencia severa de magnesio puede resultar en hipocalcemia (bajos niveles séricos de calcio) o hipopotasemia (bajos niveles séricos de potasio) (Al-Fartusie & Mohssan, 2017).

Sodio. El sodio es un elemento alcalino, de símbolo Na y de número atómico 11 perteneciente a la tabla periódica.

Es un elemento esencial, el cual juega un papel crucial en el mantenimiento de la distribución de agua adecuada en los seres humanos, al igual que regula la presión osmótica en el comportamiento de líquido extracelular. Es el principal catión de los fluidos extracelulares (McCaughey & Scott, 1998).

Azufre. El azufre, es un elemento químico de símbolo S y número atómico 16, perteneciente al grupo 16 de la tabla periódica. Está presente en los suelos procedentes de minerales con contenido en azufre y de suelos con un rico sustrato de residuos de animales y plantas. El azufre entra en los sistemas biológicos a través de la actividad microbiana, la cual implica la mineralización, inmovilización, oxidación y reducción de la materia orgánica (Prasad & Shivay, 2018).

Es un macronutriente esencial para los microorganismos, las plantas, los animales y los seres humanos. En las proteínas se almacenan la mayor parte del azufre, algunos aminoácidos como la cisteína y la metionina son las principales vías de entrada a nuestro cuerpo, ya sea directamente o a través de la ingesta de plantas o animales. La deficiencia de azufre puede provocar tendinitis, artritis, rigidez muscular, fibrosis, esclerosis, entre otros. El azufre está involucrado en la formación de colágeno y queratina. Por lo que una deficiencia puede provocar problemas en el cabello, la piel y las uñas (Prasad & Shivay, 2018).

Potasio. El potasio es un elemento alcalino, de símbolo K y número atómico 19 de la tabla periódica de los elementos.

El contenido de potasio corporal total y la distribución adecuada de potasio a través de la membrana celular es de gran importancia para la función celular normal. La homeostasis del potasio se mantiene mediante varios métodos diferentes (Palmer & Clegg, 2016).

Estroncio. El estroncio es un elemento químico con número atómico 38, perteneciente al grupo 2 de la tabla periódica, que fue descubierto en minas de plomo. Los alimentos son la principal fuente de absorción de Sr para los seres humanos (Pilmann et al., 2017).

La mayor parte se absorbe en huesos y dientes, demostrando así su excelente capacidad de unión con la fase mineral del hueso, la hidroxiapatita biológica (CaHAP), lo que hizo que este catión divalente fuera interesante para la aplicación en medicina (Pilmann et al., 2017).

La mayoría de los estudios sugieren que el Sr exhibe algunas propiedades cariostáticas, predominantemente en presencia de fluoruro. Se ha propuesto una concentración óptima de Sr de 5 a 10 ppm en el agua potable como resultado directo de varios estudios epidemiológicos de caries (Enomoto et al., 2012; Lippert & Hara, 2013).

El ranelato de estroncio actúa como agente de acción dual: aumenta

simultáneamente la diferenciación de osteoblastos mientras se inhibe la formación de osteoclastos (Pilmane et al., 2017).

Zinc. Es un elemento químico de símbolo Zn y número atómico 30, es el primer elemento del grupo 12 de la tabla periódica.

El zinc es un elemento traza esencial, presente en el cuerpo humano, en nuestros huesos y músculos se encuentra el 90% del zinc presente en el cuerpo (Zahra & Kalim, 2017).

El zinc funciona como cofactor de ciertas enzimas implicadas en el metabolismo y el crecimiento celular, se encuentra en casi 300 enzimas específicas. Es imprescindible en la proliferación, diferenciación y actividad metabólica de las células (Prashanth et al., 2015), en el metabolismo del aparato reproductor y en la función hepática (Al-Fartusie & Mohssan, 2017). También se ha observado que es muy importante en la espermatogénesis, para el adecuado funcionamiento de los neurotransmisores y para el sentido del gusto (Prashanth et al., 2015).

La deficiencia de zinc puede deberse a una ingesta alimentaria insuficiente, esta deficiencia se puede observar en muchos países en desarrollo. Está clasificada como el quinto factor de riesgo más importante que puede causar enfermedades en niños y por tanto a la muerte (Al-Fartusie & Mohssan, 2017). Una deficiencia en zinc se ha asociado con síntomas neurológicos tales como la depresión, el nerviosismo y el mal humor, defectos en la memoria (Watts, 1990). Otros síntomas son la función cardíaca anormal, el aumento de colesterol en plasma, y la anemia (Zahra & Kalim, 2017). También puede producir pérdida de cabello, retraso en la maduración sexual, lesiones en ojos y piel, pérdida de peso, entre otras patologías (Al-Fartusie & Mohssan, 2017).

Son numerosos los estudios que asocian una deficiencia de zinc a la diabetes (Zahra & Kalim, 2017). Por otro lado, la toxicidad oral aguda produce somnolencia (Watts, 1990) y un exceso puede producir un deterioro en el crecimiento y en la reproducción (Singh & Kalamdhad, 2011). También puede causar trastornos en el cerebro, hígado y en el sistema respiratorio (Zahra & Kalim, 2017).

Bario. El bario es un metal alcalinotérreo, de símbolo Ba y número atómico 56. Está presente en bajas concentraciones en el medio ambiente. Los usos del bario es industrial (petróleo, acero y producción de semiconductores) y uso medicinal (radiografías) (Kravchenko et al., 2014).

El bario se acumula en el esqueleto principalmente y en menor medida en dientes,

corazón, pulmón, riñón e hígado. La exposición al bario provoca posibles efectos adversos sobre la salud, como enfermedades cardiovasculares, renales, trastornos metabólicos, neurológicos y mentales (Kravchenko et al., 2014).

Hierro. El hierro es un elemento químico con símbolo Fe y número atómico 26. Es el cuarto elemento más abundante de la tierra (Al-Fartusie & Mohssan, 2017). Pertenece al grupo 8 de la tabla periódica.

El hierro es un elemento esencial para los seres humanos, en nuestro cuerpo el 75% se encuentra en la sangre, el resto entre el hígado, médula ósea y huesos (Prashanth et al., 2015).

La mayoría del hierro presente en el cuerpo se encuentra en la hemoglobina, es necesario para el crecimiento, el desarrollo y el funcionamiento normal de las células y la síntesis de algunas hormonas y el tejido conectivo (Al-Fartusie & Mohssan, 2017).

Boro. Es un elemento no metálico, de símbolo B, del grupo 13 de la tabla periódica, cuyo número atómico es 5, con propiedades similares al silicio. No es muy abundante en la tierra. El boro se usa en la producción de detergentes, vidrio y cerámica, así como en la industria textil y en la agricultura (Bakirdere et al., 2010).

El boro es nutricionalmente importante en los humanos. Es absorbido casi en su totalidad por el sistema gastrointestinal, por el sistema respiratorio y también por inhalación (Bakirdere et al., 2010).

El boro es un elemento traza esencial para el metabolismo de los minerales y funciones hormonales, también para las funciones de la membrana celular y reacciones enzimáticas. Está involucrado en el metabolismo del calcio, imprescindible para los huesos y ayuda al sistema inmunológico. Por otro lado, participa en la respuesta inflamatoria y en las funciones del sistema nervioso central (Bakirdere et al., 2010).

En concentraciones elevadas se produce toxicidad, causando irritabilidad, convulsiones, trastornos gastrointestinales, entre otros síntomas. En las investigaciones desarrolladas hasta ahora no se observa que el boro presente mutagenicidad ni que sea cancerígeno (Bakirdere et al., 2010).

Titanio. El titanio es un elemento de símbolo Ti, que pertenece al grupo 4 y número atómico 22. Es un metal comúnmente usado en el campo de los biomateriales y las bioaplicaciones, debido a que es completamente inerte para el cuerpo y presenta una alta

capacidad de integrarse con el hueso y otros tejidos (Ghadimi et al., 2013).

Manganeso. El manganeso es un elemento químico con el símbolo Mn y número atómico 25, es el duodécimo elemento más abundante de la corteza terrestre (Al-Fartusie & Mohssan, 2017).

Es un metal que se usa principalmente en las aleaciones, especialmente en los aceros inoxidables (Al-Fartusie & Mohssan, 2017).

El manganeso es un elemento esencial en todos los mamíferos. En nuestro cuerpo, alrededor de un 43% se encuentra en el sistema esquelético y el resto en los tejidos blandos (hígado, páncreas, riñones, cerebro) y en el sistema nervioso central. Ayuda al cuerpo a formar tejido conectivo, huesos, metaboliza las grasas y los carbohidratos, ayuda a la absorción de calcio y a la regulación del azúcar en sangre. Es un componente clave en los sistemas enzimáticos (Prashanth et al., 2015; Al-Fartusie & Mohssan, 2017).

Un déficit de manganeso causa trastornos hemorrágicos y en el sistema nervioso central. Otros síntomas que puede causar una carencia de manganeso son hipercolesterolemia, dermatitis, anomalías esqueléticas, infertilidad o sordera (Al-Fartusie & Mohssan, 2017). Mientras una acumulación excesiva durante un largo periodo de tiempo provoca; anorexia, dolor de cabeza, insomnio, alteraciones del habla, síntomas relacionados con el Parkinson y hasta psicosis (Watts, 1990; Prashanth et al., 2015; Al-Fartusie & Mohssan, 2017).

Cromo. El cromo es un elemento químico de símbolo Cr y número atómico 24. Es un metal gris acerado, lustroso, duro y quebradizo (Al-Fartusie & Mohssan, 2017).

El cromo es un elemento traza esencial en los humanos, se encuentra principalmente de dos formas: trivalente, el cual es biológicamente activo y se encuentra en los alimentos y hexavalente, una forma tóxica que resulta de la contaminación industrial (Al-Fartusie & Mohssan, 2017).

El cromo es un elemento esencial para el organismo, y necesario para sintetizar el factor de tolerancia a la glucosa, el cual ayuda a la insulina a regular los niveles de azúcar en sangre (Prashanth et al., 2015). Por otro lado, se ha descubierto que el cromo produce aumentos significativos en la actividad de las enzimas y es muy importante en el metabolismo de los carbohidratos.

La deficiencia de cromo es poco frecuente. No obstante, un déficit causa problemas en la intolerancia a la glucosa, mientras que la hiperglucemia puede estar asociado con el

aumento del cromo en el plasma (Prashanth et al., 2015; Al-Fartusie & Mohssan, 2017).

La exposición laboral a altas concentraciones (por inhalación) produce rinitis, broncoespasmos, neumonía, insuficiencia renal, llegando a cáncer de pulmón y de laringe y faringe (cromo hexavalente). Pudiendo provocar también problemas en la piel, como úlceras y dermatitis (Prashanth et al., 2015).

Níquel. El níquel es un elemento químico de símbolo Ni y número atómico 28, es un metal blanco plateado, duro, maleable y dúctil. Se encuentra en el mismo grupo de la tabla periódica que el hierro y es un buen conductor tanto del calor como de la electricidad. Es un elemento natural presente en el suelo, agua, aire y materiales biológicos (Al-Fartusie & Mohssan, 2017) y en los cigarrillos (Mahurpawar, 2015).

Son numerosas las aplicaciones que tiene el níquel, tales como la joyería, siendo el uso más importante las fabricaciones de aleaciones, especialmente en el acero inoxidable (Mahurpawar, 2015; Al-Fartusie & Mohssan, 2017).

El níquel es un elemento traza esencial presente en el cuerpo humano, aunque las funciones biológicas aún no están del todo claras, se piensa que está implicado en la estructura o función de las proteínas. También que puede desempeñar un papel, como cofactor, en la activación de ciertas enzimas relacionadas con la descomposición o utilización de la glucosa. Asimismo, se ha observado que puede ayudar en la producción de prolactina. Son necesarias más investigaciones acerca de este oligoelemento esencial (Al-Fartusie & Mohssan, 2017).

Una deficiencia de níquel es poco común, no obstante, esta puede causar cambios bioquímicos, como la reducción de hierro, produciendo anemia. También puede dificultar la incorporación de calcio en los huesos y puede afectar al metabolismo de los carbohidratos (Al-Fartusie & Mohssan, 2017).

Cobre. El cobre es un elemento químico de símbolo Cu y número atómico 29, se encuentra en el grupo 11 de la tabla periódica. Es un metal rojizo, maleable, dúctil y excelente conductor de calor y electricidad (Al-Fartusie & Mohssan, 2017).

Las principales fuentes de liberación de cobre son la minería, la fundición y el refinado de cobre, diferentes industrias y combustión de combustibles fósiles (Mahurpawar, 2015).

El cobre es un elemento esencial para las plantas, animales y humanos, en los cuales está presente en cantidades traza (Singh & Kalamdhad, 2011; Mahurpawar, 2015).

Al igual que el zinc, el cobre actúa como activador de enzimas en reacciones catalizadoras, que se ocupan principalmente de las reacciones de oxidación (Prashanth et al., 2015; Zahra & Kalim, 2017).

Es necesario para el crecimiento y formación de los huesos, al igual que para el sistema nervioso y circulatorio entre otros. Tiene un papel relevante en la síntesis del triptófano (Mahurpawar, 2015; Prashanth et al., 2015; Al-Fartusie & Mohssan, 2017).

Una deficiencia de cobre es poco común, relacionándose con casos de desnutrición, (Al-Fartusie & Mohssan, 2017) y afecta al sistema nervioso central. Son numerosos los estudios que asocian la deficiencia de cobre a defectos de mielinización.

Cobalto. El cobalto es un elemento químico de símbolo Co y número atómico 27, perteneciente al grupo 9 de la tabla periódica. Es un metal duro, brillante y de color gris azulado (Al-Fartusie & Mohssan, 2017). En el medio ambiente se encuentra generalmente combinado con otros elementos, como oxígeno, azufre y arsénico (Prashanth et al., 2015).

Se utiliza habitualmente en aleaciones magnéticas. Tiene considerables aplicaciones industriales, también se usa en pinturas y tintes, se usa en aplicaciones médicas como en la radioterapia (Al-Fartusie & Mohssan, 2017).

La dieta es la principal fuente de exposición al cobalto (Prashanth et al., 2015).

Es un oligoelemento esencial para el cuerpo humano, siendo un componente clave de la vitamina B12. Tiene un papel sustancial en la formación de aminoácidos y neurotransmisores (Prashanth et al., 2015; Al-Fartusie & Mohssan, 2017).

Un déficit de cobalto está asociado con alteraciones en la síntesis de vitamina B12 (Al-Fartusie & Mohssan, 2017).

Selenio. Es un elemento químico de símbolo Se y número atómico 34, perteneciente al grupo 16 de la tabla periódica. Es un elemento traza esencial para los animales y las plantas (Al-Fartusie & Mohssan, 2017).

Es un elemento esencial en el organismo, componente importante de las enzimas antioxidantes (Al-Fartusie & Mohssan, 2017). Es imprescindible en la dieta, para obtener un sistema inmunológico saludable (Al-Fartusie & Mohssan, 2017). Aunque un exceso de selenio puede ser muy tóxico (Al-Fartusie & Mohssan, 2017).

Vanadio. El vanadio es un elemento perteneciente al grupo 5 de la tabla periódica, número atómico 23 y símbolo V. Es un elemento esencial que se encuentra en huesos y

dientes y participa en las reacciones de enzimas, en el metabolismo de la glucosa y los lípidos. Aunque en altas concentraciones, debido principalmente a exposiciones industriales, puede resultar tóxico (WHO, 1996).

Aluminio. El aluminio es un elemento perteneciente al grupo 13 de la tabla periódica, cuyo símbolo es Al y número atómico 13.

El aluminio se encuentra de forma natural en el medio ambiente y también se libera debido a actividades antropogénicas tales como la minería y en la industria, en la producción de aluminio metálico y otros compuestos de aluminio (Djouina et al., 2016).

El aluminio biológicamente disponible es tóxico y el catión Al^{3+} es altamente reactivo desde un punto de vista biológico. Son numerosas las sospechas que existen sobre si una intoxicación crónica por aluminio a lo largo de décadas podría estar relacionada con diferentes patologías, sin embargo, a día de hoy los resultados presentes en la bibliografía científica no son concluyentes (Exley, 2016).

Plomo. El plomo es un elemento químico con número atómico 82 y símbolo Pb. Es un metal blando, maleable y pesado. De color negro azulado que en contacto con el aire se convierte en un metal gris apagado (Al-Fartusie & Mohssan, 2017).

Las principales fuentes de entrada en el cuerpo es la contaminación ambiental (Mahurpawar, 2015).

No se conoce ningún beneficio o función biológica del plomo para el cuerpo humano, es un elemento tóxico o potencialmente tóxico. Puede afectar a casi todos los órganos de nuestro cuerpo, el más sensible es el sistema nervioso central (Al-Fartusie & Mohssan, 2017).

El plomo se absorbe rápidamente en el torrente sanguíneo a través de la inhalación, ingestión a través de los alimentos o el contacto dérmico. Se distribuye principalmente a la sangre, tejidos blandos (riñón, médula ósea, hígado y cerebro) y al tejido mineralizado que incluye huesos y dientes (Mudgal et al., 2010; Al-Fartusie & Mohssan, 2017).

Existe un claro vínculo entre la exposición a plomo y el cáncer, aunque son necesarios más estudios para determinar cómo afecta la exposición a plomo en diferentes tipos de cáncer (Mahurpawar, 2015).

Estaño. El estaño de símbolo Sn es un elemento metálico de número atómico 50, perteneciente al grupo 14 de la tabla periódica.

La toxicidad del estaño inorgánico y en estado nativo no es elevada, pero se ha demostrado que los compuestos orgánicos del estaño tienen una toxicidad considerable. La biodisponibilidad es máxima a pH neutro o ligeramente alcalino y se reduce en presencia de carbono orgánico disuelto (Rüdel, 2003).

El estaño, se utiliza a nivel industrial para la elaboración de hojalata, principalmente en la elaboración de envases alimentarios, los cuales representan una de las mayores fuentes de entrada en el organismo (Blunden & Wallace, 2003).

Litio. El litio es un elemento químico de símbolo Li y número atómico 3, perteneciente al primer grupo de la tabla periódica.

Este elemento está presente en la corteza terrestre en una extensión de aproximadamente 0,006% en peso. Es el vigésimo séptimo elemento más abundante en la naturaleza (Aral & Vecchio-Sadus, 2008).

El litio se transfiere en la cadena alimentaria desde el suelo a través de la flora y los animales a los seres humanos. A pesar de considerarse un elemento tóxico, se ha observado que puede presentar efectos terapéuticos generando una neuroprotección (Mudgal et al., 2010).

Arsénico. El arsénico es un elemento químico de símbolo As y número atómico 33, que se encuentra en el grupo 15 de la tabla periódica. El arsénico inorgánico soluble puede causar efectos tóxicos de forma inmediata, afectando al sistema gastrointestinal y también dañando el sistema nervioso y el sistema circulatorio, pudiendo provocar hasta la muerte. La exposición laboral al arsénico, principalmente por inhalación, se asocia con el cáncer de pulmón (Mahurpawar, 2015).

El arsénico se encuentra ampliamente distribuido por toda la corteza terrestre. El agua es la principal fuente de entrada, a través de la corrosión natural de los minerales, y también mediante otras fuentes antropogénicas como son la quema de combustibles fósiles, la minería o el uso de pesticidas (Prasad & Brewer, 2020).

Cadmio. El cadmio es un elemento químico de símbolo Cd y número atómico 48, que forma parte del grupo 12 de la tabla periódica.

El cadmio puede estar presente en agua residuales, emisiones industriales, alimentos, fertilizantes agrícolas (Mahurpawar, 2015). La principal vía de exposición es a través de la comida, ya que el cadmio es fácilmente absorbido por las plantas, siendo un

componente natural del tabaco (Mudgal et al., 2010).

El cadmio puede entrar por ingestión o inhalación y se bioacumula en diferentes órganos y tejidos del cuerpo (Mudgal et al., 2010; Mahurpawar, 2015). Los órganos diana para el cadmio son el hígado, la placenta, los riñones, los pulmones, el cerebro y los huesos (Singh & Kalamdhad, 2011; Zahra & Kalim, 2017).

El cadmio es un neurotóxico (Watts, 1990) y cancerígeno (Mudgal et al., 2010). Los fumadores presentan una concentración en cadmio en sangre entre 4 a 5 veces más alta que los sujetos no fumadores. Una exposición a cadmio produce una desmineralización de los huesos (Mudgal et al., 2010).

1.4. Microscopía

La microscopía es un conjunto de técnicas empleadas para estudiar las estructuras que el ojo humano a simple vista no es capaz de observar. Cada vez son más necesarios sistemas capaces de distinguir estructuras biológicas complejas y la necesidad de obtener una mayor resolución (Bueno et al., 2010).

En las últimas décadas se han desarrollado nuevas técnicas microscópicas como la microscopía multifotónica (MPM) para la visualización y el análisis de tejidos en biomedicina. Esta técnica permite la obtención de imágenes en alta resolución debido a los fenómenos físicos que se producen en los tejidos biológicos a nivel molecular (Bueno et al., 2010; Martínez-Ojeda et al., 2020). La microscopía multifotónica se basa en el esquema de un microscopio confocal, pero emplea un modo diferente de excitación del fluoróforo sin necesidad de emplear aperturas (*pinhole*) para eliminar las estructuras fuera de foco (Uturbe et al., 2007).

1.4.1. Microscopía lineal

En primer lugar, vamos a definir dos tipos de microscopía lineal: la confocal y la de fluorescencia.

En la microscopía confocal (Figura 10 A) la luz incidente que proviene del láser es reflejada por un espejo dicróico y es enfocada por un objetivo sobre un punto del tejido situado en el plano de foco. Al atravesar el tejido, la luz incidente es dispersada, por lo que puede excitar fluoróforos o fluorocromos (marcadores fluorescentes endógenos o exógenos) situados en otros planos del tejido. La emisión de fluorescencia es captada por el objetivo y enfocada sobre una apertura o diafragma (*pinhole*), fundamento de este tipo de microscopía, que se encuentra situado delante de la unidad de detección o fotodetector,

que solo permite el paso de la luz emitida que proviene del plano de foco y elimina las emisiones de otros planos y genera las imágenes confocales. Para ello se colocan dos diafragmas perfectamente alineados, uno entre la fuente de luz y el objetivo y el otro, entre el objetivo y el detector (Uturbe et al., 2007; Ávila, 2016).

El sistema confocal presenta un importante aumento de la resolución debido a que se obtienen imágenes confocales que recogen la señal de un único plano de foco que representa un espesor reducido de la muestra. Este espesor dependerá del objetivo y del *pinhole* seleccionado. Al no existir estructuras fuera de foco, esto permite una mayor definición y por tanto una mayor resolución de imágenes. Estas imágenes o secciones ópticas pueden ser tomadas a diferentes profundidades del tejido, las cuales permiten la reconstrucción y análisis tridimensional del tejido estudiado, muy importante para el estudio y análisis de tejidos biológicos (Uturbe et al., 2007; Ávila, 2016). Como la luz procedente de la fuente láser permite focalizar la iluminación en una región muy pequeña de la muestra, para poder observarla totalmente, se necesita un sistema de barrido que muestree todos los puntos. Existen dos tipos de barrido: el primero es el llamado *beam scanning*, el más usado, donde el haz láser se mueve sobre la muestra y el otro tipo es el *stage scanning* donde la muestra es la que se desplaza (Wright et al., 1993).

El microscopio de fluorescencia está formado por una fuente de iluminación de alta intensidad como puede ser una lámpara de mercurio o halógenas de wolframio, esta luz a la longitud de onda deseada solo pasa a través del filtro de excitación que se encuentra entre la muestra y la fuente de luz. Posteriormente llega a un espejo dicróico, que permite la separación de la luz de excitación y la fluorescencia, reflejando la longitud de onda más corta y atravesando la más larga. La radiación que emite la muestra llega finalmente al sistema de registro (Masters, 2014).

La fluorescencia es un fenómeno pasajero de luminiscencia, por el cual una molécula absorbe un fotón a una determinada longitud de onda y emite otro fotón con una longitud de onda mayor que la absorbida, es decir, emite con una menor energía. Por lo que el electrón pasa a un estado de excitación más alto, emitiendo la mayor parte de su energía al volver al estado fundamental. Es un fenómeno lineal porque absorbe un fotón y devuelve otro y se puede dividir en tres etapas: excitación, conversión interna de energía y emisión; puede repetirse este proceso indefinidamente siempre y cuando la molécula conserve su estructura inicial. La muestra se observa gracias a los fluoróforos o fluorocromos (Bueno et al., 2010).

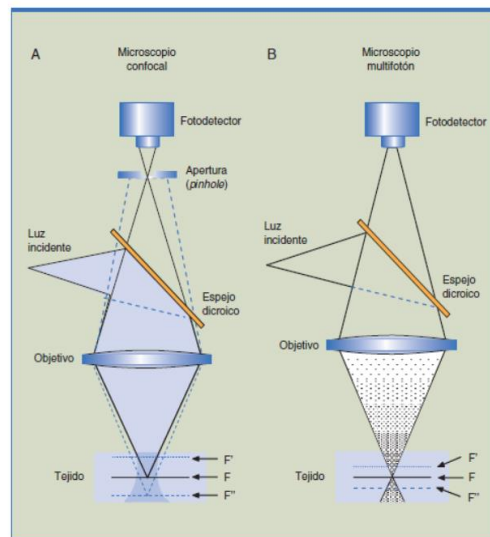
En los microscopios confocales y de fluorescencia, la longitud de onda de la luz incidente es la adecuada para excitar al fluoróforo; que es un elemento químico que emite luz visible cuando incide una radiación intensa sobre ellos y así poder visualizar la muestra;

es decir, cada fotón tiene una energía asociada suficiente para excitar al fluoróforo (Uturbe et al., 2007).

No obstante, estas técnicas se ven afectadas tanto por aberraciones como por fenómenos de dispersión o *scattering* (pérdida de confocalidad de los fotones), que a su vez provoca una fluorescencia difusa o *photobleaching*, lo que provoca una reducción de la intensidad detectada y una disminución en el contraste de la imagen confocal. El blanqueado de la molécula se debe a que ciertos enlaces son sometidos a “tensiones” y resultan dañados (Bueno et al., 2010; Ávila, 2016). A finales de los años 80 y principios de los 90 del siglo pasado, comenzó a comercializarse el láser infrarrojo de femtosegundos y se subsanaron estos inconvenientes, ya que, con estas fuentes de luz, los tejidos absorben de forma no lineal pares de fotones y emiten un único fotón de menor longitud de onda, es la actual microscopía multifotónica. Con el láser de femtosegundos se alcanza una alta densidad de fotones; aumentando así la probabilidad de absorción simultánea de dos fotones. La luz infrarroja penetra a profundidades mayores en los tejidos biológicos, debido a que el agua en estas longitudes de onda presenta una débil absorción (Bueno et al., 2010).

1.4.2. Microscopía multifotónica

En la microscopía multifotónica (MPM) (Figura 10 B), la luz incidente tiene una longitud de onda más larga que la de excitación del fluoróforo, por lo que cada fotón tiene una energía menor y es necesaria la coincidencia simultánea de varios fotones sobre la molécula de fluoróforo para excitarlo. El sistema más usado en la actualidad es el microscopio de dos fotones, cuya longitud de onda incidente es aproximadamente el doble de la longitud de onda de excitación del fluoróforo contenido en la muestra. La emisión de fluorescencia es recogida por un fotomultiplicador; no existe una apertura o *pinhole*, ya que el propio sistema de dos fotones se encarga de eliminar la emisión periférica. Y al igual que en la microscopía confocal pueden obtenerse una serie de secciones ópticas que permiten la reconstrucción en 3D de las estructuras observadas, las imágenes obtenidas presentan un mayor contraste y definición (Uturbe et al., 2007).

Figura 10*Sistemas ópticos para la obtención de imágenes confocales*

Nota. A) Microscopio confocal y B) Microscopio de dos fotones (multifotón). Figura extraída de Uturbe et al. (2007) (p. 17).

El concepto de absorción no lineal de fotones fue descrito por primera vez en 1931 por Maria Goeppert-Mayer (Göppert-Mayer, 2009), premio Nobel de física en 1963. Su teoría se confirmó 30 años más tarde con la llegada del láser (Kaiser & Garret, 1961). Y 30 años después, a finales del siglo XX se dio el paso al uso de esta nueva técnica: la microscopía multifotónica de fluorescencia (Denk et al., 1990).

A diferencia de la fluorescencia lineal, en la fluorescencia multifotónica (no lineal) se produce una absorción secuencial de varios fotones de menor energía que llevan al fluoróforo al estado de excitación en el que emite un único fotón (Uturbe et al., 2007). Como la probabilidad de absorción simultánea es baja, se requiere un flujo alto de fotones de excitación; es decir una fuente luminosa ultraintensa y ultrarrápida, que solo es posible con el láser de femtosegundos (Ávila, 2016). Se emplea un láser especial que emite luz de longitud de onda alta (el láser de pulsos de zafiro, con emisión en longitudes de onda de 690 a 1050 nm), en pulsos de duración muy corta, entre 100 fs ($100 \cdot 10^{-15}$ s) y 2 ps ($2 \cdot 10^{-12}$ s) y una alta frecuencia (100 MHz = 10^8 pulso/s) (Uturbe et al., 2007).

La bibliografía existente hasta la fecha, indica que la MPM es una herramienta muy valiosa para la caracterización de dientes extraídos, tanto humanos como de animales; también resulta muy útil para explorar la anatomía de los túbulos dentarios en los dientes fósiles. Todas las estructuras de la cavidad oral, incluyendo los tejidos blandos y los dientes, sufrirán al menos una vez durante la vida diferentes patologías y/o modificaciones

producidas a lo largo de los años (Martínez-Ojeda et al., 2020).

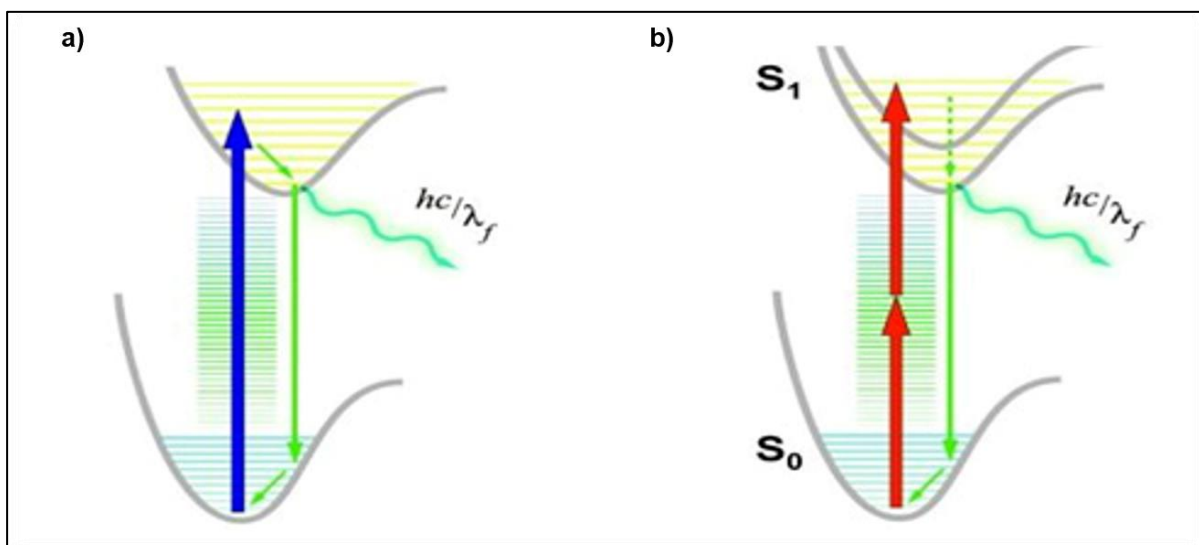
Se pueden distinguir varias técnicas todas ellas no invasivas de microscopía multifotónica. Entre ellas destacan la Fluorescencia por excitación de dos fotones (TPEF) y la Generación de segundo armónico (SHG). Las diferentes partes de la cavidad oral, como son el esmalte y la dentina, emiten señal multifotónica. El esmalte solo emite señal TPEF, mientras que la dentina emite tanto señal TPEF como SHG, esta última debido a la presencia de colágeno (estructura no-centrosimétrica) (Martínez-Ojeda et al., 2020).

1.4.2.1. Fluorescencia por excitación de dos fotones (TPEF; *Two-Photon Excitation Fluorescence*)

Surge a través de la excitación del fluoróforo por la absorción de manera simultánea de dos fotones infrarrojos. El primero de ellos excita la molécula hacia un estado que se denomina “intermedio virtual”, y posteriormente llega a un estado final de “excitación real” con la absorción del segundo fotón. En este proceso se origina una pequeña pérdida de energía no radiativa, la molécula emite un fotón de una longitud de onda mayor que la mitad de la longitud de la onda que ha incidido, por lo tanto, la energía que emite es algo menor que la suma de los dos fotones iniciales (Helmchen & Denk, 2005). En la Figura 11 observamos esquemáticamente el proceso de la fluorescencia lineal (Figura 11 a) y en la de la derecha la fluorescencia de 2 fotones (Figura 11 b).

Figura 11

Diagrama de Jablonski



Nota. a) Fluorescencia lineal (1 fotón, convencional). b) Fluorescencia a 2 fotones (no lineal, “TPEF”). Adaptado de Cornell Engineering Applied and Engineering Physics (Cornell Engineering, 2020).

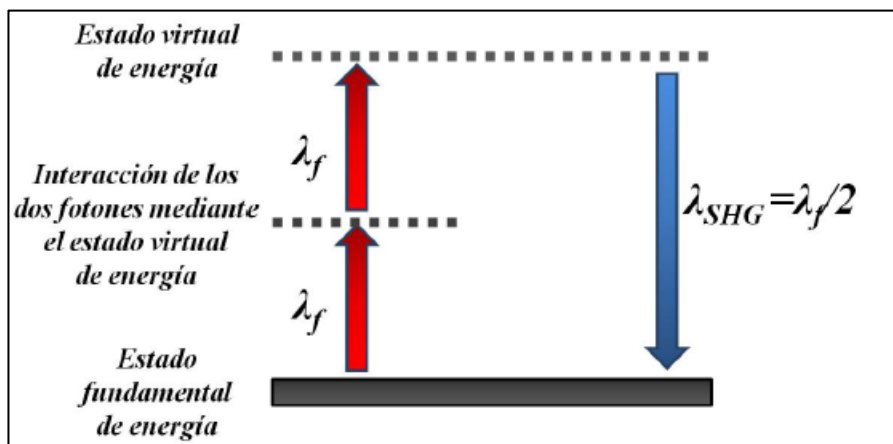
El uso de esta técnica multifotónica para la obtención de imágenes de la estructura e interacción en tejidos biológicos ha sido ampliamente usado, como para el estudio de células de la piel (Masters et al., 1998; Masters & So, 2001) y en tejido de pulmón (Agarwal et al., 2001).

1.4.2.2. Generación de segundo armónico (SHG; *Second Harmonic Generation*)

La absorción de dos fotones infrarrojos a través de una estructura no centro-simétrica, como las fibras de colágeno, da lugar a un único fotón visible, que posee la mitad de la longitud de onda o el doble de frecuencia. El primero de los fotones pasa por un estado de excitación “intermedio virtual” y el segundo por un estado “virtual final”. En este proceso a diferencia de la señal TPEF no se produce pérdida de energía (Campagnola & Loew, 2003) En la Figura 12 observamos un diagrama esquemático de la generación del segundo armónico.

Figura 12

Diagrama esquemático del proceso SHG



Nota. Figura extraída de Ávila (2016).

En 1962 Bloembergen y Pershan (Bloembergen & Pershan, 1962), investigadores de la Universidad de Harvard, describieron el fenómeno usando las ecuaciones de Maxwell para justificar el comportamiento de la luz en la interfase plana entre un medio no lineal y uno lineal (Ávila, 2016).

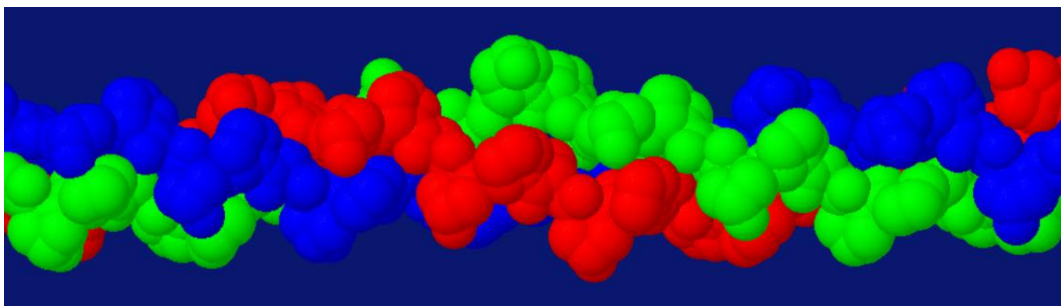
El momento dipolar eléctrico que está asociado a la señal SHG está relacionado con la hiperpolarizabilidad de segundo orden, para que este término no sea nulo es necesario que la estructura posea una simetría no centro-simétrica: moléculas quirales con estructuras muy ordenadas, como es el caso del colágeno (Ávila, 2016), uno de los sistemas más a

menudo analizados, obteniendo una señal eficiente; también la miosina o tubulina o la estructura de microtúbulos dan señal.

El colágeno es secretado por los fibroblastos, que son las células del tejido conectivo. Se han descrito más de 20 tipos de colágeno, dependiendo de su estructura y función, de los cuales el 80% corresponde al tipo I. Con el SHG podemos estudiar la arquitectura molecular y la distribución fibrilar de este tipo de colágeno, que es la proteína estructural más abundante de nuestro cuerpo y se encuentra presente en la córnea, en los tendones, en la piel, en los huesos y en los dientes. Además, tiene funciones inmunológicas o metabólicas, siendo su función básica la de sostén e integración sistémica del organismo (Ávila, 2016). La unidad básica del colágeno es el tropocolágeno (1,5 nm de diámetro) (Figura 13), presenta una estructura helicoidal, está formado por 3 cadenas de polipéptidos enrollados entre sí en forma de espiral y que se entrecruzan para formar las fibrillas de colágeno (50-200 nm de diámetro) que se ensamblan en haces paralelos para constituir las fibras de colágeno. El proceso de maduración del tropocolágeno se llama fibrogénesis. El origen de la señal SHG en el colágeno es su quiralidad molecular (Bueno et al., 2016).

Figura 13

Estructura de tropocolágeno



Nota. Adaptado de Herráez (2018).

El colágeno tiene distintas funciones básicas, tales como controlar la elasticidad, transparencia, viscosidad o tensión y dependiendo de la función que aporte, así se orientarán sus fibras; si la función es ejercer resistencia a lo largo de una dirección la orientación de las fibras será paralela, esta disposición es la más común. Si ejerce resistencia en una superficie, las fibras de colágeno se entrecruzan. Si la función es de estrés mecánico, las fibras se orientarán dependiendo de la actividad mecánica (Ávila, 2016).

La intensidad total que emite el colágeno es el sumatorio de la señal coherente de cada fibrilla de este, la eficiencia depende de cómo de alineadas estén las fibrillas dentro

de la fibra. Los cambios morfológicos del colágeno se producen primero a nivel molecular (tropocolágeno) (Bueno et al., 2016).

El uso de SHG para la obtención de imágenes de muestras biológicas fue esbozada por Gannaway y Sheppard en su estudio de 1978 (Gannaway & Sheppard, 1978), en moléculas no-centrosimétricas. Otras investigaciones iniciales donde se utilizó el segundo armónico en los tejidos biológicos son los trabajos realizados por Fine & Hansen (1971), Roth & Freund (1980) y Freund et al. (1986). Este último utilizó esta técnica para el estudio de la estructura endógena del colágeno en un tendón de rabo de rata, debido a su asimetría y demostró la presencia de estructuras dipolares, obteniéndose las primeras imágenes biológicas (Bueno et al., 2016).

El estudio de Kao et al. (2000) puede ser considerado como el primer trabajo en que se demuestra la señal SHG del diente, unos años más tarde, el mismo grupo demostró esta misma señal, pero con imágenes de mayor precisión y explicaron que la señal del segundo armónico era debido al colágeno que presenta en la dentina. La ausencia de esta señal en el esmalte fue confirmada por Kao et al. (2004). Girkin et al. también propusieron el uso de la microscopía multifotónica para la detección de la caries incipiente en dientes sanos (Girkin et al., 1999; Girkin et al., 2000).

En la investigación realizada por Kim et al. (1999) en diferentes tejidos biológicos, entre otros la dentina humana, observaron que aparte del colágeno, otras proteínas estructurales como la miosina y la elastina son los responsables del SHG, demostrando que las propiedades ópticas no lineales de la materia son más sensibles a los cambios morfológicos de este que a las propiedades ópticas lineales. Al año siguiente, Kim et al. (2000) señalaron que los cambios que se producen en la señal de SHG pueden indicar variaciones en las estructuras del colágeno, estas modificaciones están asociadas con varios procesos fisiológicos tales como el envejecimiento, tumores, diabetes o cicatrización anormal de heridas. Por lo que concluyeron que a través de esta técnica multifotónica se puede obtener información estructural sobre tejidos biológicos.

Como observamos, el colágeno ha sido particularmente estudiado mediante la generación del segundo armónico. Algunas investigaciones como Campagnola et al. (2002), demostraron que la anisotropía de polarización del SHG se puede usar para determinar la orientación y el grado de organización de las proteínas en los tejidos. En otro estudio realizado también en ese año por Cox et al. (2002) señalaron que el colágeno es la proteína estructural más importante del cuerpo, debido a su organización única de triple hélice y a su alto nivel de cristalinidad que lo hace eficaz en esta técnica multifotónica. En su investigación llegan a discriminar entre el colágeno tipo I y tipo III. En el año 2004 Yasui et al. (Yasui et al., 2004) estudiaron la orientación y distribución del colágeno en la dentina

humana mediante el SHG y observaron que esta se va alterando durante el envejecimiento. Muchos estudios asumen que es su simetría quiral la principal responsable de la señal en los tejidos. Otros trabajos donde podemos encontrar que el SHG ha sido usado para la aplicación de imágenes biológicas son los de Gauderon et al. (1998), Campagnola et al. (1999), Georgiou et al. (2000), Moreaux et al. (2000).

La reconstrucción de imágenes 3D permite la visualización de los túbulos y las fibras de colágeno. El SHG proporciona imágenes en 3D con una excelente resolución en el eje z, con una reducción de la toxicidad fuera de plano.

Existe una dependencia entre la señal SHG y la polarización en las fibras de colágeno, los cambios en la polarización permiten la detección de variaciones en la composición de colágeno y la distribución dipolar dentro de las fibras de colágeno (Bueno et al., 2016).

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

JUSTIFICACIÓN

La estimación de la edad tanto en sujetos vivos como en fallecidos resulta en numerosas ocasiones crucial para el esclarecimiento de temas de relevancia legal y social.

Los procedimientos que existen para estimar la edad de un individuo son cuantiosos, pero hay falta de consenso y estandarización en las metodologías, lo que supone importantes limitaciones (Ritz-Timme et al., 2000; Cunha et al., 2009; Ubelaker & Khosrowshahi, 2019).

Hay que tener en cuenta que los métodos usados para la estimación de la edad en personas vivas son diferentes a los empleados para fallecidos, al igual que entre contextos arqueológicos y medicolegales (Cunha et al., 2009; Ubelaker & Khosrowshahi, 2019).

Son diversos los factores que hay que tener en cuenta a la hora de elegir la metodología apropiada, como la población de estudio, el estado nutricional, factores socioeconómicos, el sexo y el rango de edad esperado (Ritz-Timme et al., 2000; Cunha et al., 2009; Ubelaker & Khosrowshahi, 2019).

Las dos matrices principales para la estimación de la edad son los dientes y los huesos, siendo los primeros de ellos más fiables, ya que presentan menos dependencia de distintos factores y la matriz de estudio es más accesible (Cunha et al., 2009; Ubelaker & Khosrowshahi, 2019). Son numerosos los métodos encontrados en la literatura científica en los que el diente es la matriz usada para la estimación de la edad.

Los dientes presentan una serie de características diferenciales que son básicas para la identificación, y debido a su naturaleza físico-química y localización son una matriz que se conserva adecuadamente con el paso del tiempo, resistente a la descomposición y a los efectos de agentes químicos, físicos y biológicos (pH, altas temperaturas, traumatismos, bacterias, etc.) (Cunha et al., 2009; Imaizumi, 2015; Reesu et al., 2015; de Boer et al., 2018; Rubio et al., 2018; Adserias-Garriga, 2019; Shah et al., 2019).

La odontología forense juega un papel clave para la identificación del cadáver, principalmente en situaciones de grandes catástrofes, donde el cuerpo puede haber sufrido diferentes transformaciones y un reconocimiento visual es casi imposible (Ritz-Timme et al., 2000).

Por otro lado, en los últimos años se han desarrollado diferentes estudios bioquímicos en tejido mineralizado, principalmente en los dientes para la estimación de la edad y centrados en el estudio de ADN. Otros estudios desarrollados han sido: la acumulación de plomo en dentina, los enlaces de colágeno reducidos, los productos finales de glicosilación avanzada (AGEs) y las mutaciones del ADN mitocondrial, entre otros (Martín-de las Heras et al., 1999; Cunha et al., 2009; Ubelaker & Khosrowshahi, 2019;

Zapico et al., 2019a). A pesar de la elevada dureza que presentan los dientes y su poca afectación antes diversos agentes, hay algunas técnicas, como el estudio de ADN, que pueden resultar afectadas por factores como altas temperatura o largos intervalos *post mortem* (Cunha et al., 2009).

La dentina constituye el tejido mineralizado que conforma la mayor parte del volumen del diente (de Ferraris & Muñoz, 2009), está formada por hidroxiapatita y colágeno (Martínez-Ojeda et al., 2020). Esta presenta una dureza mucho menor que la del esmalte y una permeabilidad mayor, debido a los túbulos dentarios lo que permite el paso de los distintos elementos traza (Chiego, 2014). Es un tejido metabólicamente activo, por lo que se va formando tejido dentinario durante toda la vida (de Ferraris & Muñoz, 2009).

La hidroxiapatita está formada principalmente por calcio y fósforo que junto con una amplia variedad de elementos traza en diversas concentraciones, se van incorporando a lo largo del tiempo (de Ferraris & Muñoz, 2009).

La microscopía multifotónica debido a su alta capacidad de penetración en los tejidos y a la obtención de imágenes de alta resolución, incluso a capas profundas, sin necesidad de marcadores exógenos y sin preparación previa, es una buena técnica no invasiva para el estudio de estructuras biológicas (Bueno et al., 2010; Martínez-Ojeda et al., 2020).

Con este trabajo pretendemos contribuir a una ampliación de las técnicas de la estimación de la edad. En nuestro conocimiento, es el primer estudio que analiza la concentración de elementos traza en una gran muestra de dientes de población española, lo que le confiere a la presente investigación una relevancia singular. Y por otro lado, confirmar que el uso de la microscopía multifotónica en dientes es una herramienta útil para ello.

OBJETIVOS

PRIMER OBJETIVO GENERAL

Analizar las concentraciones de elementos traza en la dentina de dientes de población sana española.

Objetivos específicos:

- Identificar la relación de los elementos traza en la dentina en función del sexo.
- Estudiar la concentración de los elementos traza en la dentina en función del tipo de diente.
- Analizar las concentraciones de elementos traza en función de la edad.
- Establecer la utilidad de las concentraciones de elementos traza en la dentina para la estimación de la edad.

SEGUNDO OBJETIVO GENERAL

Establecer si la microscopía multifotónica es una herramienta útil para la estimación de la edad en los dientes.

Objetivos específicos:

- Identificar las distintas partes del diente mediante microscopía multifotónica usando las señales TPEF y SHG.
- Analizar si existe correlación entre la señal TPEF/SHG de las áreas individuales (local) y la imagen global.
- Establecer si la relación entre las señales multifotónicas TPEF/SHG y el Índice de Edad (SAAID) presentan variaciones en función de la edad.
- Analizar si se observa algún cambio significativo de los túbulos dentinarios en relación con la edad.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Objetivo 1

A continuación, vamos a describir el material y la metodología usada para la determinación de elementos traza en la dentina humana.

3.1.1. Descripción y toma de la muestra

Se extrajeron dientes permanentes debido a una enfermedad periodontal o a un tratamiento ortodóntico en la Clínica Odontológica de la Universidad de Murcia (Hospital Universitario Morales Meseguer, Murcia, España). Un total de 221 dientes fueron recogidos de pacientes de nacionalidad española, de los cuales 65 fueron descartados debido a los siguientes criterios de exclusión establecidos: pacientes con exposición laboral a metales (industria de metales pesados y petroquímicas especialmente, ser o haber sido fumadores, embarazo y lactancia, infecciones agudas, enfermedades crónicas, implantes metálicos, toma de suplementos de oligoelementos, dieta vegetariana.

Todos ellos eran residentes en Murcia, cuya dieta predominante en esta región situada en el sudeste de España, es la Mediterránea. Litológicamente, el área de Murcia está caracterizada por materiales calcáreos, dolomitas, margas y materiales metamórficos, principalmente filitas primarias. Los suelos predominantes en el área de Murcia tienen una composición carbonatada, principalmente xerosoles, litosoles, regosoles y fluvisoles.

Los diferentes dientes analizados en el estudio se clasificaron de acuerdo con la nomenclatura de *World Dental Federation* (FDI). Todos los sujetos firmaron un consentimiento informado para el uso de sus dientes para la presente investigación. Se excluyeron aquellas dientes en mal estado, ya sea por caries, con una gran erosión o abrasión o con restauraciones o defectos dentales (n = 6).

Obtuvimos finalmente una muestra de 150 dientes sanos (109 molares y 41 premolares), entre los 18 y los 88 años, con una media de $40,37 \pm 1,55$ años (años \pm error estándar), de los cuales un 42 % eran hombres y un 58 % mujeres. Los dientes fueron recopilados entre los años 2016 y 2018.

La Tabla 2 muestra el número, edad, sexo, tipo de diente que formaron parte del estudio. Para el análisis estadístico, los dientes se distribuyeron en tres categorías de edad, seleccionado mediante una Curva ROC (*Receiver Operation Characteristic*: Curva de Característica Operativa para el Receptor), que permitió encontrar el valor óptimo de corte para cada grupo. Un rango de valores óptimos fue obtenido entre 29,8 y 49,7 años, con sensibilidad de 0,718 – 0,498, y especificidad de 0,687 – 0,795. Los valores finales de corte elegidos fueron 30 y 50 años. Por lo que se dividieron en: Grupo 1, <30 años (n = 56), Grupo 2, 30-50 años (n = 45), Grupo 3, >50 años (n = 49).

Tabla 2*Descripción de la muestra de dientes usada en el estudio*

	Total, N = 150	Pacientes	
		Hombres	Mujeres
		N = 63 (42 %)	N = 87 (58 %)
		n (%)	n (%)
Edad (años)*	40,37 ± 1,55	48,06 ± 18,98	34,23 ± 16,54
Grupos de edad (años)			
Grupo I (<30)	56 (37,3)	15 (23,8)	41 (47,1)
Grupo II (30-50)	45 (30,0)	13 (20,6)	32 (36,8)
Grupo III (>50)	49 (32,7)	35 (55,6)	14 (16,1)
Tipo de diente			
Molar	109 (72,6)	45 (71,5)	64 (73,6)
Grupo I (<30)	40 (36,7)		
Grupo II (30-50)	35 (32,1)		
Grupo III (>50)	34 (31,2)	45 (71,5)	64 (73,6)
Premolar	41 (27,4)	18 (28,5)	23 (26,4)
Grupo I (<30)	16 (39,0)		
Grupo II (30-50)	10 (24,4)		
Grupo III (>50)	15 (36,6)		

Nota. N, número total de cada diente; n (%), número y porcentaje de los dientes en cada grupo. *Edad media ± error estándar.

3.1.2. Metodología experimental

3.1.2.1. Preparación de las muestras. Obtención del bloque de dentina coronal

Cada diente inmediatamente después de la extracción fue clasificado, lavado con agua destilada y secado antes de ser guardado en una bolsa de esterilización autosellable para ser congelado a -20 °C (Figura 14).

Todo el instrumental usado durante la fase de preparación de los dientes fue lavado con ácido nítrico al 10 % y luego enjuagado con agua destilada y secado en una estufa incubadora de laboratorio (70 °C).

Para el análisis, primero, el tejido blando, el tejido gingival y la sangre de alrededor del diente fueron eliminados, después se lavaron con agua destilada y se dejaron secar (Figura 15). A continuación, se guardaron de nuevo en una bolsa de esterilización autosellable y fueron esterilizados en un autoclave a 134 °C y 30 psi durante 3 minutos (Brown et al., 2002) (Figura 16). Los dientes se dejaron durante 2 horas en una solución del 3% de peróxido de hidrógeno con agitación ocasional para eliminar los restos de tejido conectivo (Amr & Helal, 2010). Finalmente, se lavaron con agua destilada y se pusieron a secar a temperatura ambiente durante toda la noche.

Esmalte, cemento y pulpa fueron eliminados con un disco de diamante de grano medio (100 μm), montado en una pieza de mano (Komet-GEBR. BRASSELER GmbH & Co. KG) (Figura 17), obteniendo el bloque de dentina coronal (Figura 18), el cual fue de nuevo lavado en un baño de ultrasonidos con agua ultrapura (18,2 $\text{M}\Omega\text{-cm}$ de resistividad) (Figura 19) y secados en un horno a 60 $^{\circ}\text{C}$ durante 2 h (Arora et al., 2011) (Figura 20). Una vez seco, cada bloque de dentina coronal fue molido en un mortero de ágata (Figura 21), y fueron pesados 0,2 g en una balanza de precisión.

Figura 14

Bolsa de esterilización autosellable



Figura 15

Molar



Figura 16

Autoclave Vela 170



Figura 17

Plataforma con pieza de mano acoplada



Figura 18

Bloque de dentina coronal



Figura 19

Baño de ultrasonidos Mestra® modelo "Calipso"



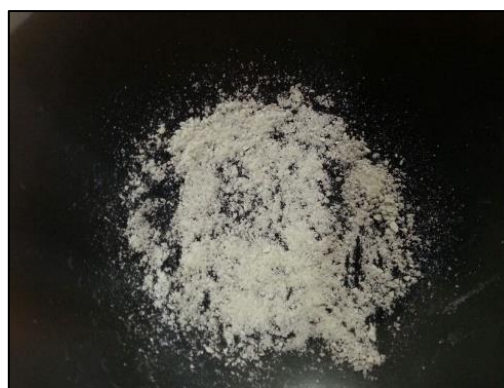
Figura 20

Horno JP SELECTA



Figura 21

Dentina molida en un mortero de ágata



3.1.2.2. Digestión por microondas

La digestión se realizó usando un digestor (Microondas Milestone Modelo Ultrawave) (Figura 22), 4 ml de ácido nítrico de alta pureza al 65 % (Suprapur, Merck), 4 ml de agua ultrapura, obtenida con el sistema Elix 3/Milli-Q Element System (Millipore, Billerica, MA, USA) y 2 ml de peróxido de hidrógeno al 30% fueron añadidos a la muestra en un tubo de Teflon (el programa usado fue Organic up to 0.4 para muestras biológicas).

Todos los agentes químicos usados durante el análisis y la preparación poseían certificados de calidad. Después del proceso de digestión, la solución resultante fue transferida a un matraz aforado y fue enrasado con agua destilada y almacenados a 4 °C hasta su análisis.

Figura 22*Microondas Milestone Modelo Ultrawave*

3.1.2.3. Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) y Espectrometría de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES)

La determinación de los elementos traza se realizó en el Servicio de Apoyo a la Investigación Tecnológica (SAIT) de la Universidad Politécnica de Cartagena y en el Área Científica y Técnica de Investigación (ACTI) de la Universidad de Murcia.

Los 25 elementos traza analizados fueron: litio (Li), boro (B), aluminio (Al), titanio (Ti), vanadio (V), cromo (Cr), manganeso (Mn), hierro (Fe), cobalto (Co), níquel (Ni), cobre (Cu), zinc (Zn), arsénico (As), selenio (Se), estroncio (Sr), cadmio (Cd), estaño (Sn), bario (Ba), plomo (Pb), calcio (Ca), potasio (K), magnesio (Mg), sodio (Na), fósforo (P), azufre (S). Casi la totalidad de los elementos (excepto el Ca y P) fueron determinados por Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS, Agilent 7900 Series® Instrument, Agilent Technologies, Dublin, Ireland) (Figura 23). La determinación del calcio y fósforo fue realizada por Espectrometría de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES, PerkinElmer, Waltham, MA, USA, Optima 8300) (Figura 24).

Para el control de la precisión de las medidas, se usaron muestras como blanco con el mismo volumen y misma combinación de ácidos, después de cada tanda de 10 muestras.

Ambos equipos fueron calibrados por el método de estándares externos. La calibración del ICP-MS se llevó a cabo usando disoluciones estándar de calibración multielementales, a esta se adiciona algún patrón monoelemental cuando se requiere algún elemento que no está incluido, 1000 mg/l para cada elemento (Agilent Technologies, USA,

High-Purity Standards, USA and Merk, Germany) en ácido nítrico puro al 2 %. Todas las medidas tuvieron 3 réplicas. En el ICP-OES, la calibración se llevó a cabo mediante soluciones estándar de calibración multielementales, 1000 mg/l de los elementos analizados (High Purity Standards, Charleston, EE.UU.) y los patrones de trabajo se prepararon con agua ultrapura acidificada con ácido nítrico Hiperpur (Panreac) al 1 %.

Figura 23

ICP-MS, Agilent 7900 Series® Instrument, Agilent Technologies, Dublin, Ireland)

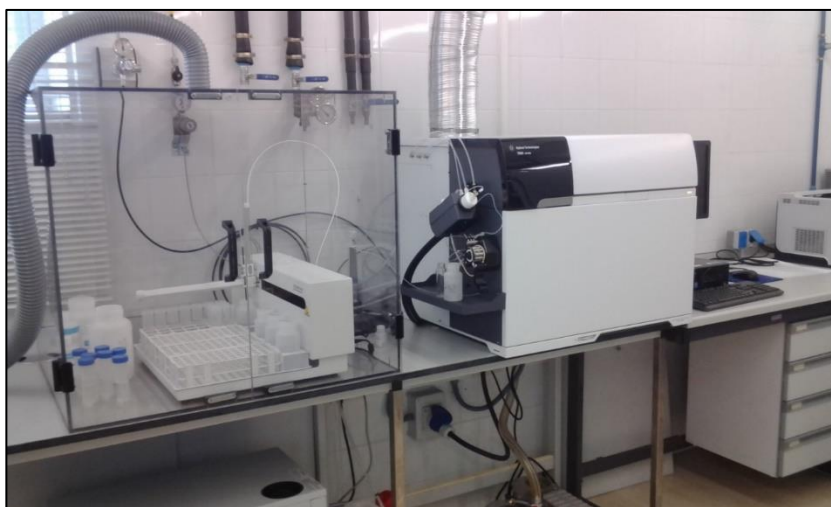


Figura 24

ICP-OES, PerkinElmer, Waltham, MA, USA, Optima 8300



3.1.2.3.1. Límites de detección y de cuantificación

Para la obtención de los límites de detección (LOD: *limit of detection*), se mide al menos 10 veces el blanco empleado y se calcula la desviación estándar de la medida y se multiplica por 3. (Asaduzzaman et al., 2017). En nuestro caso los equipos proporcionaron directamente una estimación a partir de la medida del blanco. Para determinar el límite de cuantificación (LOQ: *limit of quantification*) se multiplica el límite de detección por 10 y se divide entre 3 (Ecuación 1).

$$(1) \text{ LOQ} = 10 * \text{ LOD}/3$$

Las disoluciones para la calibración se prepararon con precisión mediante la dilución de soluciones madre con agua doblemente destilada.

La sensibilidad de las medidas para todos los elementos traza analizados fueron desde 0,004 µg/l a 13,543 µg/l. En la Tabla 3 podemos ver los límites de detección y de cuantificación de los diferentes elementos analizados.

Tabla 3

Límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) de los diferentes elementos traza

Elementos	LOD (µg/l)	LOQ (µg/l)
Elementos tóxicos		
Al	0,6420	2,140
Pb	0,0155	0,052
Sn	0,0257	0,086
Li	0,0011	0,004
As	0,0286	0,095
Cd	0,0132	0,044
Elementos esenciales		
Sr	0,0309	0,103
Zn	0,6826	2,275
Ba	0,0242	0,081
Fe	0,3111	1,037
B	4,0630	13,543
Ti	0,2271	0,757
Mn	0,0836	0,279
Cr	0,0215	0,072
Ni	0,0088	0,029
Cu	0,0497	0,166
Co	0,0512	0,171
Se	0,6398	2,133
V	0,0090	0,030
	(mg/l)	(mg/l)
Ca	0,0157	0,167
P	0,0241	13,333
Mg	0,0009	0,003
Na	0,0162	0,054
S	0,8480	2,827
K	0,0098	0,033

3.1.3. Análisis de los datos

Debido al interés medicolegal y para facilitar la interpretación de los resultados, estos 25 elementos traza fueron agrupados en dos grupos: esenciales o potencialmente esenciales (Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Se, V, Zn, Na, K, Ca, P, S, Mg, B, Ba, Sr, Ti) (Brown et al. 2004; Kabata-Pendias & Mukherjee 2007; Prashanth et al., 2015). Y aquellos que no tienen un papel biológico conocido y/o son potencialmente tóxicos (Cd, Pb, Al, As, Li, Sn) (Brown et al., 2004; Kabata-Pendias & Mukherjee, 2007; Skalnaya et al., 2016).

3.1.4. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los dientes y el estudio individual del plomo fue realizado empleando el programa IBM® SPSS® Statistics 22.0 (SPSS Inc. Chicago, IL USA).

El análisis de componentes principales (PCA) y análisis de regresión se han realizado con el paquete estadístico de R Core Team (2014) R versión 3.1.0 sobre una plataforma i686-pc-linux-gnu (32-bit).

3.1.4.1. Análisis descriptivo de los datos

Se realizó un análisis descriptivo de los datos para ordenarlos, sintetizarlos y organizarlos. La media aritmética, el error estándar, la mediana, el máximo (Máx.), el mínimo (Min.) y los valores de asimetría y curtosis fueron determinados.

3.1.4.2. Análisis de comparación de medias

La prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney se utilizó para la comparación de medias. Se emplea para comparar los valores de dos variables cuantitativas y ordinales de dos muestras independientes las cuales pueden tener diferentes tamaños.

El ANOVA del test no paramétrico de Kruskal-Wallis se utilizó para comparar más de dos muestras independientes, fue usado para estudiar la significación estadística de las diferencias entre las concentraciones de los elementos esenciales o potencialmente esenciales y tóxicos o potencialmente tóxicos y los tres grupos de edad.

Consideramos estadísticamente significativos los casos cuando los valores de p fueron menores de 0,05.

3.1.4.3. Análisis de correlación

Para valorar la asociación entre dos variables cuantitativas y así conocer la intensidad de la relación lineal entre ellas, hemos aplicado el método conocido como correlación. Como las variables estudiadas no siguen una distribución normal se utiliza el coeficiente de Spearman. Su valor oscila entre -1 y 1, cuanto más se aproxime a 1 indica una relación directa y perfecta y a -1 una relación inversa y perfecta. Una correlación próxima a 0 indica que no existe una relación lineal entre las dos variables.

3.1.4.4. Análisis de regresión

Las correlaciones entre los elementos presentes en los dientes y los grupos de edad fueron evaluadas mediante un análisis de regresión. Una vez realizado un diagrama de dispersión y después de observar una posible relación lineal entre las dos variables, el objetivo es encontrar la ecuación de la recta que mejor se ajuste a la nube de puntos, es la recta de regresión.

La regresión lineal consiste en encontrar los valores de una variable a partir de otra usando una relación funcional de tipo lineal. El coeficiente de determinación R^2 [0, 1], determina el grado de ajuste de la recta de regresión a los valores de la muestra, cuanto más cerca de 1, el ajuste es bueno, es decir mayor es la asociación entre ambas variables; mide la proporción de variación de la variable dependiente explicada por la variable independiente.

Realizamos gráficos de cada elemento frente a la edad con diagramas de dispersión y se calculó el coeficiente de determinación R^2 , para dilucidar aquellos elementos que pudieran explicar la edad para posteriormente proponer un modelo de regresión más complejo, y valorando la inclusión de la variable sexo en el modelo. La adecuación del modelo a los datos se valoró mediante el análisis de los residuos del modelo de regresión.

3.1.4.5. Análisis de componentes principales

Se realizó el Análisis de Componentes Principales (PCA, por sus siglas en inglés), con el fin de establecer los componentes o factores lineales que explican la estimación de la edad.

El PCA, por tanto, reduce la dimensionalidad de la matriz de datos original mediante la construcción de componentes principales (PC) que son combinaciones lineales de las variables originales, obteniendo un nuevo conjunto de variables más fácilmente interpretable como resultado de la maximización sucesiva de la varianza (Fischer et al.,

2009).

Usamos el test de Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) para evaluar la adecuación del PCA para las variables iniciales que miden la idoneidad de la muestra, para cada grupo de edad. KMO oscila de 0 a 1 y su valor por encima de 0,5 indica que la relación entre las variables es alta y el PCA es útil.

3.1.5. Aspecto éticos y legales

El estudio fue aprobado por la Comisión de Ética de Investigación de la Universidad de Murcia (ID: 2035/2018). La presente investigación se realizó bajo el compromiso del cumplimiento de las normas éticas de investigación y de los requerimientos legales necesarios para poder llevar a cabo este tipo de estudios. En todo momento se respetó la normativa vigente que garantiza la confidencialidad de los datos de carácter personal y su tratamiento automatizado de acuerdo con Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales, así como la Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica.

La aprobación para la realización de este estudio fue obtenida desde la Comisión de Ética de Investigación (CEI), del Comité de Bioseguridad en Experimentación (CBE) y de Protección de Datos de la Universidad de Murcia (España).

3.2. Objetivo 2

A continuación, pasamos a exponer el material y los métodos correspondientes al objetivo 2.

3.2.1. Descripción y toma de la muestra

3.2.1.1. Dientes

Obtuvimos 11 dientes humanos sanos de sujetos de diferentes edades, entre los 19 y los 82 años (19, 24, 27, 35, 41, 50, 51, 53, 60, 65, 82 años) (Tabla 4) en la Clínica Odontológica de la Universidad de Murcia (Hospital Universitario Morales Meseguer, Murcia, España). Al igual que en el experimento anterior, se extrajeron debido a una enfermedad periodontal o a un tratamiento ortodóntico. Todos los sujetos firmaron un consentimiento informado para el uso de sus dientes en la presente investigación y se mantuvo en todo momento la confidencialidad de los individuos.

Tabla 4

Número de caso y edad (años) de los sujetos estudiados

Número de caso	Edad (años)
1	19
2	24
3	27
4	35
5	41
6	50
7	51
8	53
9	60
10	65
11	82

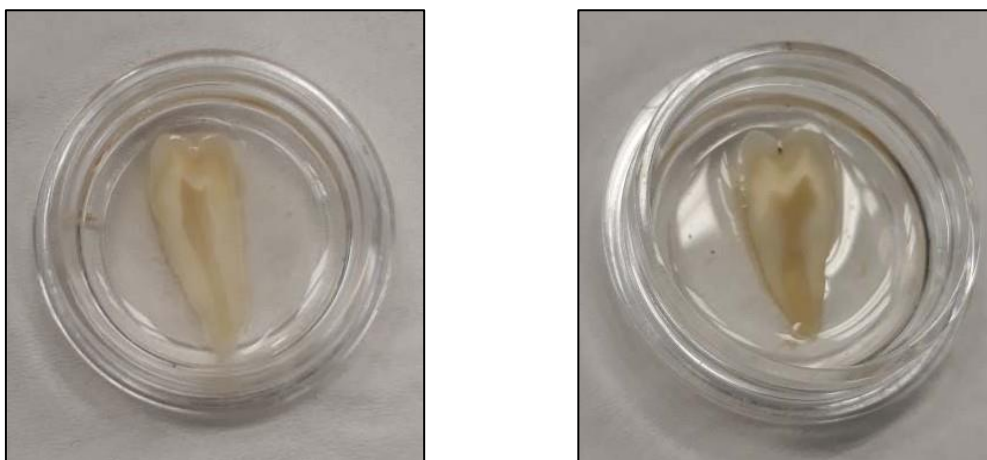
3.2.2. Procedimientos experimentales

3.2.2.1. Determinación de los componentes del diente y obtención del segmento del diente

Cada diente fue seccionado a lo largo de un corte longitudinal con un disco de diamante de grano medio (100 μm), montado en una pieza de mano (Komet-GEHR. BRASSELER GmbH & Co. KG) (Figura 17). A continuación, cada diente se sumergió en una solución tampón salina con fosfato al 0,9% (PBS) (Figura 25).

Figura 25

Sección longitudinal de diente



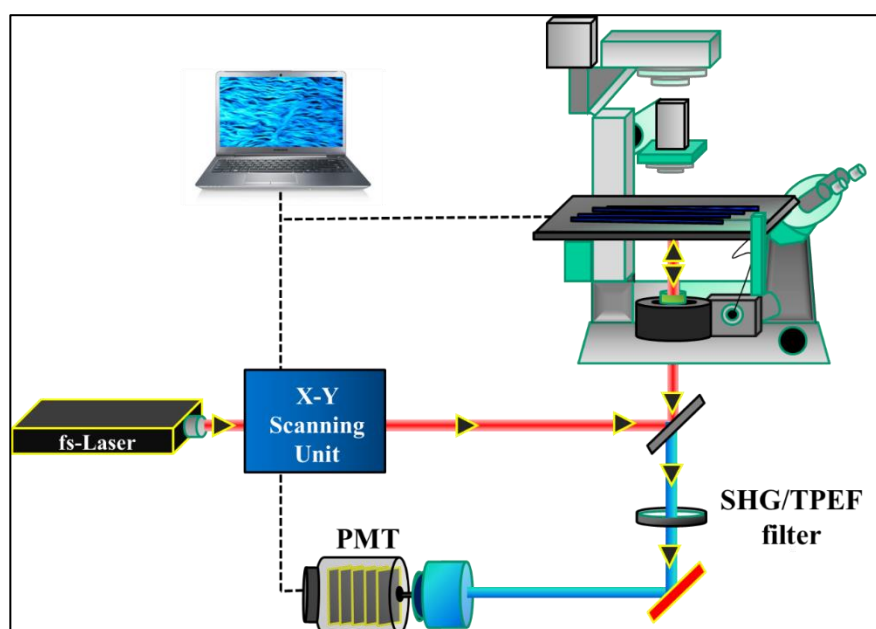
3.2.2.2. Sistema experimental. Microscopio multifotónico polarimétrico

Un microscopio multifotónico desarrollado en el Laboratorio de Óptica de la Universidad de Murcia (LOUM) (Bueno et al., 2010) se utilizó para llevar a cabo esta investigación.

La Figura 26 muestra un esquema explicativo del instrumento. Está compuesto por un microscopio invertido (Nikon TE2000-U, Nikon Corp., Tokyo, Japón) (Figura 27), que sirve como plataforma para el microscopio multifotónico y un láser de Titanio-Zafiro (Mira 900f, Coherent, St. Clara, CA, EEUU) (Figura 28), utilizado como sistema de iluminación, con un ancho de pulso emitido de 150 femtosegundos y una frecuencia de repetición de 76 MHz. Los pulsos ultracortos de luz infrarroja se fijaron en una longitud de onda de 800 nm. El microscopio invertido se fundamenta en el convencional, con la diferencia en que su estructura está invertida, es decir; la fuente de luz proviene desde arriba y la platina y el objetivo se encuentran por debajo de ella. En este tipo de microscopios es el objetivo y no la platina la que se mueve (Masters, 2014).

Figura 26

Esquema de microscopio multifotónico desarrollado en el Laboratorio de Óptica de la Universidad de Murcia



Nota. Figura extraída de Bueno et al. (2019) (p. 266).

Figura 27*Microscopio invertido***Figura 28***Láser de femtosegundos*

El haz del láser llega a la unidad de escaneo XY, después de atravesar un telescopio de Galileo (sirve para aumentar su diámetro), la unidad está conformada por dos espejos galvanométricos no resonantes (GSI, VM1000, Billerica, MA, EEUU), el sistema consiste en unir un espejo a una bobina sometida a un campo magnético. Cuando pasa una corriente eléctrica por la bobina, esta experimenta un momento proporcional a la intensidad del campo magnético y de la corriente y al número de espiras. Dependiendo de la resistencia que tenga, el espejo se moverá en un determinado ángulo de giro. El haz láser incide en el primer espejo dirigiendo el haz hacia el segundo espejo (Glastre et al., 2012), el sistema permite el escaneo de la muestra en un plano. Después de reflejarse en un espejo dicróico (ED), su función es reflejar luz en la banda de excitación y transmitir luz en la banda de

emisión (Leica, 2020), refleja el infrarrojo y transmite el visible, pasa por el objetivo del microscopio (Nikon ELWD Series; 20x, NA=0,5) y focaliza en la muestra.

Acoplado al objetivo se encuentra un motor (PI C-136, Karlsruhe, Alemania) que se mueve a lo largo del eje Z para controlar la ubicación de interés de la muestra y poder registrar imágenes a distintas profundidades.

La señal no lineal generada en la muestra se recoge por el mismo objetivo (20x, NA=0,5), pasa a través de un espejo dicróico para finalmente ser recogida por un tubo fotomultiplicador (R7205-01, Hamamatsu, Shizouka, Japón) conectado a una unidad contadora de fotones. Se usaron filtros espectrales paso alta (FGL435, 435-700 nm, Thorlabs Inc., Newton, NJ, EEUU) para aislar la señal TPEF ((un filtro paso alta, es un tipo de filtro que permite transmitir las frecuencias altas del espectro de una señal eliminando las componentes de baja frecuencia (Real Academia de Ingeniería, s.f.) y paso banda (FB400-10, 400±10 nm, Thorlabs, Inc., Newton, NJ, EEUU) para aislar la señal SHG antes de llegar al detector ((un filtro paso banda, es un tipo de filtro electrónico que permite transmitir una banda de frecuencias, eliminando las componente altas y bajas que la rodean (Real Academia de Ingeniería, s.f.).

El microscopio multifotónico está controlado por un software propio diseñado en LabView™ (National Instruments, Austin, TX, USA) en el Laboratorio de Óptica de la Universidad de Murcia (LOUM). El posterior procesamiento se llevó a cabo utilizando MatLab™ (The MathWorks, Inc., Natick, MA, EEUU).

3.2.2.3. Procedimiento experimental. Toma de imágenes

Para la obtención de las imágenes, las muestras se colocaron boca abajo sobre un pequeño contenedor con solución salina, de tal manera que el segmento estuviera en contacto con la base. Se analizaron ambas partes del diente (Figura 25).

Las imágenes fueron obtenidas a 1 Hz (1 imagen por segundo) y se registraron tanto para TPEF como para SHG con una resolución de 256 x 256 píxeles y un tamaño de 180 x 180 μm^2 .

Se registraron imágenes TPEF y SHG tanto de la unión esmalte-dentina como de la dentina. Para disminuir el ruido, la imagen final usada corresponde al promedio de 3 imágenes individuales.

Una vez realizado este proceso, el software proporciona los datos de intensidad mínima, máxima y total.

De cada imagen obtenida se seleccionaron cinco subáreas (tamaño de 50x50 μm^2)

y se calculó la intensidad total para cada una.

Se calculó la razón entre ambas intensidades para cada pareja de imágenes TPEF-SHG, tanto para cada subárea como para la imagen total (Ecuación 2)

$$(2) \quad R_{TS} = \frac{I_{TPEF}}{I_{SHG}}$$

Se calculó también el “índice de edad (IE)” (Ecuación 3). Definido como el valor absoluto de contraste de las señales SHG y TPEF. AGIN o SAAID (*SHG to autofluorescence aging index dermis*) es un parámetro previamente propuesto por Lin et al. (2005) y Tan et al. (2007), para cuantificar el fotoenvejecimiento de la piel y evaluar la destrucción estructural en el estroma corneal infectado, respectivamente.

$$(3) \quad SAAID = \left| \frac{I_{SHG} - I_{TPEF}}{I_{SHG} + I_{TPEF}} \right|$$

4. RESULTADOS

4.1. Objetivo 1

4.1.1. Análisis de la concentración de elementos traza en la dentina humana

Un total de 25 elementos traza fueron analizados en todas las muestras ($n = 150$) de dentina coronaria (Tabla 5, Tabla 6), se detectaron todos los elementos tóxicos y esenciales anteriormente mencionados. El elemento traza con la mayor concentración fue el Ca (con una media de $251937,1 \pm 3868,5 \mu\text{g/g}$ y un valor máximo de $411045,3 \mu\text{g/g}$) y el de concentración más baja fue el Cd (con una media $0,005 \pm 0,003 \mu\text{g/g}$).

A) Concentración de los elementos esenciales en el total de la muestra ($n = 150$)

Las concentraciones de los elementos esenciales fueron las siguientes, de mayor a menor concentración: $\text{Ca} > \text{P} > \text{Mg} > \text{Na} > \text{S} > \text{K} > \text{Sr} > \text{Zn} > \text{Ba} > \text{Fe} > \text{B} > \text{Ti} > \text{Mn} > \text{Cr} > \text{Ni} > \text{Cu} > \text{Co} > \text{Se} > \text{V}$. Los valores de las concentraciones de cada elemento están presentes en la Tabla 5 y la Figura 29 muestra las concentraciones medias de los elementos esenciales en el total de los dientes.

Tabla 5

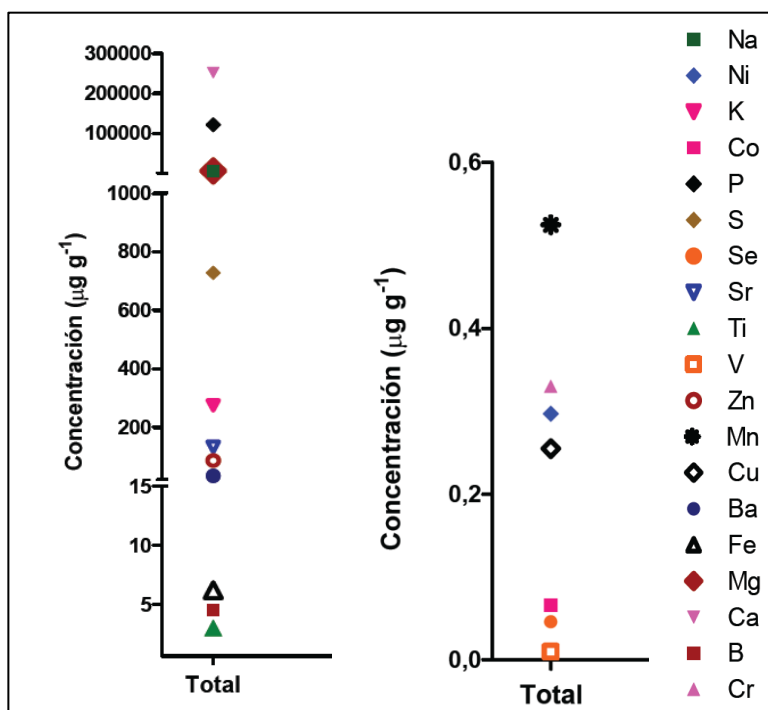
Valores de las concentraciones de los elementos esenciales en el total de la muestra ($n = 150$)

Elemento ($\mu\text{g/g}$)	Media aritmética \pm error estándar	Mediana	Mín.	Máx.	Asimetría	Curtosis
Ca	$251937,1 \pm 3868,5$	260921,7	117433,0	411045,3	-0,634	1,848
P	$122143,3 \pm 2092,7$	126740,6	10950,0	199553,6	-0,535	3,175
Mg	$6668,6 \pm 103,477$	6526,1	3622,1	10950,1	0,184	0,331
Na	$6354,8 \pm 104,114$	6565,9	2722,1	9954,4	-0,815	0,558
S	$727,833 \pm 137,158$	507,803	97,301	20587,0	11,305	133,5
K	$274,820 \pm 8,653$	253,035	134,7	852,348	2,591	8,459
Sr	$132,621 \pm 7,274$	121,198	0,649	477,697	0,591	0,778
Zn	$86,680 \pm 3,488$	98,820	0,725	148,590	-1,028	-0,138
Ba	$34,263 \pm 20,467$	2,363	0,090	2357,590	8,573	73,580
Fe	$6,228 \pm 0,854$	2,315	0,000	88,997	5,223	35,706
B	$4,354 \pm 1,773$	0,943	0,022	192,016	8,240	68,470
Ti	$3,017 \pm 0,158$	2,393	0,165	6,345	0,036	-1,696
Mn	$0,525 \pm 0,033$	0,413	0,140	2,630	2,841	10,060
Cr	$0,330 \pm 0,142$	0,010	0,000	19,690	9,719	104,500
Ni	$0,297 \pm 0,087$	0,053	0,010	11,699	8,913	90,450
Cu	$0,255 \pm 0,050$	0,087	0,002	6,164	7,098	62,175
Co	$0,066 \pm 0,007$	0,010	0,000	0,252	0,814	-1,104
Se	$0,046 \pm 0,007$	0,010	0,001	0,674	3,604	16,934
V	$0,010 \pm 0,001$	0,010	0,002	0,066	8,997	100,780

Nota. Mín., mínimo; Máx., máximo.

Figura 29

Concentraciones de los elementos esenciales analizados en la dentina humana, en el total de la muestra ($n = 150$)



Nota. Cada punto representa el valor de la concentración media de cada elemento.

B) Concentración de los elementos tóxicos en el total de la muestra ($n = 150$)

Las concentraciones de los elementos tóxicos fueron las siguientes, de mayor a menor concentración: Al > Pb > Sn > Li > As > Cd. Los valores de las concentraciones de cada elemento están presentes en la Tabla 6 y la Figura 30 muestra las concentraciones medias de los elementos tóxicos en el total de los dientes.

Tabla 6

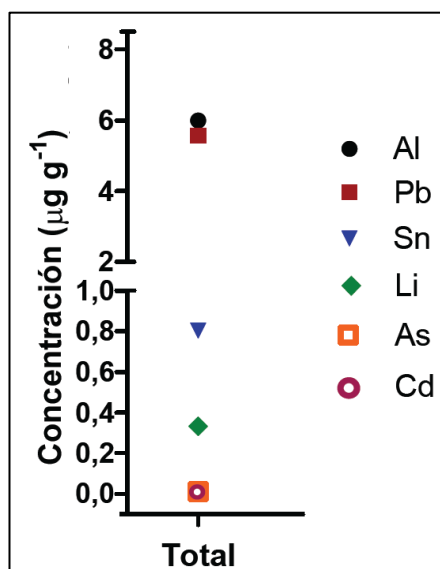
Valores de las concentraciones de los elementos tóxicos en el total de la muestra ($n = 150$)

Elemento ($\mu\text{g/g}$)	Media aritmética \pm error estándar	Mediana	Mín.	Máx.	Asimetría	Curtosis
Al	$5,999 \pm 2,029$	0,381	0,005	229,860	7,926	65,789
Pb	$5,570 \pm 0,662$	1,956	0,064	63,318	3,360	17,945
Sn	$0,804 \pm 0,105$	0,456	0,035	9,571	4,145	20,533
Li	$0,333 \pm 0,117$	0,185	0,000	17,731	12,037	146,530
As	$0,012 \pm 0,002$	0,010	0,000	0,248	9,525	101,092
Cd	$0,005 \pm 0,003$	0,001	0,001	0,385	11,345	133,171

Nota. Mín., mínimo; Máx. máximo.

Figura 30

Concentraciones de los elementos tóxicos analizados en la dentina humana, en el total de la muestra ($n = 150$)



Nota. Cada punto representa el valor de la concentración media de cada elemento.

4.1.2. Análisis de la concentración de elementos traza en la dentina humana en función de distintos parámetros

A) Elementos esenciales

a1) Concentración de los elementos esenciales en función del sexo

Respecto al sexo, hemos obtenido una disminución estadísticamente significativa en los niveles de Na en hombres ($6180,7 \pm 161,037 \mu\text{g/g}$) respecto al de mujeres ($6481,0 \pm 135,650 \mu\text{g/g}$; $p = 0,032$) al igual que en el Co ($0,049 \pm 0,009 \mu\text{g/g}$ en hombres y en mujeres $0,079 \pm 0,009 \mu\text{g/g}$; $p = 0,024$). Un aumento estadísticamente significativo hemos encontrado en K ($309,082 \pm 17,931 \mu\text{g/g}$; $p = 0,019$), Ba ($76,475 \pm 48,425 \mu\text{g/g}$; $p = 0,045$) y Ni ($0,445 \pm 0,201 \mu\text{g/g}$; $p = 0,048$) en los niveles de los hombres comparados con los niveles medidos en las mujeres. Del resto de elementos, fueron observadas concentraciones similares. La Tabla 7 muestra las concentraciones de cada elemento analizado en hombres y mujeres y la Figura 31 presenta las concentraciones medias de los elementos esenciales que manifiestan diferencias significativas en función del sexo.

Tabla 7

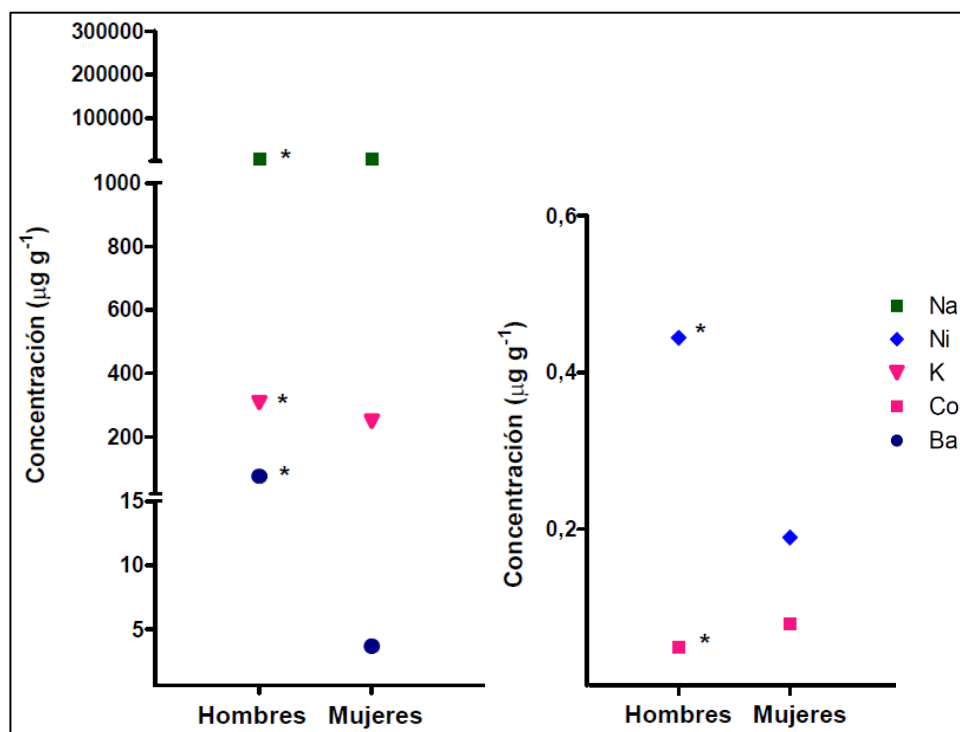
Valores de las concentraciones de los elementos esenciales en función del sexo

Elemento $\mu\text{g/g}$	Sexo	Media aritmética \pm error estándar	Mediana	Mín.	Máx.	Asimetría	Curtosis	p
Ca	Hombre	255577,8 \pm 6348,4	255316,3	117433,3	411045,3	-0,177	2,248	0,768
	Mujer	249301,4 \pm 4844,7	261665,6	135055,9	372119,8	-1,147	1,342	
P	Hombre	123912,5 \pm 3758,6	126444,8	10950,0	199553,6	-0,550	3,737	0,590
	Mujer	120862,0 \pm 2379,3	127036,5	68431,2	190904,5	-0,627	0,997	
Mg	Hombre	6880,1 \pm 166,024	6971,6	4005,4	10950,14	0,327	0,553	0,135
	Mujer	6515,4 \pm 130,175	6328,3	3622,1	9916,6	-0,002	-0,017	
Na	Hombre	6180,7 \pm 161,037	6422,4	2722,1	9954,4	-0,563	1,313	0,032
	Mujer	6481,0 \pm 135,650	6695,9	3491,6	8467,6	-1,039	0,333	
S	Hombre	986,681 \pm 324,209	533,440	97,301	20587,1	7,390	56,695	0,097
	Mujer	540,398 \pm 18,693	494,609	191,621	1219,8	1,557	4,123	
K	Hombre	309,082 \pm 17,931	266,965	134,753	852,348	1,835	3,341	0,019
	Mujer	250,011 \pm 6,225	244,326	152,996	511,788	1,642	4,731	
Sr	Hombre	132,909 \pm 12,196	122,826	0,649	388,405	0,249	-0,596	0,716
	Mujer	132,413 \pm 8,968	119,569	3,332	477,697	0,972	2,502	
Zn	Hombre	83,059 \pm 6,254	100,799	0,725	148,590	-0,730	-1,000	0,745
	Mujer	89,303 \pm 3,966	98,121	3,700	148,164	-1,338	1,041	
Ba	Hombre	76,475 \pm 48,425	2,677	0,090	2357,59	5,483	29,458	0,045
	Mujer	3,696 \pm 1,115	2,162	0,888	98,277	8,965	82,248	
Fe	Hombre	5,692 \pm 1,455	2,367	0	88,997	6,277	45,043	0,948
	Mujer	6,616 \pm 1,035	2,064	0	72,204	4,015	24,226	
B	Hombre	7,650 \pm 4,163	0,957	0,030	192,016	5,405	28,383	0,895
	Mujer	1,968 \pm 0,427	0,928	0,022	33,398	6,124	45,884	
Ti	Hombre	3,214 \pm 0,231	3,640	0,289	6,345	-0,106	-1,634	0,242
	Mujer	2,874 \pm 0,215	2,112	0,165	6,028	0,151	-1,736	
Mn	Hombre	0,526 \pm 0,049	0,438	0,149	2,595	3,133	13,245	0,466
	Mujer	0,525 \pm 0,045	0,380	0,140	2,630	2,710	8,870	
Cr	Hombre	0,545 \pm 0,321	0,011	0	19,690	7,139	53,583	0,260
	Mujer	0,174 \pm 0,078	0,010	0,001	6,198	7,382	58,701	
Ni	Hombre	0,445 \pm 0,201	0,067	0,010	11,699	6,267	42,265	0,048
	Mujer	0,189 \pm 0,037	0,052	0,010	1,470	2,023	2,690	
Cu	Hombre	0,377 \pm 0,114	0,088	0,002	6,164	4,949	28,464	0,392
	Mujer	0,167 \pm 0,021	0,086	0,003	0,715	1,106	0,175	
Co	Hombre	0,049 \pm 0,009	0,010	0	0,229	1,389	0,344	0,024
	Mujer	0,079 \pm 0,009	0,010	0,001	0,252	0,496	-1,577	
Se	Hombre	0,048 \pm 0,014	0,010	0,001	0,674	3,977	18,804	0,272
	Mujer	0,044 \pm 0,008	0,010	0,001	0,341	2,438	5,159	
V	Hombre	0,010 \pm 0,001	0,010	0,002	0,066	6,944	52,87	0,170
	Mujer	0,009 \pm 0,000	0,010	0,003	0,018	-1,487	5,901	

Nota. Mín., mínimo; Máx., máximo; p , p -valor. Un análisis estadístico fue realizado usando el test de Mann-Whitney, a partir de $p < 0,05$, se consideró estadísticamente significativo, resaltado en negrita.

Figura 31

Concentraciones de los elementos esenciales en la dentina humana, en hombres y en mujeres



Nota. Cada punto representa el valor de la concentración media de cada elemento. Un análisis estadístico fue realizado usando el test de Mann-Whitney. A partir de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

El sodio, potasio, bario, níquel y cobalto son los únicos elementos esenciales que presentan variabilidad en función del sexo, siendo el sodio y cobalto más elevados en mujeres y el potasio, bario y níquel más altos en hombres.

a2) Concentración de los elementos esenciales en función del rango de edad en el total de la muestra (n = 150)

De los 19 elementos esenciales analizados, solo 9: Mg, S, K, Sr, Zn, Ba, B, Co y V tenían una relación significativa con la edad ($p < 0,05$), como podemos observar en la Tabla 8 y en la Figura 32.

En el total de los dientes las mayores concentraciones de los elementos esenciales se encontraron siguiendo el orden de concentración: Ca > P > Mg > Na > S > K > Sr > Zn > Ba, como hemos indicado anteriormente. Con respecto a la edad, pequeñas diferencias fueron encontradas en el grupo I (<30 años) y grupo II (30-50 años) donde los niveles de Mg y Na fueron similares. En el grupo III (>50 años) la concentración de Ba mayor que Zn.

Tabla 8

Valores de las concentraciones de los elementos esenciales en función del rango de edad en el total de la muestra ($n = 150$)

Elemento $\mu\text{g/g}$	Rango de edad (años)	Media aritmética \pm error estándar	Mediana	Mín.	Máx.	Asimetría	Curtosis	p
Ca	Menor de 30	246736,9 \pm 7070,5	261572,9	117433,3	411045,3	-0,577	1,543	0,969
	30-50	250220,0 \pm 6284,2	260959,1	140128,8	314764,4	-1,588	1,871	
	Mayor de 50	259458,4 \pm 6451,1	257860,5	150240,4	372119,8	0,047	1,955	
P	Menor de 30	118744,7 \pm 3912,3	125782,5	10950,0	199232,1	-1,078	3,044	0,715
	30-50	120327,2 \pm 3046,0	127036,6	70044,7	152135,8	-1,091	0,534	
	Mayor de 50	127694,9 \pm 3574,9	127635,9	75745,9	199553,6	0,800	2,248	
Mg	Menor de 30	6279,9 \pm 151,451	6300,3	3622,1	8289,3	-0,507	-0,107	0,004
	30-50	6575,4 \pm 173,778	6328,3	4537,3	8979,4	0,129	-0,856	
	Mayor de 50	7198,5 \pm 191,512	7114,0	4687,2	10950,1	0,393	0,225	
Na	Menor de 30	6275,8 \pm 174,211	6491,6	2722,1	8196,6	-1,0	0,329	0,682
	30-50	6438,4 \pm 182,866	6668,1	3204,3	8467,6	-1,219	1,117	
	Mayor de 50	6368,6 \pm 186,610	6458,4	3365,2	9954,4	-0,332	0,728	
S	Menor de 30	479,542 \pm 16,936	483,275	97,301	754,798	-0,283	1,072	0,000
	30-50	549,762 \pm 23,586	499,197	242,283	987,0	0,685	0,332	
	Mayor de 50	1175,128 \pm 414,342	596,225	352,044	20587,07	6,529	44,202	
K	Menor de 30	237,928 \pm 5,633	228,369	134,753	345,29	0,283	0,004	0,000
	30-50	240,816 \pm 6,866	236,335	161,030	376,121	0,404	0,123	
	Mayor de 50	348,213 \pm 21,527	300,316	171,061	852,348	1,371	1,636	
Sr	Menor de 30	104,878 \pm 7,445	104,682	3,332	254,857	0,037	0,322	0,004
	30-50	139,686 \pm 9,866	141,735	7,862	269,428	-0,130	-0,128	
	Mayor de 50	157,840 \pm 17,771	186,975	0,649	477,697	0,193	-0,701	
Zn	Menor de 30	83,701 \pm 4,644	93,950	3,700	141,444	-1,325	1,048	0,038
	30-50	98,371 \pm 5,158	104,634	3,455	148,590	-1,646	2,874	
	Mayor de 50	79,348 \pm 7,811	110,021	0,725	146,607	-0,547	-1,51	
Ba	Menor de 30	2,268 \pm 0,145	1,942	0,090	6,270	1,627	4,403	0,002
	30-50	4,701 \pm 2,134	2,317	0,090	98,277	6,637	44,342	
	Mayor de 50	97,978 \pm 62,057	2,909	1,212	2357,378	4,799	22,309	
Fe	Menor de 30	7,751 \pm 1,721	3,599	0,261	88,997	4,785	29,133	0,602
	30-50	5,196 \pm 0,816	2,876	0,095	26,790	1,566	3,897	
	Mayor de 50	5,436 \pm 1,552	2,140	0,000	72,204	5,125	30,662	
B	Menor de 30	2,076 \pm 0,663	0,774	0,022	33,398	5,101	29,898	0,044
	30-50	1,426 \pm 0,289	0,870	0,030	9,749	2,993	10,319	
	Mayor de 50	9,646 \pm 5,324	1,308	0,030	192,016	4,746	21,568	

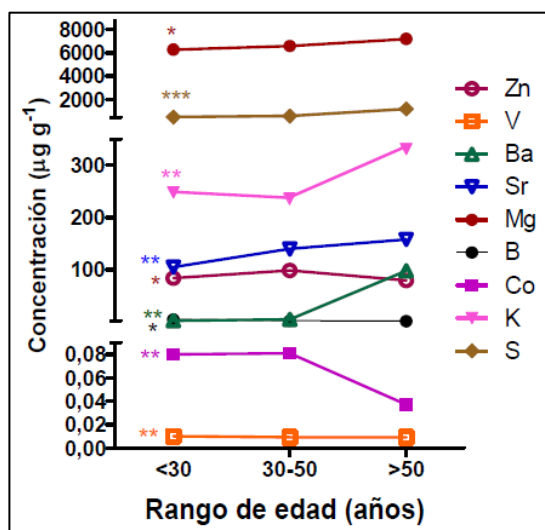
RESULTADOS

Elemento µg/g	Rango de edad (años)	Media aritmética ± error estándar	Mediana	Mín.	Máx.	Asimetría	Curtosis	<i>p</i>
Ti	Menor de 30	2,914 ± 0,261	2,134	0,289	5,606	0,116	-1,856	0,367
	30-50	2,856 ± 0,308	1,975	0,358	6,028	0,144	-1,785	
	Mayor de 50	3,281 ± 0,256	3,640	0,165	6,345	-0,109	-1,451	
Mn	Menor de 30	0,498 ± 0,053	0,393	0,157	2,595	3,381	14,0	0,105
	30-50	0,478 ± 0,054	0,365	0,149	2,016	2,556	7,655	
	Mayor de 50	0,600 ± 0,063	0,445	0,140	2,630	2,618	9,080	
Cr	Menor de 30	0,518 ± 0,366	0,010	0,001	19,690	6,648	46,069	0,199
	30-50	0,110 ± 0,027	0,011	0,000	0,805	2,274	5,152	
	Mayor de 50	0,316 ± 0,122	0,013	0,004	4,535	3,840	15,043	
Ni	Menor de 30	0,437 ± 0,211	0,053	0,010	11,699	6,859	49,515	0,577
	30-50	0,174 ± 0,046	0,053	0,010	0,988	1,971	2,145	
	Mayor de 50	0,249 ± 0,107	0,052	0,010	5,112	5,911	38,054	
Cu	Menor de 30	0,182 ± 0,055	0,042	0,004	2,940	5,736	38,003	0,142
	30-50	0,340 ± 0,137	0,046	0,006	6,164	6,041	38,883	
	Mayor de 50	0,262 ± 0,060	0,144	0,002	2,432	3,427	15,003	
Co	Menor de 30	0,080 ± 0,012	0,010	0,001	0,252	0,533	-1,512	0,011
	30-50	0,081 ± 0,012	0,010	0,001	0,225	0,380	-1,684	
	Mayor de 50	0,037 ± 0,009	0,010	0,000	0,229	1,939	2,193	
Se	Menor de 30	0,047 ± 0,015	0,010	0,001	0,674	3,988	18,045	0,614
	30-50	0,057 ± 0,013	0,010	0,001	0,341	1,885	2,732	
	Mayor de 50	0,034 ± 0,009	0,010	0,001	0,298	2,906	8,550	
V	Menor de 30	0,010 ± 0,001	0,010	0,003	0,066	6,553	47,300	0,002
	30-50	0,009 ± 0,000	0,010	0,002	0,010	-3,038	8,850	
	Mayor de 50	0,009 ± 0,000	0,010	0,003	0,018	0,083	2,684	

Nota. Mín., mínimo; Máx., máximo; *p*, *p*-valor. Las comparaciones entre los distintos rangos de edad (<30, 30-50, >50 años) fueron realizadas con el test de Kruskal-Wallis. A partir de *p* < 0,05, se consideró estadísticamente significativo, resaltado en negrita.

Figura 32

Concentraciones de los elementos esenciales en la dentina humana y su relación con la edad



Nota. Cada punto representa el valor de la concentración media de cada elemento. Un análisis estadístico fue realizado usando el test de Kruskal-Wallis. A partir de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

En la Tabla 9 se observan las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de edad 2 a 2.

Tabla 9

Diferencias estadísticamente significativas entre valores de las concentraciones de los elementos esenciales en el total de la muestra (n = 150), en función de los grupos de edad

Variable	Grupos	p-valor
Total	I-II	Sr (0,004)
		Zn (0,006)
	I-III	Mg (0,001)
		S (0,000)
		K (0,000)
		Sr (0,008)
		Ba (0,001)
		B (0,019)
		Co (0,006)
	II-III	V (0,011)
		Mg (0,028)
		S (0,004)
		K (0,000)
		Ba (0,040)
		Co (0,013)
V (0,002)		

Nota. Las comparaciones entre los distintos rangos de edad: (I) Menor de 30 años (n = 56), (II) Entre 30 y 50 años (n = 45), (III) Mayor de 50 años (n = 49), fueron realizadas con el test de *Mann-Whitney*. A partir de $p < 0,05$, se consideró estadísticamente significativo.

a3) Concentración de los elementos esenciales en función del tipo de diente

Respecto al tipo de diente la concentración de los elementos esenciales P ($125868,1 \pm 1953,1 \mu\text{g/g}$; $p = 0,032$), Na ($6739,4 \pm 78,688 \mu\text{g/g}$; $p = 0,001$), Mn ($0,598 \pm 0,044 \mu\text{g/g}$; $p = 0,000$), fueron estadísticamente más altos en molares que en premolares, mientras que el Cr ($0,288 \pm 0,197 \mu\text{g/g}$; $p = 0,013$), Ni ($0,216 \pm 0,117 \mu\text{g/g}$; $p = 0,005$), Co ($0,054 \pm 0,007 \mu\text{g/g}$; $p = 0,010$) y V ($0,009 \pm 0,001 \mu\text{g/g}$; $p = 0,009$), fueron significativamente inferiores en los molares. Los valores de las concentraciones de cada elemento analizado están presentes en la Tabla 10 y la Figura 33 muestra las concentraciones medias de los elementos esenciales que exhiben diferencias significativas en función del tipo de diente: molar y premolar.

Tabla 10

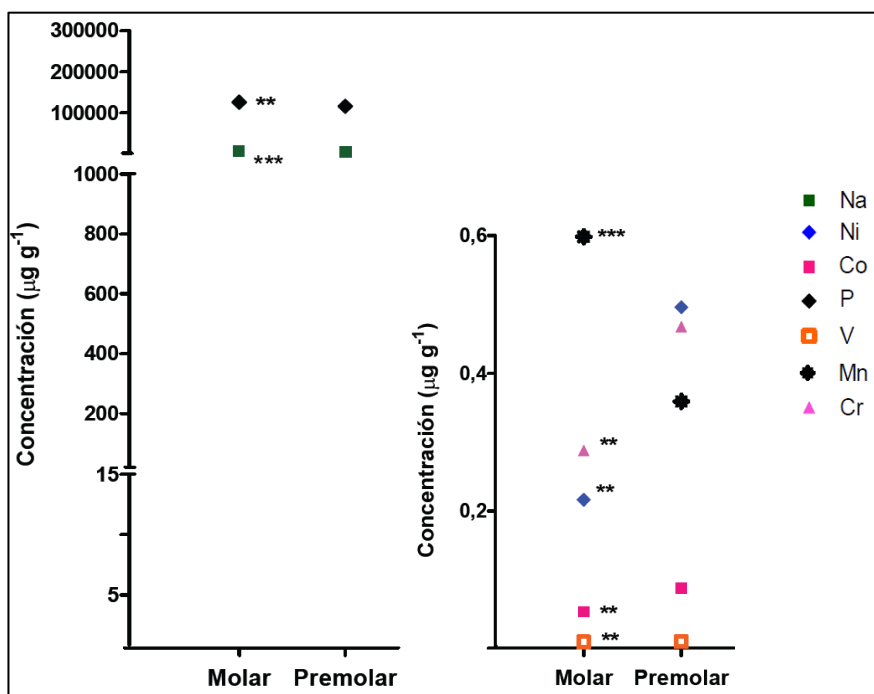
Valores de las concentraciones de los elementos esenciales en función del tipo de diente: molar y premolar

Elemento $\mu\text{g/g}$	Tipo de diente	Media aritmética \pm error estándar	Mediana	Mín.	Máx.	Asimetría	Curtosis	p
Ca	Molar	261757,9 \pm 2908,2	261665,6	151922,5	372119,8	-0,478	5,733	0,055
	Premolar	237326,7 \pm 11268,4	251305,0	135055,9	411045,3	0,193	0,235	
P	Molar	125868,1 \pm 1953,1	128222,6	10950,0	190904,5	-1,900	12,072	0,032
	Premolar	115820,6 \pm 5518,8	119889,3	68431,2	199553,6	0,615	0,945	
Mg	Molar	6762,7 \pm 104,829	6492,2	4352,8	9916,6	0,365	-0,082	0,903
	Premolar	6634,9 \pm 285,255	6745,7	3622,1	10950,1	0,120	0,069	
Na	Molar	6739,4 \pm 78,688	6734,2	3898,8	8252,3	-0,882	2,005	0,001
	Premolar	5929,3 \pm 275,691	6246,2	3491,6	9954,4	0,176	-0,283	
S	Molar	543,808 \pm 18,353	498,976	191,621	1219,8	1,535	3,519	0,103
	Premolar	1343,3 \pm 597,227	529,594	97,301	20587,1	5,438	30,622	
K	Molar	265,081 \pm 6,627	254,454	169,914	621,45	2,168	7,946	0,250
	Premolar	292,962 \pm 26,824	221,307	152,996	852,348	2,150	4,508	
Sr	Molar	133,045 \pm 9,099	128,642	3,332	477,697	0,574	0,921	0,516
	Premolar	146,521 \pm 14,052	136,384	0,649	388,405	0,771	1,088	
Zn	Molar	87,406 \pm 4,512	103,028	3,455	148,590	-1,022	-0,346	0,523
	Premolar	91,621 \pm 5,110	96,122	0,725	128,650	-1,662	3,076	
Ba	Molar	45,678 \pm 30,258	2,414	0,090	2357,6	7,083	49,568	0,383
	Premolar	5,894 \pm 2,864	1,873	1,212	98,277	5,466	30,789	
Fe	Molar	6,415 \pm 1,214	2,064	0	88,997	4,869	28,375	0,784
	Premolar	5,832 \pm 0,989	3,938	0,261	22,400	0,85	0,192	
B	Molar	5,025 \pm 2,607	0,818	0,022	192,016	6,941	47,432	0,076
	Premolar	2,845 \pm 1,008	1,202	0,030	33,398	4,598	23,408	
Ti	Molar	3,151 \pm 0,190	2,893	0,358	6,345	-0,062	-1,658	0,843
	Premolar	3,230 \pm 0,339	4,040	0,289	5,758	-0,198	-1,802	
Mn	Molar	0,598 \pm 0,044	0,448	0,172	2,630	2,720	8,681	0,000
	Premolar	0,359 \pm 0,035	0,296	0,140	1,179	2,333	6,829	
Cr	Molar	0,288 \pm 0,197	0,010	0,001	19,690	9,65	95,151	0,013
	Premolar	0,468 \pm 0,219	0,051	0,002	6,198	3,913	15,145	
Ni	Molar	0,216 \pm 0,117	0,050	0,010	11,699	9,532	93,665	0,005
	Premolar	0,497 \pm 0,156	0,070	0,010	5,112	4,145	20,752	
Cu	Molar	0,227 \pm 0,041	0,099	0,004	2,940	4,604	25,749	0,589
	Premolar	0,416 \pm 0,180	0,155	0,002	6,164	5,255	29,307	
Co	Molar	0,054 \pm 0,007	0,010	0	0,236	1,065	-0,612	0,010
	Premolar	0,087 \pm 0,016	0,010	0,003	0,252	0,470	-1,696	
Se	Molar	0,045 \pm 0,008	0,010	0,001	0,373	2,488	5,525	0,394
	Premolar	0,056 \pm 0,022	0,010	0,003	0,674	4,000	17,942	
V	Molar	0,009 \pm 0,001	0,010	0,002	0,066	7,708	71,507	0,009
	Premolar	0,010 \pm 0,000	0,010	0,006	0,011	-4,369	25,679	

Nota. Mín., mínimo; Máx., máximo; p , p -valor. Un análisis estadístico fue realizado usando el test de Mann-Whitney, a partir de $p < 0,05$, se consideró estadísticamente significativo, resaltado en negrita.

Figura 33

Concentraciones de los elementos esenciales analizados en la dentina humana, en molares y premolares



Nota. Cada punto representa el valor de la concentración media de cada elemento. Un análisis estadístico fue realizado usando el test de Mann-Whitney. A partir de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Las concentraciones de fósforo, sodio, manganeso, cromo, níquel, cobalto y vanadio se asocian con la diferenciación en función del tipo de diente (molar o premolar), siendo el fósforo, sodio y el manganeso más elevado en molares y el cromo, níquel, cobalto y vanadio en premolares.

B) Elementos tóxicos

b1) Concentración de los elementos tóxicos en función del sexo

La concentración de Pb es el único elemento encontrado que fue significativamente más alto en hombres ($8,453 \pm 0,977 \mu\text{g/g}$) respecto a las mujeres ($3,483 \pm 0,831 \mu\text{g/g}$, $p = 0,000$). Al igual que para el Al, las concentraciones en los hombres ($9,595 \pm 4,734 \mu\text{g/g}$) fueron más altas que para los dientes de las mujeres ($3,394 \pm 0,635 \mu\text{g/g}$) pero en este caso las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p = 0,590$). La Tabla 11 muestra las concentraciones de cada elemento analizado en hombres y mujeres y la Figura 34 presenta las concentraciones medias de los elementos tóxicos en función del sexo.

Tabla 11

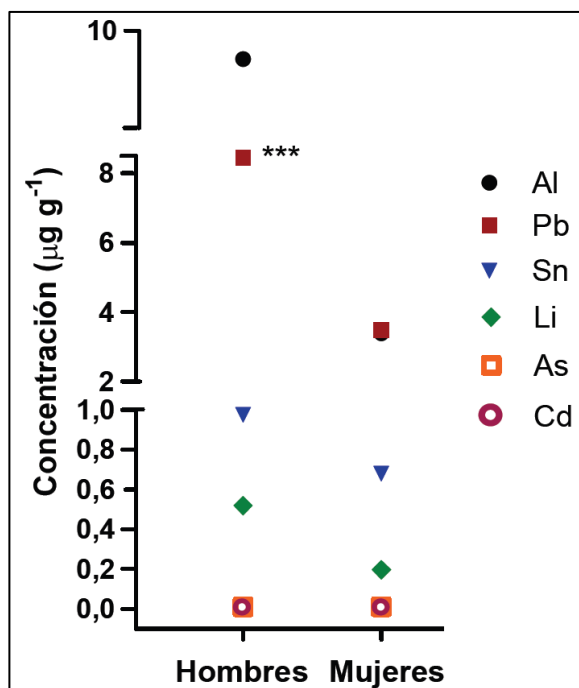
Valores de las concentraciones de los elementos tóxicos en función del sexo

Elemento $\mu\text{g/g}$	Sexo	Media aritmética \pm error estándar	Mediana	Mín.	Máx.	Asimetría	Curtosis	p
Al	Hombre	9,596 \pm 4,734	0,359	0,005	229,868	5,308	28,071	0,590
	Mujer	3,394 \pm 0,635	0,392	0,005	27,327	2,290	5,495	
Pb	Hombre	8,453 \pm 0,977	7,638	0,064	36,903	1,282	2,368	0,000
	Mujer	3,483 \pm 0,831	1,044	0,125	63,318	5,797	41,875	
Sn	Hombre	0,975 \pm 0,183	0,532	0,035	6,885	2,908	8,389	0,151
	Mujer	0,680 \pm 0,123	0,377	0,036	9,571	5,837	42,560	
Li	Hombre	0,520 \pm 0,278	0,190	0	17,731	7,860	62,166	0,128
	Mujer	0,198 \pm 0,014	0,180	0,002	0,622	0,987	1,059	
As	Hombre	0,011 \pm 0,002	0,010	0,001	0,096	5,52	34,224	0,780
	Mujer	0,012 \pm 0,003	0,010	0	0,248	8,762	79,655	
Cd	Hombre	0,002 \pm 0,000	0,001	0,001	0,010	2,873	7,338	0,578
	Mujer	0,007 \pm 0,005	0,001	0,001	0,385	8,652	77,298	

Nota. Mín., mínimo; Máx., máximo; p , p -valor. Un análisis estadístico fue realizado usando el test de Mann-Whitney, a partir de $p < 0,05$, se consideró estadísticamente significativo, resaltado en negrita.

Figura 34

Concentraciones de los elementos tóxicos analizados en la dentina humana, en hombres y en mujeres



Nota. Cada punto representa el valor de la concentración media de cada elemento. Un análisis estadístico fue realizado usando el test de Mann-Whitney. A partir de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

El único elemento tóxico estadísticamente significativo en función del sexo es el plomo, siendo sus concentraciones superiores en el caso de los hombres.

b2) Concentración de los elementos tóxicos en función del rango de edad en el total de la muestra (n = 150)

En el total de los dientes, el orden de mayor a menor concentración de los elementos tóxicos, tanto para el grupo I (<30 años) como para el grupo II (30-50 años) fue Al > Pb > Sn > Li > As > Cd, mientras que para el grupo III (>50 años) los niveles de Pb fueron más altos que el Al, como podemos observar en la Tabla 12 y en la Figura 35.

Tabla 12

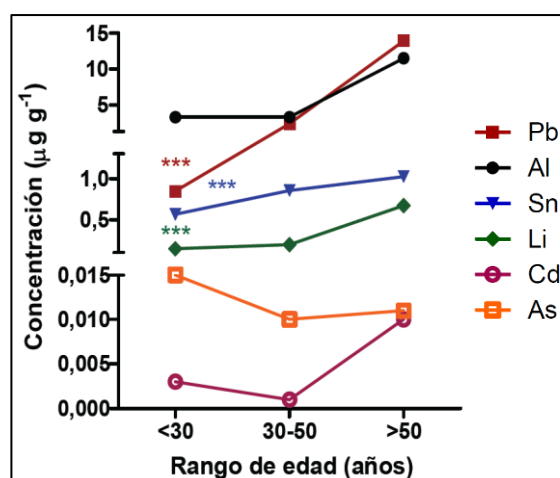
Valores de las concentraciones de los elementos tóxicos en función del rango de edad en el total de la muestra (n = 150)

Elemento µg/g	Rango de edad (años)	Media aritmética ± error estándar	Mediana	Mín.	Máx.	Asimetría	Curtosis	<i>p</i>
Al	Menor de 30	3,329 ± 0,766	0,119	0,005	27,180	2,059	4,545	0,314
	30-50	3,322 ± 0,862	0,505	0,005	27,327	2,340	6,083	
	Mayor de 50	11,509 ± 6,064	0,425	0,005	229,868	4,664	21,356	
Pb	Menor de 30	0,848 ± 0,145	0,449	0,064	5,50	2,778	8,526	0,000
	30-50	2,377 ± 0,342	1,373	0,282	9,511	1,686	1,973	
	Mayor de 50	13,900 ± 1,367	11,729	4,062	63,318	3,342	14,833	
Sn	Menor de 30	0,568 ± 0,181	0,204	0,035	9,571	5,727	37,109	0,000
	30-50	0,857 ± 0,170	0,532	0,066	6,885	3,896	18,327	
	Mayor de 50	1,026 ± 0,188	0,663	0,049	6,652	2,969	9,029	
Li	Menor de 30	0,146 ± 0,015	0,129	0	0,496	1,072	1,397	0,000
	30-50	0,199 ± 0,018	0,184	0,002	0,635	1,238	3,430	
	Mayor de 50	0,672 ± 0,356	0,334	0,002	17,731	6,948	48,50	
As	Menor de 30	0,015 ± 0,004	0,010	0,002	0,248	7,207	53,071	0,215
	30-50	0,010 ± 0,001	0,010	0,000	0,053	3,716	17,450	
	Mayor de 50	0,011 ± 0,018	0,010	0,001	0,096	6,282	42,250	
Cd	Menor de 30	0,003 ± 0,002	0,001	0,001	0,095	7,450	55,648	0,943
	30-50	0,001 ± 0,000	0,001	0,001	0,005	2,787	7,147	
	Mayor de 50	0,010 ± 0,008	0,001	0,001	0,385	6,983	48,837	

Nota. Mín., mínimo; Máx., máximo; *p*, *p*-valor, a partir de $p < 0,05$, se consideró estadísticamente significativo, resaltado en negrita. Las comparaciones entre los distintos rangos de edad (<30, 30-50, >50 años) fueron realizadas con el test de Kruskal-Wallis.

Figura 35

Concentraciones de los elementos tóxicos en dentina y su relación con la edad



Nota. Cada punto representa el valor de la concentración media de cada elemento. Un análisis estadístico fue realizado usando el test de Mann-Whitney. A partir de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

En 3 de los 6 elementos tóxicos analizados, Pb, Sn y Li, hemos encontrado diferencias significativas en relación con los rangos de edad, produciéndose un incremento de las concentraciones de estos al aumentar el rango de edad.

En la Tabla 13 se observan las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de edad 2 a 2.

Tabla 13

Diferencias estadísticamente significativas entre valores de las concentraciones de los elementos tóxicos en el total de la muestra (n = 150)

Variable	Grupos	p-valor
Total	I-II	Pb (0,000)
		Sn (0,000)
		Li (0,006)
	I-III	Pb (0,000)
		Sn (0,000)
		Li (0,000)
	II-III	Pb (0,000)
		Li (0,000)

Nota. Las comparaciones entre los distintos rangos de edad: (I) Menor de 30 años (n = 56), (II) Entre 30 y 50 años (n = 45), (III) Mayor de 50 años (n = 49), fueron realizadas con el test de *Mann-Whitney*. A partir de $p < 0,05$, se consideró estadísticamente significativo.

b3) Concentración de los elementos tóxicos en función del tipo de diente

Similares concentraciones de los elementos tóxicos fueron detectadas en los molares y en los premolares, excepto en el aluminio, donde se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas. Los valores de las concentraciones de cada elemento analizado están presentes en la Tabla 14 y la Figura 36 muestra las concentraciones medias de los elementos tóxicos en función del tipo de diente: molar y premolar.

Tabla 14

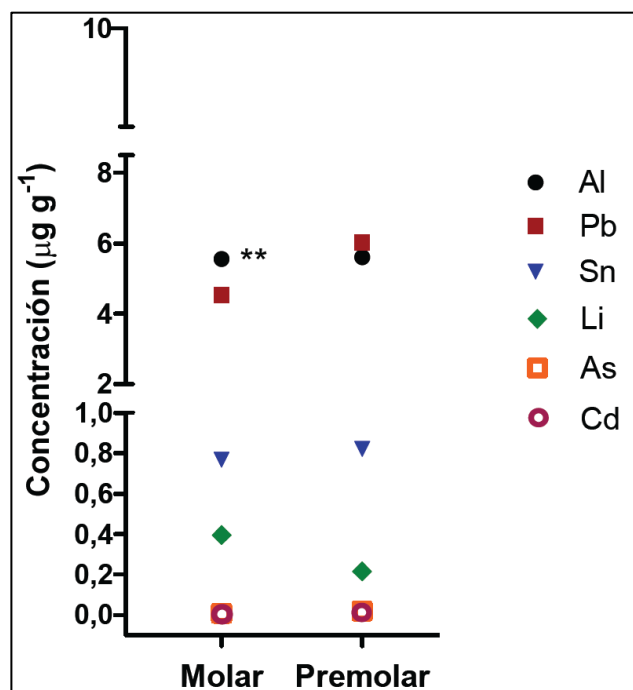
Valores de las concentraciones de los elementos tóxicos en función del tipo de diente: molar y premolar

Elemento µg/g	Tipo de diente	Media aritmética ± error estándar	Mediana	Mín.	Máx.	Asimetría	Curtosis	<i>p</i>
Al	Molar	5,553 ± 2,954	0,254	0,005	229,868	6,992	48,634	0,010
	Premolar	5,602 ± 1,371	1,105	0,005	27,327	1,544	1,610	
Pb	Molar	4,537 ± 0,641	1,221	0,064	36,903	2,445	7,935	0,085
	Premolar	6,028 ± 1,057	2,683	0,125	21,992	0,929	-0,193	
Sn	Molar	0,769 ± 0,131	0,439	0,035	9,571	4,670	25,243	0,847
	Premolar	0,822 ± 0,182	0,386	0,077	4,765	2,127	4,956	
Li	Molar	0,396 ± 0,773	0,197	0,002	17,731	9,950	99,649	0,376
	Premolar	0,217 ± 0,032	0,152	0,002	0,622	0,763	-0,517	
As	Molar	0,010 ± 0,000	0,010	0,001	0,023	0,197	5,871	0,368
	Premolar	0,019 ± 0,007	0,010	0	0,248	5,263	29,199	
Cd	Molar	0,002 ± 0,009	0,001	0,001	0,095	9,599	94,684	0,777
	Premolar	0,013 ± 0,011	0,001	0,001	0,385	5,830	33,991	

Nota. Mín., mínimo; Máx., máximo; *p*, *p*-valor. Un análisis estadístico fue realizado usando el test de Mann-Whitney, a partir de $p < 0,05$, se consideró estadísticamente significativo, resaltado en negrita.

Figura 36

Concentraciones de los elementos tóxicos analizados en la dentina humana, en molares y premolares



Nota. Cada punto representa el valor de la concentración media de cada elemento. Un análisis estadístico fue realizado usando el test de Mann-Whitney. A partir de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

El aluminio ha resultado ser el único elemento tóxico estadísticamente significativo siendo sus concentraciones más elevadas en el caso de los premolares.

4.1.3. Relación entre la concentración de los elementos traza en la dentina y la edad

A) Elementos esenciales

La concentración de los elementos esenciales en los tres rangos de edad (<30, 30-50, >50 años) fue analizada de acuerdo con el sexo y el tipo de diente: molar y premolar.

a1) Concentración de los elementos esenciales respecto al sexo en función del rango de edad

I) Concentración de los elementos esenciales en hombres en función del rango de edad

En hombres, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los siguientes elementos esenciales Mg, S, K, Ba y Co, en función de los distintos rangos de edad. La distribución de la concentración de estos elementos traza junto al resto de elementos analizados es presentada en la Tabla 15 y la Figura 37 muestra las concentraciones medias de los elementos esenciales en hombres que presentan diferencias significativas en función del rango de edad.

Tabla 15

Valores de las concentraciones de los elementos esenciales en hombres en función del rango de edad

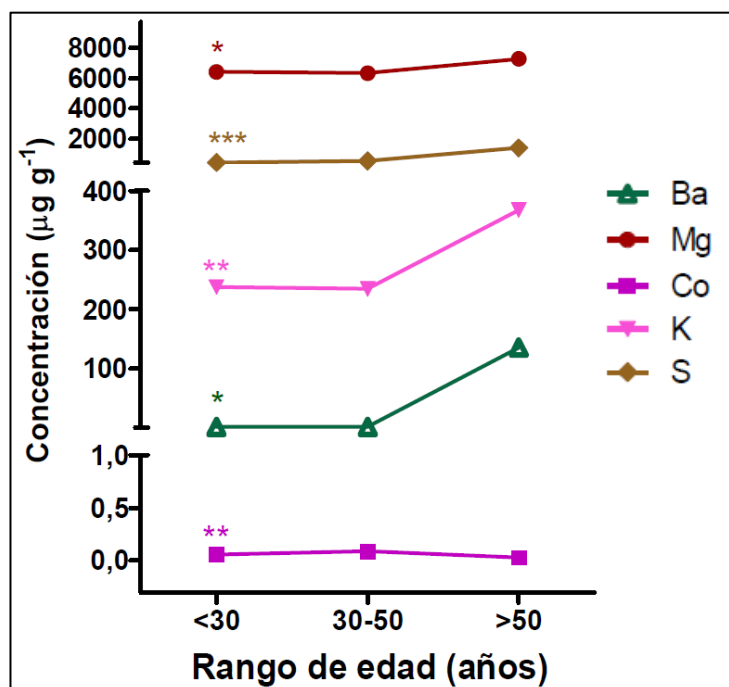
Elemento µg/g	Rango de edad (años)	Media aritmética ± error estándar	Mediana	Mín.	Máx.	Asimetría	Curtosis	<i>p</i>
Ca	Menor de 30	265734,8 ± 15380,0	263162,0	117433,3	411045,3	-0,090	4,412	0,318
	30-50	235161,8 ± 13856,3	251526,7	140128,8	284424,5	-1,183	-0,096	
	Mayor de 50	258807,9 ± 7695,1	251915,0	150240,4	366383,4	0,035	1,794	
P	Menor de 30	121608,6 ± 10754,1	127629,6	10950,0	199232,1	-1,260	3,639	0,813
	30-50	117593,7 ± 7051,0	128956,4	70044,7	147287,2	-1,019	-0,415	
	Mayor de 50	127246,8 ± 4314,4	124729,8	75745,8	199553,6	0,925	2,369	
Mg	Menor de 30	6417,2 ± 256,220	6560,1	4005,4	7760,6	-0,990	1,089	0,027
	30-50	6336,9 ± 368,049	6118,7	4537,3	8979,4	0,386	-0,427	
	Mayor de 50	7280,3 ± 224,714	7278,7	4687,2	10950,1	0,403	0,547	
Na	Menor de 30	6167,2 ± 290,807	6205,6	2722,1	7522,0	-2,056	6,353	0,749
	30-50	5795,9 ± 382,619	6437,3	3204,3	7310,8	-0,982	-0,439	
	Mayor de 50	6329,5 ± 220,760	6458,4	3365,2	9954,4	-0,096	1,110	
S	Menor de 30	433,339 ± 33,542	450,000	97,301	652,982	-1,145	2,532	0,001
	30-50	538,506 ± 36,161	499,197	271,944	768,882	-0,034	0,415	
	Mayor de 50	1390,3 ± 577,753	599,999	352,044	20587,1	5,531	31,65	
K	Menor de 30	237,828 ± 13,120	228,959	134,753	345,290	0,201	0,719	0,002
	30-50	234,374 ± 11,421	222,664	165,943	291,995	-0,001	-1,397	
	Mayor de 50	367,369 ± 27,981	317,946	171,061	852,348	1,172	0,826	
Sr	Menor de 30	124,139 ± 12,250	114,303	50,046	227,155	0,648	0,150	0,431
	30-50	109,871 ± 24,358	106,862	7,862	266,047	0,336	-0,913	
	Mayor de 50	145,224 ± 19,306	172,806	0,649	388,405	0,029	-1,098	
Zn	Menor de 30	98,757 ± 4,838	95,762	56,611	141,444	0,169	2,361	0,655
	30-50	76,095 ± 14,927	85,149	3,455	148,590	-0,429	-1,374	
	Mayor de 50	78,919 ± 9,534	110,285	0,725	146,114	-0,505	-1,636	

Elemento µg/g	Rango de edad (años)	Media aritmética ± error estándar	Mediana	Mín.	Máx.	Asimetría	Curtosis	<i>p</i>
Ba	Menor de 30	2,443 ± 0,372	2,159	0,090	6,033	0,887	1,630	0,031
	30-50	2,348 ± 0,358	2,347	0,090	4,812	0,446	0,522	
	Mayor de 50	135,736 ± 86,398	2,994	1,212	2357,59	3,998	15,126	
Fe	Menor de 30	11,364 ± 5,751	4,220	0,261	88,997	3,431	12,493	0,271
	30-50	5,094 ± 1,023	5,459	0,095	10,495	0,266	-1,421	
	Mayor de 50	3,484 ± 0,649	2,030	0	14,405	1,775	2,419	
B	Menor de 30	1,516 ± 0,906	0,757	0,030	14,016	3,683	13,936	0,169
	30-50	1,225 ± 0,313	1,041	0,030	3,377	0,576	-0,912	
	Mayor de 50	12,665 ± 7,420	1,023	0,030	192,016	3,954	14,579	
Ti	Menor de 30	3,414 ± 0,542	4,823	0,289	5,422	-0,481	-1,947	0,098
	30-50	2,151 ± 0,478	1,881	0,453	5,219	1,008	-0,384	
	Mayor de 50	3,522 ± 0,278	4,210	0,458	6,345	-0,224	-1,410	
Mn	Menor de 30	0,596 ± 0,157	0,407	0,157	2,595	2,962	9,20	0,444
	30-50	0,420 ± 0,074	0,396	0,149	1,218	2,365	7,199	
	Mayor de 50	0,535 ± 0,050	0,444	0,207	1,585	1,622	3,478	
Cr	Menor de 30	1,374 ± 1,309	0,010	0,001	19,69	3,867	14,967	0,086
	30-50	0,155 ± 0,056	0,038	0	0,652	1,541	1,886	
	Mayor de 50	0,335 ± 0,155	0,011	0,004	4,535	3,897	15,430	
Ni	Menor de 30	0,887 ± 0,774	0,067	0,010	11,699	3,847	14,853	0,857
	30-50	0,309 ± 0,110	0,069	0,010	0,988	0,984	-1,038	
	Mayor de 50	0,306 ± 0,148	0,067	0,010	5,112	5,160	28,486	
Cu	Menor de 30	0,357 ± 0,193	0,096	0,006	2,940	3,375	12,116	0,739
	30-50	0,607 ± 0,467	0,015	0,007	6,164	3,493	12,397	
	Mayor de 50	0,300 ± 0,081	0,149	0,002	2,432	3,058	11,378	
Co	Menor de 30	0,058 ± 0,018	0,010	0,004	0,161	0,740	-1,573	0,009
	30-50	0,089 ± 0,025	0,036	0,001	0,225	0,390	-1,785	
	Mayor de 50	0,030 ± 0,010	0,010	0	0,229	2,595	5,687	
Se	Menor de 30	0,102 ± 0,049	0,010	0,006	0,674	2,45	6,033	0,451
	30-50	0,027 ± 0,015	0,010	0,001	0,191	2,953	8,944	
	Mayor de 50	0,033 ± 0,011	0,010	0,001	0,298	3,005	9,363	
V	Menor de 30	0,014 ± 0,004	0,010	0,01	0,066	3,873	15,0	0,240
	30-50	0,008 ± 0,001	0,010	0,002	0,010	-1,005	-0,257	
	Mayor de 50	0,009 ± 0,000	0,010	0,004	0,014	-0,624	0,108	

Nota. Mín., mínimo; Máx., máximo; *p*, *p*-valor, a partir de $p < 0,05$, se consideró estadísticamente significativo, resaltado en negrita. Las comparaciones entre los distintos rangos de edad (<30, 30-50, >50 años) fueron realizadas con el test de Kruskal-Wallis.

Figura 37

Concentraciones de los elementos esenciales en hombres en función del rango de edad



Nota. Cada punto representa el valor de la concentración media de cada elemento. Un análisis estadístico fue realizado usando el test de Mann-Whitney. A partir de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Magnesio, azufre, potasio, bario y cobalto, son los únicos elementos que presentan diferencias estadísticamente significativas en los hombres en función de la edad. Aumentando sus concentraciones en el caso de magnesio, azufre, potasio, bario y disminuyendo a partir de los 50 años en el caso del cobalto.

En la Tabla 16 se observan las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de edad 2 a 2.

Tabla 16

Diferencias estadísticamente significativas entre valores de las concentraciones de los elementos esenciales en hombres en función de los grupos de edad

Variable	Grupos	p-valor
Hombres	I-II	Cr (0,025)
		Mg (0,030)
		S (0,002)
	I-III	K (0,005)
		Ba (0,041)
		Co (0,015)
		Mg (0,032)
	II-III	S (0,008)
		K (0,004)
		Ba (0,029)
		Ti (0,025)
		Co (0,012)

Nota. Las comparaciones entre los distintos rangos de edad: (I) Menor de 30 años (n = 15), (II) Entre 30 y 50 años (n = 13), (III) Mayor de 50 años (n = 35), fueron realizadas con el test de *Mann-Whitney*. A partir de $p < 0,05$, se consideró estadísticamente significativo.

II) Concentración de los elementos esenciales en mujeres en función del rango de edad

Para las mujeres se encontraron diferencias estadísticamente significativas para: K, Zn, Sr y V en función de los distintos rangos de edad. La distribución de la concentración de estos elementos traza junto al resto de elementos analizados es presentada en la Tabla 17 y la Figura 38 muestra las concentraciones medias de los elementos esenciales en mujeres en función del rango de edad.

Tabla 17

Valores de las concentraciones de los elementos esenciales en mujeres en función del rango de edad

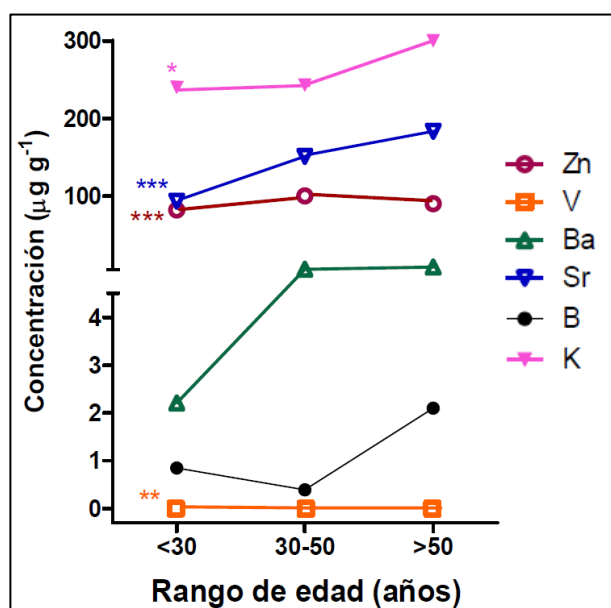
Elemento µg/g	Rango de edad (años)	Media aritmética ± error estándar	Mediana	Mín.	Máx.	Asimetría	Curtosis	<i>p</i>
Ca	Menor de 30	239786,5 ± 7687,0	261130,5	135055,9	298694,6	-1,146	-0,171	0,439
	30-50	256337,3 ± 6667,3	261453,9	143704,2	314764,4	-1,875	3,916	
	Mayor de 50	261084,8 ± 12262,3	263573,4	154402,2	372119,8	0,093	4,030	
P	Menor de 30	117696,9 ± 3719,4	124869,4	68431,2	152240,5	-0,910	-0,381	0,419
	30-50	121437,7 ± 3250,0	126548,8	71657,0	152135,8	-1,065	1,149	
	Mayor de 50	128815,3 ± 6581,7	128875,7	77043,9	190904,5	0,525	3,644	
Mg	Menor de 30	6229,7 ± 185,569	6268,1	3622,1	8289,3	-0,386	-0,244	0,274
	30-50	6672,3 ± 194,743	6351,6	4586,6	8664,4	0,096	-1,014	
	Mayor de 50	6993,8 ± 373,227	6690,3	4814,9	9916,6	0,467	0,023	
Na	Menor de 30	6315,5 ± 214,526	6576,4	3491,6	8196,6	-0,862	-0,413	0,436
	30-50	6699,5 ± 190,036	6886,6	3771,4	8467,6	-1,373	2,429	
	Mayor de 50	6466,4 ± 361,030	6582,0	3562,4	8252,3	-0,997	0,846	
S	Menor de 30	496,446 ± 19,182	493,908	191,621	754,798	0,048	0,292	0,196
	30-50	554,335 ± 30,040	499,987	242,283	987,0	0,767	0,159	
	Mayor de 50	637,259 ± 70,281	535,702	377,255	1219,76	1,738	2,105	
K	Menor de 30	237,964 ± 6,129	227,780	152,996	320,641	0,351	-0,516	0,029
	30-50	243,433 ± 8,533	245,308	161,030	376,121	0,456	0,295	
	Mayor de 50	300,325 ± 24,952	275,223	196,774	511,788	1,054	0,497	
Sr	Menor de 30	97,831 ± 8,958	101,706	3,332	254,857	0,051	0,285	0,000
	30-50	151,799 ± 9,198	151,491	55,172	269,428	0,395	-0,148	
	Mayor de 50	189,378 ± 39,202	204,254	6,670	477,697	0,161	-0,677	
Zn	Menor de 30	78,194 ± 5,889	92,662	3,70	126,560	-1,123	0,030	0,001
	30-50	107,421 ± 2,987	107,588	69,459	148,164	0,102	0,252	
	Mayor de 50	80,422 ± 13,925	101,422	3,852	146,607	-0,752	-1,137	
Ba	Menor de 30	2,204 ± 0,147	1,934	0,888	6,270	2,222	7,911	0,120
	30-50	5,656 ± 2,995	2,292	1,366	98,277	5,616	31,676	
	Mayor de 50	3,5848 ± 0,916	2,412	1,374	14,524	2,821	8,941	
Fe	Menor de 30	6,429 ± 1,080	1,962	0,282	25,783	1,117	0,574	0,443
	30-50	5,238 ± 1,079	1,586	0,298	26,790	1,599	3,457	
	Mayor de 50	10,317 ± 5,080	2,355	0	72,204	3,034	9,985	
B	Menor de 30	2,281 ± 0,847	0,818	0,022	33,398	5,063	28,473	0,235
	30-50	1,508 ± 0,387	0,840	0,030	9,749	2,867	8,517	
	Mayor de 50	2,099 ± 0,393	2,301	0,030	4,382	0,078	-1,332	
Ti	Menor de 30	2,732 ± 0,296	1,962	0,414	5,606	0,327	-1,719	0,786
	30-50	3,142 ± 0,379	4,135	0,358	6,028	-0,149	-1,860	
	Mayor de 50	2,679 ± 0,550	1,998	0,165	5,758	0,397	-1,510	
Mn	Menor de 30	0,462 ± 0,045	0,376	0,173	1,522	2,262	5,126	0,159
	30-50	0,501 ± 0,069	0,350	0,154	2,016	2,483	7,002	
	Mayor de 50	0,763 ± 0,181	0,638	0,140	2,630	1,963	4,043	

Elemento $\mu\text{g/g}$	Rango de edad (años)	Media aritmética \pm error estándar	Mediana	Mín.	Máx.	Asimetría	Curtosis	p
Cr	Menor de 30	0,205 \pm 0,150	0,010	0,002	6,198	6,337	40,413	0,390
	30-50	0,092 \pm 0,031	0,010	0,001	0,805	2,847	8,895	
	Mayor de 50	0,268 \pm 0,191	0,022	0,010	2,705	3,531	12,786	
Ni	Menor de 30	0,272 \pm 0,065	0,052	0,010	1,470	1,417	0,486	0,428
	30-50	0,119 \pm 0,044	0,053	0,010	0,950	2,887	6,958	
	Mayor de 50	0,107 \pm 0,060	0,042	0,010	0,880	3,532	12,819	
Cu	Menor de 30	0,118 \pm 0,023	0,028	0,004	0,637	1,588	2,550	0,090
	30-50	0,232 \pm 0,042	0,132	0,006	0,715	0,595	-1,045	
	Mayor de 50	0,165 \pm 0,049	0,086	0,003	0,513	0,933	-0,518	
Co	Menor de 30	0,088 \pm 0,015	0,010	0,001	0,252	0,396	-1,731	0,511
	30-50	0,078 \pm 0,014	0,010	0,003	0,216	0,371	-1,805	
	Mayor de 50	0,055 \pm 0,021	0,010	0,001	0,202	1,118	-0,773	
Se	Menor de 30	0,027 \pm 0,009	0,010	0,001	0,306	3,820	14,488	0,192
	30-50	0,069 \pm 0,017	0,010	0,007	0,341	1,607	1,599	
	Mayor de 50	0,034 \pm 0,015	0,010	0,002	0,216	2,866	8,897	
V	Menor de 30	0,009 \pm 0,004	0,010	0,003	0,010	-1,834	1,634	0,008
	30-50	0,010 \pm 0,001	0,010	0,003	0,018	0,468	4,154	
	Mayor de 50	0,010 \pm 0,001	0,010	0,003	0,017	0,068	2,121	

Nota. Mín., mínimo; Máx., máximo; p , p -valor, a partir de $p < 0,05$, se consideró estadísticamente significativo, resaltado en negrita. Las comparaciones entre los distintos rangos de edad (<30, 30-50, >50 años) fueron realizadas con el test de Kruskal-Wallis.

Figura 38

Concentraciones de los elementos esenciales en mujeres en función del rango de edad



Nota. Cada punto representa el valor de la concentración media de cada elemento. Un análisis estadístico fue realizado usando el test de Mann-Whitney. A partir de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Potasio, zinc, estroncio y vanadio, son los únicos elementos esenciales cuya concentración difiere según el rango de edad en mujeres. El potasio y estroncio aumentan significativamente con la edad, el zinc disminuye a partir de los 50 años y el vanadio con pequeñas concentraciones aumenta hasta el grupo de los 50 años.

En la Tabla 18 se observan las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de edad 2 a 2.

Tabla 18

Diferencias estadísticamente significativas entre valores de las concentraciones de los elementos esenciales en mujeres en función de los grupos de edad

Variable	Grupos	p-valor
Mujeres	I-II	Sr (0,000)
		Zn (0,000)
		Cu (0,028)
		V (0,009)
	I-III	K (0,009)
		Sr (0,011)
	II-III	K (0,028)
V (0,001)		

Nota. Las comparaciones entre los distintos rangos de edad: (I) Menor de 30 años (n = 41), (II) Entre 30 y 50 años (n = 32), (III) Mayor de 50 años (n = 14), fueron realizadas con el test de *Mann-Whitney*. A partir de $p < 0,05$, se consideró estadísticamente significativo

a2) Concentración de los elementos esenciales respecto al tipo de diente en función del rango de edad

I) Concentración de los elementos esenciales en molares en función del rango de edad

Realizamos un análisis de las concentraciones de acuerdo con el tipo de diente identificado. La distribución de la concentración de estos elementos traza aparece representada en la Tabla 19. La Figura 39 muestra un análisis de las concentraciones medias de los elementos esenciales en molares que presentan diferencias estadísticamente significativas en función del rango de edad.

Encontramos concentraciones significativamente superiores en función de la edad de Ba, B, Mn y Sr en molares. El Co aumenta hasta los 50 años, disminuyendo en el grupo posterior.

Tabla 19

Valores de las concentraciones de los elementos esenciales en molares en función del rango de edad

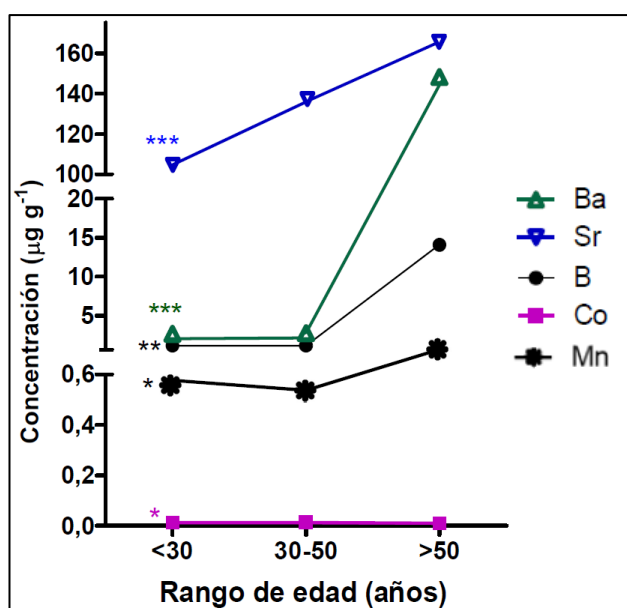
Elemento µg/g	Rango de edad (años)	Media aritmética ± error estándar	Mediana	Mín.	Máx.	Asimetría	Curtosis	<i>p</i>
Ca	Menor de 30	260321,8 ± 4039,8	262677,6	164511,581	303710,875	-1,486	5,440	0,966
	30-50	260312,8 ± 4408,0	261065,4	154493,493	314764,366	-1,746	8,461	
	Mayor de 50	265166,8 ± 6897,3	261710,6	151922,487	372119,816	0,181	3,991	
P	Menor de 30	124011,4 ± 3767,9	125850,8	10950,000	152240,506	-3,525	16,711	0,503
	30-50	124441,8 ± 2507,8	127577,6	79754,988	152135,849	-0,754	1,386	
	Mayor de 50	129774,7 ± 3699,1	131232,0	78938,678	190904,462	0,464	2,640	
Mg	Menor de 30	6571,9 ± 143,235	6378,0	4352,827	8289,290	-0,069	-0,061	0,125
	30-50	6662,1 ± 189,933	6296,7	4666,758	8979,409	0,366	-0,703	
	Mayor de 50	7112,1 ± 208,533	7111,8	5138,556	9916,572	0,375	-0,022	
Na	Menor de 30	6840,2 ± 130,354	6734,2	4445,503	8196,644	-0,600	0,890	0,364
	30-50	6767,3 ± 126,187	6847,9	3898,845	8062,850	-1,687	6,160	
	Mayor de 50	6583,5 ± 155,021	6599,8	4172,901	8252,264	-0,616	1,312	
S	Menor de 30	483,457 ± 21,326	486,115	191,621	754,798	0,045	0,142	0,088
	30-50	547,396 ± 25,781	503,398	271,944	838,612	0,591	-0,468	
	Mayor de 50	614,173 ± 45,066	527,425	352,044	1219,76	1,486	1,397	
K	Menor de 30	251,136 ± 5,990	252,560	196,798	345,290	0,599	-0,074	0,053
	30-50	248,006 ± 7,768	245,308	169,914	376,121	0,476	0,371	
	Mayor de 50	301,630 ± 17,644	268,163	188,513	621,450	1,432	2,734	
Sr	Menor de 30	104,096 ± 10,215	104,540	3,332	254,857	0,004	0,128	0,008
	30-50	136,363 ± 11,628	143,149	7,862	269,428	-0,375	-0,334	
	Mayor de 50	164,989 ± 23,575	181,669	5,609	477,697	0,184	-0,572	
Zn	Menor de 30	83,978 ± 6,714	96,459	3,700	141,444	-1,278	0,285	0,201
	30-50	97,601 ± 6,615	106,444	3,455	148,590	-1,556	2,032	
	Mayor de 50	80,078 ± 10,220	110,349	3,852	146,144	-0,528	-1,599	
Ba	Menor de 30	2,127 ± 0,137	2,028	0,090	4,064	0,220	0,463	0,000
	30-50	2,604 ± 0,207	2,304	0,090	6,130	0,816	1,181	
	Mayor de 50	148,206 ± 100,564	2,986	1,238	2357,590	3,712	12,775	
Fe	Menor de 30	7,951 ± 2,517	1,826	0,282	88,997	4,388	22,649	0,935
	30-50	5,154 ± 0,975	2,650	0,298	26,790	1,851	4,961	
	Mayor de 50	5,951 ± 2,456	1,957	0,000	72,204	4,458	21,731	
B	Menor de 30	1,172 ± 0,410	0,488	0,022	14,016	4,230	20,323	0,002
	30-50	1,196 ± 0,296	0,831	0,03	9,749	3,914	18,715	
	Mayor de 50	14,115 ± 8,629	1,168	0,030	192,016	3,656	12,210	
Ti	Menor de 30	3,133 ± 0,315	2,182	0,414	5,606	-0,055	-1,874	0,244
	30-50	2,849 ± 0,347	2,114	0,358	6,028	0,136	-1,718	
	Mayor de 50	3,517 ± 0,319	4,231	0,402	6,345	-0,219	-1,416	
Mn	Menor de 30	0,576 ± 0,074	0,439	0,267	2,595	3,160	11,477	0,049
	30-50	0,537 ± 0,067	0,418	0,172	2,016	2,338	6,021	
	Mayor de 50	0,695 ± 0,087	0,566	0,207	2,630	2,720	9,192	

Elemento $\mu\text{g/g}$	Rango de edad (años)	Media aritmética \pm error estándar	Mediana	Mín.	Máx.	Asimetría	Curtosis	p
Cr	Menor de 30	0,556 \pm 0,532	0,010	0,002	19,690	6,081	36,988	0,131
	30-50	0,093 \pm 0,028	0,010	0,001	0,652	2,180	4,131	
	Mayor de 50	0,177 \pm 0,107	0,010	0,004	3,163	4,931	25,489	
Ni	Menor de 30	0,429 \pm 0,316	0,051	0,010	11,699	5,891	35,302	0,353
	30-50	0,093 \pm 0,035	0,046	0,01	0,988	3,849	14,535	
	Mayor de 50	0,092 \pm 0,029	0,050	0,01	0,908	4,902	25,540	
Cu	Menor de 30	0,189 \pm 0,079	0,086	0,004	2,940	5,517	32,242	0,188
	30-50	0,205 \pm 0,042	0,041	0,006	0,715	0,877	-0,770	
	Mayor de 50	0,296 \pm 0,087	0,195	0,009	2,432	3,552	14,410	
Co	Menor de 30	0,057 \pm 0,013	0,010	0,001	0,236	1,080	-0,499	0,021
	30-50	0,072 \pm 0,013	0,010	0,001	0,225	0,475	-1,645	
	Mayor de 50	0,029 \pm 0,011	0,010	0,000	0,202	2,314	3,768	
Se	Menor de 30	0,044 \pm 0,015	0,010	0,001	0,373	2,702	6,641	0,119
	30-50	0,066 \pm 0,016	0,010	0,001	0,341	1,665	1,823	
	Mayor de 50	0,021 \pm 0,007	0,010	0,001	0,216	4,119	18,827	
V	Menor de 30	0,010 \pm 0,002	0,010	0,003	0,066	5,382	31,557	0,347
	30-50	0,009 \pm 0,000	0,010	0,002	0,01	-2,531	5,760	
	Mayor de 50	0,009 \pm 0,000	0,010	0,003	0,018	0,366	3,185	

Nota. Mín., mínimo; Máx., máximo; p , p -valor, a partir de $p < 0,05$, se consideró estadísticamente significativo, resaltado en negrita. Las comparaciones entre los distintos rangos de edad (<30, 30-50, >50 años) fueron realizadas con el test de Kruskal-Wallis.

Figura 39

Concentraciones de los elementos esenciales en molares en función del rango de edad



Nota. Cada punto representa el valor de la concentración media de cada elemento. Un análisis estadístico fue realizado usando el test de Mann-Whitney. A partir de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

En la Tabla 20 se observan las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de edad 2 a 2.

Tabla 20

Diferencias estadísticamente significativas entre valores de las concentraciones de los elementos esenciales en molares en función de los grupos de edad

Variable	Grupos	p-valor
Molares	I-II	Sr (0,019)
		S (0,040)
	I-III	Sr (0,007)
		Ba (0,000)
		B (0,001)
		Mn (0,045)
		Cu (0,050)
	II-III	K (0,023)
		Ba (0,017)
		B (0,033)
		Mn (0,030)
		Co (0,007)
		Se (0,038)

Nota. Las comparaciones entre los distintos rangos de edad: (I) Menor de 30 años (n = 40), (II) Entre 30 y 50 años (n = 35), (III) Mayor de 50 años (n = 34), fueron realizadas con el test de *Mann-Whitney*. A partir de $p < 0,05$, se consideró estadísticamente significativo

II) Concentración de los elementos esenciales en premolares en función del rango de edad

Hemos encontrado que S, Mg, K y Sr se relacionan estadísticamente en los premolares en función del rango de edad, a mayor grupo de edad hallamos concentraciones más elevadas de estos elementos. La distribución de la concentración de estos elementos traza junto al resto de elementos analizados aparece representada en la Tabla 21. La Figura 40 muestra las concentraciones medias de los elementos esenciales en premolares que presentan diferencias estadísticamente significativas en función del rango de edad.

Tabla 21

Valores de las concentraciones de los elementos esenciales en premolares en función del rango de edad

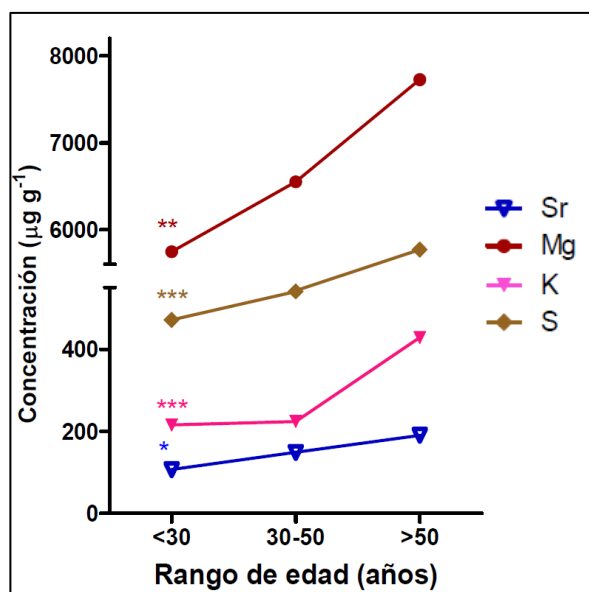
Elemento µg/g	Rango de edad (años)	Media aritmética ± error estándar	Mediana	Mín.	Máx.	Asimetría	Curtosis	<i>p</i>
Ca	Menor de 30	228443,9 ± 21940,6	252538,9	135055,9	411045,3	0,575	0,011	0,800
	30-50	231861,3 ± 21693,5	266164,7	149789,9	285813,6	-0,611	-2,125	
	Mayor de 50	251333,6 ± 13707,7	249070,4	154402,2	366383,4	0,611	4,173	
P	Menor de 30	111989,3 ± 10336,6	119338,9	68431,2	199232,1	0,653	0,149	0,879
	30-50	113313,9 ± 9652,8	126626,4	78785,8	141357,1	-0,525	-2,124	
	Mayor de 50	121961,7 ± 8165,1	117700,3	77043,9	199553,6	1,787	5,924	
Mg	Menor de 30	5745,5 ± 385,441	6163,6	3622,1	8085,0	-0,134	-1,258	0,010
	30-50	6552,5 ± 449,540	6677,8	4586,6	7912,5	-0,411	-1,349	
	Mayor de 50	7727,4 ± 456,370	7922,3	4814,9	10950,1	0,141	0,972	
Na	Menor de 30	5328,6 ± 368,054	5984,8	3491,6	7098,6	-0,204	-1,909	0,199
	30-50	5913,8 ± 650,754	6334,7	3608,5	8467,6	-0,001	-1,474	
	Mayor de 50	6640,5 ± 441,976	6503,2	3998,0	9954,4	0,545	1,118	
S	Menor de 30	471,194 ± 35,953	494,347	97,301	681,949	-1,464	4,416	0,000
	30-50	540,916 ± 75,796	489,188	242,283	987,000	1,216	2,873	
	Mayor de 50	2895,8 ± 1639,7	880,728	510,295	20.587,066	3,244	10,823	
K	Menor de 30	215,681 ± 10,401	208,440	152,996	300,557	1,277	1,964	0,001
	30-50	224,678 ± 12,158	208,588	189,855	271,588	0,543	-2,040	
	Mayor de 50	428,646 ± 57,570	372,594	205,752	852,348	0,849	0,060	
Sr	Menor de 30	107,363 ± 10,311	107,831	55,555	167,993	0,166	-1,110	0,027
	30-50	149,243 ± 18,853	138,923	89,918	262,016	1,438	2,635	
	Mayor de 50	190,392 ± 32,296	205,258	0,649	388,405	-0,332	0,104	
Zn	Menor de 30	84,502 ± 5,298	90,884	45,938	122,080	-0,350	0,215	0,058
	30-50	102,232 ± 6,324	103,604	69,459	126,364	-0,613	0,416	
	Mayor de 50	92,852 ± 12,408	111,238	0,725	128,650	-1,866	2,182	
Ba	Menor de 30	2,805 ± 0,418	2,127	1,433	6,270	1,551	1,549	0,172
	30-50	14,685 ± 11,950	2,662	1,514	98,277	2,821	7,966	
	Mayor de 50	3,637 ± 1,652	1,604	1,212	21,423	3,227	10,701	
Fe	Menor de 30	7,125 ± 1,812	7,971	0,261	22,40	0,751	0,146	0,656
	30-50	5,459 ± 1,954	4,304	0,346	13,755	0,328	-1,942	
	Mayor de 50	4,572 ± 1,355	2,396	0,472	14,405	1,051	0,039	
B	Menor de 30	4,485 ± 2,352	1,189	0,030	33,398	3,161	10,503	0,408
	30-50	2,431 ± 0,948	1,916	0,030	8,432	1,870	4,072	
	Mayor de 50	1,207 ± 0,310	0,955	0,030	3,045	0,528	-1,094	
Ti	Menor de 30	2,776 ± 0,544	1,954	0,289	5,422	0,214	-2,023	0,447
	30-50	3,126 ± 0,825	3,328	0,576	5,562	-0,047	-2,639	
	Mayor de 50	3,829 ± 0,476	4,213	0,990	5,758	-0,835	-0,629	
Mn	Menor de 30	0,365 ± 0,068	0,294	0,173	1,179	2,895	9,423	0,778
	30-50	0,328 ± 0,097	0,286	0,197	0,671	1,708	3,049	
	Mayor de 50	0,373 ± 0,055	0,335	0,140	0,757	1,109	0,627	

Elemento $\mu\text{g/g}$	Rango de edad (años)	Media aritmética \pm error estándar	Mediana	Mín.	Máx.	Asimetría	Curtosis	p
Cr	Menor de 30	0,561 \pm 0,436	0,050	0,002	6,198	3,676	13,639	0,717
	30-50	0,180 \pm 0,097	0,059	0,009	0,805	2,104	4,690	
	Mayor de 50	0,551 \pm 0,368	0,059	0,01	4,535	3,262	10,956	
Ni	Menor de 30	0,410 \pm 0,117	0,082	0,010	0,979	0,345	-2,162	0,998
	30-50	0,372 \pm 0,159	0,069	0,010	0,957	0,660	-2,136	
	Mayor de 50	0,682 \pm 0,416	0,071	0,010	5,112	3,112	10,150	
Cu	Menor de 30	0,179 \pm 0,061	0,053	0,006	0,637	1,167	0,046	0,590
	30-50	0,969 \pm 0,745	0,346	0,010	6,164	2,780	7,797	
	Mayor de 50	0,322 \pm 0,099	0,187	0,002	1,114	1,110	0,99	
Co	Menor de 30	0,116 \pm 0,027	0,163	0,005	0,252	-0,154	-2,036	0,412
	30-50	0,104 \pm 0,037	0,082	0,003	0,224	0,131	-2,550	
	Mayor de 50	0,042 \pm 0,019	0,010	0,010	0,202	1,963	2,755	
Se	Menor de 30	0,058 \pm 0,047	0,010	0,006	0,674	3,738	13,978	0,260
	30-50	0,039 \pm 0,022	0,010	0,010	0,187	2,440	6,031	
	Mayor de 50	0,066 \pm 0,026	0,025	0,003	0,298	1,964	3,678	
V	Menor de 30	0,010 \pm 0,000	0,01	0,006	0,010	-2,355	8,601	1,000
	30-50	0,010 \pm 0,000	0,01	0,005	0,011	-2,005	8,900	
	Mayor de 50	0,010 \pm 0,000	0,01	0,006	0,011	-2,556	8,800	

Nota. Mín., mínimo; Máx., máximo; p , p -valor, a partir de $p < 0,05$, se consideró estadísticamente significativo, resaltado en negrita. Las comparaciones entre los distintos rangos de edad (<30, 30-50, >50 años) fueron realizadas con el test de Kruskal-Wallis.

Figura 40

Concentraciones de los elementos esenciales en premolares en función del rango de edad



Nota. Cada punto representa el valor de la concentración media de cada elemento. Un análisis estadístico fue realizado usando el test de Mann-Whitney. A partir de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

En la Tabla 22 se observan las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de edad 2 a 2.

Tabla 22

Diferencias estadísticamente significativas entre valores de las concentraciones de los elementos esenciales en premolares en función de los grupos de edad

Variable	Grupos	p-valor
Premolares	I-III	Mg (0,004)
		S (0,000)
		K (0,000)
		Sr (0,020)
	Zn (0,036)	
	II-III	S (0,005)
K (0,002)		

Nota. Las comparaciones entre los distintos rangos de edad: (I) Menor de 30 años (n = 16), (II) Entre 30 y 50 años (n = 10), (III) Mayor de 50 años (n = 15), fueron realizadas con el test de *Mann-Whitney*. A partir de $p < 0,05$, se consideró estadísticamente significativo

Como resumen, en el total de la muestra, en el grupo de hombres y en el de dientes premolares, observamos diferencias estadísticamente significativas entre los distintos rangos de edad, en las concentraciones de Mg, S, K y Sr, con la excepción en el grupo de hombres para el estroncio (Tablas 8, 15, 21 y Figuras 32, 37, 40). En los niveles de Sr sí encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes rangos de edad entre las mujeres y entre molares (Tablas 17, 19 y Figuras 38, 39).

También observamos diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de Ba, B y Co entre los diferentes rangos de edades, en el total de la muestra, y en hombres (con la excepción del boro) y en molares (Tablas 8, 15, 19 y Figuras 32, 37, 39).

Con relación al Zn y V, hallamos diferencias estadísticamente significativas en función de los distintos rangos de edad en el total de la muestra y en mujeres (Tablas 8, 17 y Figuras 32, 38).

B) Elementos tóxicos

La concentración de los elementos tóxicos en los tres rangos de edad (<30, 30-50, >50 años) fue analizada en el total de acuerdo con el sexo y el tipo de diente (molar y premolar).

b1) Concentración de los elementos tóxicos respecto al sexo en función del rango de edad**l) Concentración de los elementos tóxicos en hombres en función del rango de edad**

En hombres en función del rango de edad se observaron diferencias estadísticamente significativas en el plomo, estaño y litio, aumentando de manera progresiva en cada grupo de edad. Como se muestra en la Tabla 23 junto al resto de elementos analizados. En la Figura 41 se puede ver un análisis de las concentraciones medias de los elementos tóxicos en hombres en función del rango de edad.

Tabla 23

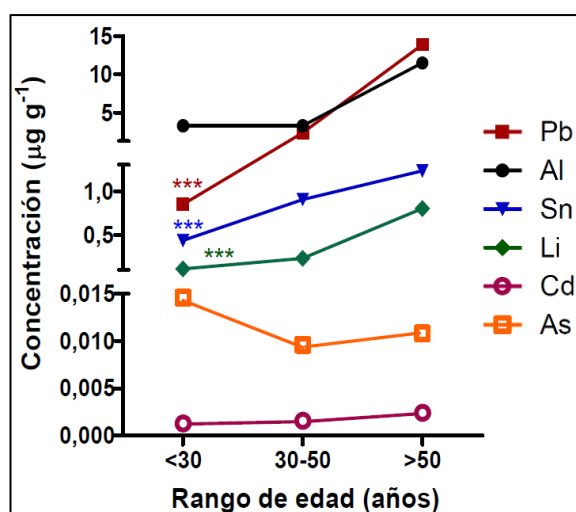
Valores de las concentraciones de los elementos tóxicos en hombres en función del rango de edad

Elemento µg/g	Rango de edad (años)	Media aritmética ± error estándar	Mediana	Mín.	Máx.	Asimetría	Curtosis	<i>p</i>
Al	Menor de 30	2,374 ± 1,211	0,050	0,005	15,711	2,153	4,153	0,140
	30-50	4,121 ± 1,630	0,883	0,005	15,965	1,407	0,522	
	Mayor de 50	14,725 ± 8,438	0,389	0,005	229,868	3,915	14,627	
Pb	Menor de 30	1,071 ± 0,364	0,536	0,064	5,50	2,578	7,215	0,000
	30-50	3,318 ± 0,782	2,388	0,704	7,817	0,735	-1,306	
	Mayor de 50	13,524 ± 1,139	12,458	5,127	36,903	1,780	4,105	
Sn	Menor de 30	0,436 ± 0,181	0,175	0,035	2,791	3,055	10,147	0,001
	30-50	0,905 ± 0,503	0,324	0,066	6,885	3,487	12,361	
	Mayor de 50	1,232 ± 0,255	0,711	0,080	6,652	2,458	5,724	
Li	Menor de 30	0,110 ± 0,033	0,102	0	0,496	2,037	5,519	0,001
	30-50	0,231 ± 0,043	0,197	0,010	0,635	1,58	3,604	
	Mayor de 50	0,803 ± 0,499	0,322	0,010	17,731	5,884	34,741	
As	Menor de 30	0,010 ± 0,001	0,010	0,003	0,023	1,748	6,645	0,443
	30-50	0,012 ± 0,003	0,010	0,001	0,053	3,290	11,614	
	Mayor de 50	0,011 ± 0,003	0,010	0,001	0,096	5,384	30,678	
Cd	Menor de 30	0,001 ± 0,000	0,001	0,001	0,003	3,449	12,546	0,874
	30-50	0,002 ± 0,000	0,001	0,001	0,005	2,187	3,288	
	Mayor de 50	0,002 ± 0,000	0,001	0,001	0,010	2,353	4,106	

Nota. Mín., mínimo; Máx., máximo; *p*, *p*-valor, a partir de $p < 0,05$, se consideró estadísticamente significativo, resaltado en negrita. Las comparaciones entre los distintos rangos de edad (<30, 30-50, >50 años) fueron realizadas con el test de Kruskal-Wallis.

Figura 41

Concentración de los elementos tóxicos en hombres en función del rango de edad



Nota. Cada punto representa el valor de la concentración media de cada elemento. Un análisis estadístico fue realizado usando el test de Mann-Whitney. A partir de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

En la Tabla 24 se observan las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de edad 2 a 2.

Tabla 24

Diferencias estadísticamente significativas entre valores de las concentraciones de los elementos tóxicos en hombres en función de los grupos de edad

Variable	Grupos	p-valor
Hombres	I-II	Pb (0,001)
		Li (0,008)
	I-III	Pb (0,000)
		Sn (0,001)
	II-III	Li (0,000)
		Pb (0,000)
		Sn (0,025)

Nota. Las comparaciones entre los distintos rangos de edad: (I) Menor de 30 años ($n = 15$), (II) Entre 30 y 50 años ($n = 13$), (III) Mayor de 50 años ($n = 35$), fueron realizadas con el test de *Mann-Whitney*. A partir de $p < 0,05$, se consideró estadísticamente significativo

II) Concentración de los elementos tóxicos en mujeres en función del rango de edad

En mujeres en función del rango de edad se observaron diferencias estadísticamente significativas en el plomo, estaño y litio, aumentando con la edad las concentraciones en plomo y en litio; pero en el caso del estaño a partir de los 50 años se observa una disminución. Como se muestra en la Tabla 25 junto al resto de elementos analizados. En la Figura 42 se puede ver un análisis de las concentraciones medias de los elementos tóxicos en mujeres en función del rango de edad.

Tabla 25

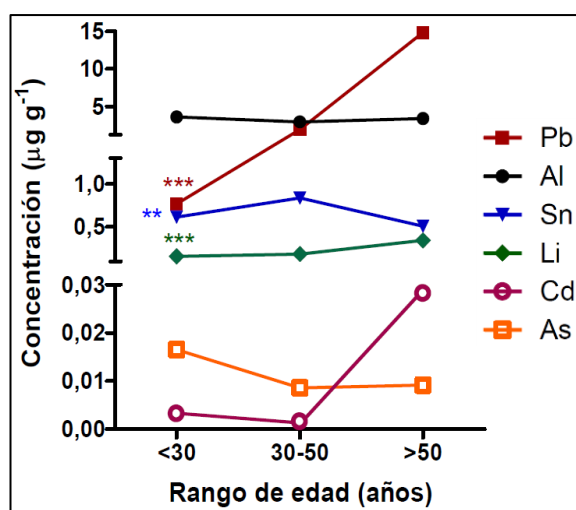
Valores de las concentraciones de los elementos tóxicos en mujeres en función del rango de edad

Elemento $\mu\text{g/g}$	Rango de edad (años)	Media aritmética \pm error estándar	Mediana	Mín.	Máx.	Asimetría	Curtosis	p
Al	Menor de 30	3,678 \pm 0,950	0,220	0,005	27,180	2,009	4,382	0,726
	30-50	2,998 \pm 1,027	0,396	0,005	27,327	2,837	9,430	
	Mayor de 50	3,471 \pm 1,629	0,893	0,005	22,016	2,578	6,981	
Pb	Menor de 30	0,766 \pm 0,149	0,396	0,125	4,997	2,807	9,329	0,000
	30-50	1,995 \pm 0,348	1,339	0,282	9,511	2,476	6,879	
	Mayor de 50	14,840 \pm 3,945	10,541	4,062	63,318	3,097	10,478	
Sn	Menor de 30	0,616 \pm 0,238	0,213	0,036	9,571	5,368	31,344	0,003
	30-50	0,837 \pm 0,134	0,726	0,072	3,858	2,205	7,103	
	Mayor de 50	0,510 \pm 0,079	0,601	0,049	0,920	-0,310	-1,305	
Li	Menor de 30	0,159 \pm 0,016	0,130	0,002	0,427	0,831	0,556	0,002
	30-50	0,185 \pm 0,018	0,182	0,002	0,502	0,560	1,579	
	Mayor de 50	0,343 \pm 0,048	0,349	0,002	0,622	-0,220	-0,439	
As	Menor de 30	0,017 \pm 0,006	0,010	0,002	0,248	6,205	39,177	0,554
	30-50	0,009 \pm 0,001	0,010	0	0,035	2,606	12,267	
	Mayor de 50	0,009 \pm 0,001	0,010	0,001	0,010	-3,213	10,613	
Cd	Menor de 30	0,003 \pm 0,002	0,001	0,001	0,095	6,379	40,779	0,772
	30-50	0,001 \pm 0,000	0,001	0,001	0,004	2,666	7,041	
	Mayor de 50	0,029 \pm 0,027	0,001	0,001	0,385	3,741	13,999	

Nota. Mín., mínimo; Máx., máximo; p , p -valor, a partir de $p < 0,05$, se consideró estadísticamente significativo, resaltado en negrita. Las comparaciones entre los distintos rangos de edad (<30, 30-50, >50 años) fueron realizadas con el test de Kruskal-Wallis.

Figura 42

Concentración de los elementos tóxicos en mujeres en función del rango de edad



Nota. Cada punto representa el valor de la concentración media de cada elemento. Un análisis estadístico fue realizado usando el test de Mann-Whitney. A partir de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

En la Tabla 26 se observan las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de edad 2 a 2.

Tabla 26

Diferencias estadísticamente significativas entre valores de las concentraciones de los elementos tóxicos en mujeres en función de los grupos de edad

Variable	Grupos	p-valor
Mujeres	I-II	Pb (0,000)
		Sn (0,001)
	I-III	Pb (0,000)
		Li (0,001)
	II-III	Pb (0,000)
		Li (0,004)

Nota. Las comparaciones entre los distintos rangos de edad: (I) Menor de 30 años (n = 41), (II) Entre 30 y 50 años (n = 32), (III) Mayor de 50 años (n = 14), fueron realizadas con el test de *Mann-Whitney*. A partir de $p < 0,05$, se consideró estadísticamente significativo

b2) Concentración de los elementos tóxicos respecto al tipo de diente en función del rango de edad

I) Concentración de los elementos tóxicos en molares en función del rango de edad

En molares, se observó un incremento significativo en la concentración de Pb y Li con la edad; y en el caso del Sn solo hasta los 50 años. Como se muestra en la Tabla 27 junto al resto de elementos analizados. En la Figura 43 se puede ver un análisis de las concentraciones medias de los elementos tóxicos en molares en función del rango de edad.

Tabla 27

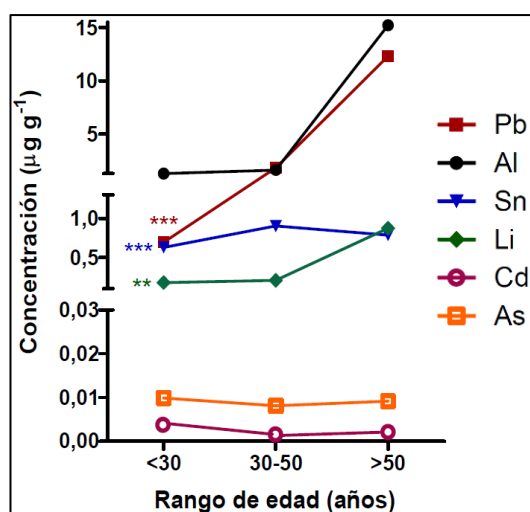
Valores de las concentraciones de los elementos tóxicos en molares en función del rango de edad

Elemento µg/g	Rango de edad (años)	Media aritmética ± error estándar	Mediana	Mín.	Máx.	Asimetría	Curtosis	<i>p</i>
Al	Menor de 30	1,321 ± 0,484	0,050	0,005	12,843	2,750	7,220	0,100
	30-50	1,644 ± 0,479	0,396	0,005	10,085	2,088	3,368	
	Mayor de 50	15,204 ± 9,803	0,267	0,005	229,868	3,699	12,689	
Pb	Menor de 30	0,693 ± 0,161	0,396	0,064	5,500	3,774	16,467	0,000
	30-50	1,849 ± 0,293	1,212	0,282	7,638	2,037	4,136	
	Mayor de 50	12,324 ± 1,271	10,775	4,967	36,903	2,247	5,906	
Sn	Menor de 30	0,630 ± 0,265	0,218	0,035	9,571	5,075	27,843	0,000
	30-50	0,904 ± 0,217	0,561	0,066	6,885	3,756	15,942	
	Mayor de 50	0,788 ± 0,168	0,668	0,049	5,311	4,328	21,340	
Li	Menor de 30	0,180 ± 0,018	0,137	0,008	0,496	0,990	0,979	0,003
	30-50	0,207 ± 0,022	0,192	0,002	0,635	1,137	3,043	
	Mayor de 50	0,876 ± 0,582	0,316	0,010	17,731	5,455	29,832	
As	Menor de 30	0,010 ± 0,000	0,010	0,002	0,230	2,132	15,684	0,142
	30-50	0,008 ± 0,001	0,010	0,001	0,010	-1,363	0,081	
	Mayor de 50	0,009 ± 0,001	0,010	0,001	0,023	0,829	6,261	
Cd	Menor de 30	0,004 ± 0,003	0,001	0,001	0,095	6,060	36,801	0,191
	30-50	0,001 ± 0,000	0,001	0,001	0,005	0,403	0,788	
	Mayor de 50	0,002 ± 0,000	0,001	0,001	0,010	2,016	2,644	

Nota. Mín., mínimo; Máx., máximo; *p*, *p*-valor, a partir de $p < 0,05$, se consideró estadísticamente significativo, resaltado en negrita. Las comparaciones entre los distintos rangos de edad (<30, 30-50, >50 años) fueron realizadas con el test de Kruskal-Wallis.

Figura 43

Concentración de los elementos tóxicos en molares en función del rango de edad



Nota. Cada punto representa el valor de la concentración media de cada elemento. Un análisis estadístico fue realizado usando el test de Mann-Whitney. A partir de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

En la Tabla 28 se observan las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de edad 2 a 2.

Tabla 28

Diferencias estadísticamente significativas entre valores de las concentraciones de los elementos tóxicos en molares en función de los grupos de edad

Variable	Grupos	p-valor
Molares	I-II	Al (0,045)
		Pb (0,000)
		Sn (0,000)
		As (0,045)
	I-III	Pb (0,000)
		Sn (0,000)
		Li (0,001)
	II-III	Pb (0,000)
Li (0,019)		

Nota. Las comparaciones entre los distintos rangos de edad: (I) Menor de 30 años ($n = 40$), (II) Entre 30 y 50 años ($n = 35$), (III) Mayor de 50 años ($n = 34$), fueron realizadas con el test de *Mann-Whitney*. A partir de $p < 0,05$, se consideró estadísticamente significativo

II) Concentración de los elementos tóxicos en premolares en función del rango de edad

Respecto al análisis de los elementos tóxicos en los premolares se observan diferencias significativas en las concentraciones de Pb y Li, existiendo un aumento de estas concentraciones a medida que aumenta la edad. Como se muestra en la Tabla 29 junto al resto de elementos analizados. En la Figura 44 se puede ver un análisis de las concentraciones medias de los elementos tóxicos en premolares en función del rango de edad.

Tabla 29

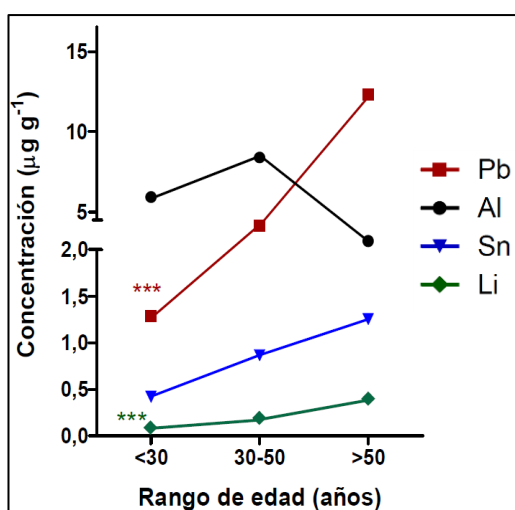
Valores de las concentraciones de los elementos tóxicos en premolares en función del rango de edad

Elemento µg/g	Rango de edad (años)	Media aritmética ± error estándar	Mediana	Mín.	Máx.	Asimetría	Curtosis	<i>p</i>
Al	Menor de 30	6,586 ± 2,142	4,167	0,050	27,180	1,370	2,003	0,614
	30-50	8,174 ± 3,496	4,948	0,050	27,327	1,110	0,603	
	Mayor de 50	2,740 ± 1,794	0,444	0,005	22,016	3,202	10,568	
Pb	Menor de 30	1,267 ± 0,375	0,614	0,125	4,997	1,647	2,704	0,000
	30-50	4,176 ± 1,179	2,504	1,359	9,511	0,751	-1,475	
	Mayor de 50	12,816 ± 1,385	13,252	4,062	21,992	0,017	0,574	
Sn	Menor de 30	0,424 ± 0,172	0,126	0,080	2,460	2,765	8,414	0,109
	30-50	0,868 ± 0,245	0,697	0,077	1,715	0,273	-2,111	
	Mayor de 50	1,256 ± 0,426	0,627	0,080	4,765	1,533	1,661	
Li	Menor de 30	0,077 ± 0,020	0,067	0,002	0,219	0,688	-0,774	0,000
	30-50	0,193 ± 0,031	0,159	0,102	0,338	0,743	-1,046	
	Mayor de 50	0,396 ± 0,054	0,423	0,002	0,622	-0,838	0,176	
As	Menor de 30	0,029 ± 0,170	0,010	0,003	0,248	3,613	13,274	0,447
	30-50	0,016 ± 0,006	0,010	0	0,053	1,521	1,514	
	Mayor de 50	0,008 ± 0,001	0,010	0,001	0,011	-0,959	-0,146	
Cd	Menor de 30	0,001 ± 0,000	0,001	0,001	0,003	3,101	10,781	0,578
	30-50	0,002 ± 0,000	0,001	0,001	0,004	2,048	3,786	
	Mayor de 50	0,033 ± 0,032	0,001	0,001	0,385	3,464	12,000	

Nota. Mín., mínimo; Máx., máximo; *p*, *p*-valor, a partir de $p < 0,05$, se consideró estadísticamente significativo, resaltado en negrita. Las comparaciones entre los distintos rangos de edad (<30, 30-50, >50 años) fueron realizadas con el test de Kruskal-Wallis.

Figura 44

Concentración de los elementos tóxicos en premolares en función del rango de edad



Nota. Cada punto representa el valor de la concentración media de cada elemento. Un análisis estadístico fue realizado usando el test de Mann-Whitney. A partir de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

En la Tabla 30 se observan las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de edad 2 a 2.

Tabla 30

Diferencias estadísticamente significativas entre valores de las concentraciones de los elementos tóxicos en premolares en función de los grupos de edad

Variable	Grupos	p-valor
Premolares	I-II	Pb (0,010)
		Li (0,008)
	I-III	Pb (0,000)
		Li (0,000)
	II-III	Pb (0,000)
		Li (0,010)

Nota. Las comparaciones entre los distintos rangos de edad: I) Menor de 30 años (n = 16), (II) Entre 30 y 50 años (n = 10), (III) Mayor de 50 años (n = 15), fueron realizadas con el test de *Mann-Whitney*. A partir de $p < 0,05$, se consideró estadísticamente significativo.

Como resumen, observamos un incremento estadísticamente significativo de Pb, Sn y Li entre los diferentes rangos de edad en el total de la muestra, en los grupos de hombres y mujeres, molares y premolares, con la excepción en el grupo de mujeres y molares cuya

concentración en Sn disminuye a partir de los 50 años y en premolares donde no se obtienen diferencias significativas en este elemento (Tablas 12, 23, 25, 27, 29 y Figuras 35, 41, 42, 43, 44).

Con relación al Al, se observan concentraciones constantes en el grupo <30 y 30-50 años y un incremento en el grupo de >50 años, en el caso del total de los dientes, hombres y en molares (Tablas 12, 23, 27 y Figuras 35, 41, 43) pero en ninguno de los casos se observaron diferencias significativas.

4.1.4. Análisis de correlación entre los diferentes elementos traza

En la Tabla 31, podemos observar las correlaciones entre los elementos traza. Algunos elementos muestran correlaciones significativas con otros, las cuales sugieren la posibilidad de ser elementos agonistas o antagonistas en los mecanismos de absorción de los dientes en los humanos. Respecto a los elementos tóxicos se observa una correlación significativamente positiva entre Al-As/Pb, Pb-Li/Sn y entre Li-Sn.

Una correlación positiva entre los elementos esenciales fue también encontrada: por ejemplo, el Mg con el V, sin embargo, la correlación del Mg fue negativa con el S. El K, elemento esencial, demostró una correlación positiva con Mg, S, Sr y Zn, mientras que el Sr presentó una correlación significativamente positiva con el V y el Zn.

Finalmente, una correlación positiva fue observada entre algunos elementos esenciales y tóxicos como B con el Al, Pb, Li y Sn.

Tabla 31. Matriz de correlación para pares de elementos tóxicos y esenciales. Coeficientes de correlación de Spearman

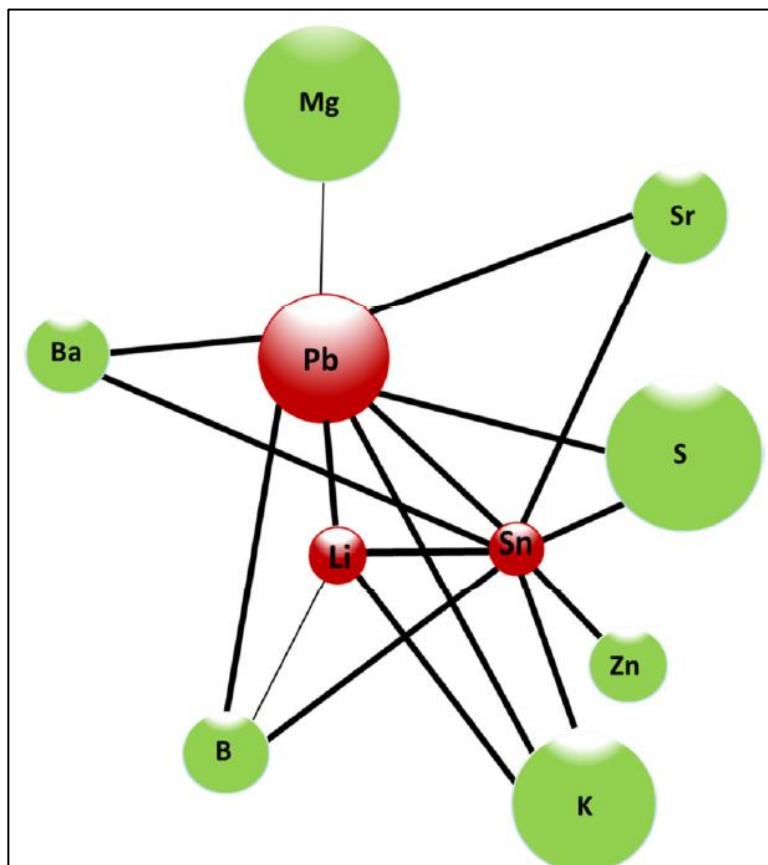
	Al	As	Cd	Pb	Li	Sn	B	Ba	Ca	Co	Cr	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	Ni	P	S	Se	Sr	Ti	V	Zn	
Al	1,000																									
Cd	-0,281**	-0,104	1,000																							
Pb	0,280**	0,031	0,098	1,000																						
Li	0,136	-0,091	-0,119	0,387**	1,000																					
Sn	0,140	-0,100	0,060	0,459**	0,232**	1,000																				
B	0,558**	0,090	-0,112	0,359**	0,207*	0,262**	1,000																			
Ba	0,252**	0,082	-0,065	0,356**	0,097	0,218**	0,381**	1,000																		
Ca	-0,404**	-0,050	0,304**	-0,127	0,038	-0,012	-0,206*	0,077	1,000																	
Co	0,526**	0,226**	-0,275**	0,019	-0,091	0,079	0,312**	0,117	-0,361**	1,000																
Cr	0,468**	0,283**	-0,250**	0,218**	0,136	0,073	0,188*	0,148	-0,247**	0,352**	1,000															
Cu	-0,406**	-0,278**	0,336**	0,009	-0,085	0,071	-0,244**	-0,126	0,241**	-0,447**	-0,292**	1,000														
Fe	0,545**	0,344**	-0,290**	0,135	0,103	0,107	0,315**	0,161*	-0,247**	0,675**	0,434**	-0,478**	1,000													
K	0,009	-0,012	-0,149	0,409**	0,410**	0,366**	0,048	0,243**	0,230**	-0,027	0,077	-0,105	0,248**	1,000												
Mg	-0,342**	-0,420**	0,059	0,169*	0,114	0,106	-0,056	0,026	0,213**	-0,412**	-0,390**	0,380**	-0,465**	0,216**	1,000											
Mn	-0,261**	-0,081	0,130	0,038	0,212**	0,139	-0,130	0,139	0,416**	-0,331**	-0,122	0,252**	-0,027	0,358**	0,213**	1,000										
Na	-0,313**	-0,365**	-0,116	-0,205*	0,254**	-0,019	-0,151	-0,023	0,410**	-0,358**	-0,302**	0,284**	-0,368**	0,185*	-0,412**	0,274**	1,000									
Ni	0,210**	0,054	-0,141	-0,015	-0,081	-0,025	0,012	-0,068	-0,289**	-0,001	0,180*	0,227**	-0,018	-0,370**	-0,390**	-0,162*	-0,064	1,000								
P	-0,350**	0,029	0,247**	-0,099	0,083	-0,030	-0,151	0,042	0,852**	-0,405**	-0,169**	0,054	-0,172*	0,229**	0,380**	0,432**	0,276**	-0,318**	1,000							
S	0,078	-0,165*	-0,147	0,285**	0,128	0,212**	-0,001	0,131	-0,218**	0,011	0,100	0,065	0,051	0,197*	-0,465**	-0,094	0,042	0,248**	-0,204*	1,000						
Se	-0,016	-0,131	-0,078	0,037	0,024	0,273**	0,033	0,074	-0,034	0,322**	-0,140	0,004	0,118	0,227**	0,216**	-0,092	0,136	-0,213**	-0,240**	-0,006	1,000					
Sr	-0,025	-0,070	0,136	0,332**	0,148	0,268**	-0,031	0,094	0,062	0,232**	-0,043	0,268**	0,134	0,312**	1,000	0,110	-0,068	-0,230**	-0,151	0,011	0,422**	1,000				
Ti	-0,531**	-0,303**	0,339**	-0,112	-0,033	-0,065	-0,315**	-0,131	0,348**	-0,611**	-0,472**	0,709**	-0,696**	-0,173*	0,047	0,185*	0,421**	0,214**	0,177*	0,000	-0,006	0,055	1,000			
V	0,101	-0,070	-0,072	-0,051	-0,060	0,068	0,033	0,028	-0,016	0,458**	-0,040	0,124	0,123	-0,006	0,521**	-0,076	0,026	0,109	-0,288**	0,040	0,456**	0,433**	0,035	1,000		
Zn	-0,218**	-0,312**	0,285**	0,148	0,029	0,274**	-0,140	0,097	0,109	-0,029	-0,346**	0,478**	-0,126	0,169*	-0,106	0,100	0,090	-0,142	-0,172*	0,157	0,437**	0,640**	0,342**	0,378**	1,000	

Nota. A partir de $p < 0,05$, la correlación se consideró estadísticamente significativa, resaltado en negrita. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

La Figura 45 muestra las correlaciones positivas entre los elementos tóxicos y esenciales y sus concentraciones con la edad en la dentina humana. El tamaño de los círculos representa la media de la concentración del elemento. Se observa que los elementos tóxicos Pb y Sn son los que presentan la mayoría de las correlaciones positivas, alcanzando un total de 8 con el resto de los elementos e incrementándose con la edad, tanto con esenciales como con elementos tóxicos. El Li tiene 4 correlaciones positivas con K, Sn, B, Pb. El K presenta 3 correlaciones positivas con Pb, Sn y Li. Podemos observar que S, Sr y Ba solo muestran 2 correlaciones positivas con los mismos elementos: Pb y Sn. Mg solo presenta una correlación positiva con Pb.

Figura 45

Diagrama representativo de las correlaciones positivas entre los elementos tóxicos y esenciales que aumentan su concentración con la edad en la dentina de los dientes humanos



Nota. Los nodos verdes indican los elementos esenciales. Los nodos rojos indican los elementos tóxicos. El grosor de la línea indica el grado de correlación: las líneas finas indican que la correlación es significativa en el nivel 0,05 (2 colas) y las líneas gruesas indican que la correlación es significativa en el nivel 0,01 (2 colas). El tamaño de los nodos representa la media de la concentración del elemento.

4.1.5. Correlación entre las concentraciones de elementos traza y la edad

Los coeficientes de correlación entre las concentraciones de los elementos en la dentina y la edad se muestran en la Tabla 32. Una correlación significativa y positiva fue observada entre la edad y la concentración de los siguientes elementos Li, Sn, Pb, B, Ba, K, Sr, S y Mg.

Tabla 32

Coefficientes de correlación significativos positivos entre las concentraciones de los elementos traza en la dentina y la edad

	Elementos tóxicos			Elementos esenciales						
	Pb	Sn	Li	Mg	S	K	Sr	Zn	Ba	B
Coefficiente de correlación *	0,880	0,401	0,483	0,262	0,327	0,399	0,294	0,185	0,282	0,222
p-valor	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,023	0,000	0,006

Nota. * Valores de los coeficientes de correlación de Spearman. A partir de $p < 0,05$, la correlación se consideró estadísticamente significativa

4.1.6. Análisis de regresión

Mediante un análisis de regresión observamos el grado de asociación y relación lineal que puede existir entre la concentración de los elementos traza ($n = 10$) que dependen de la edad, anteriormente confirmados, e identificar cualquier cambio significativamente estadístico en la concentración de estos elementos (Tabla 33).

El análisis de los 3 elementos tóxicos que correlacionan significativamente con la edad demostraron que todos aumentan linealmente con la edad, aunque el plomo presenta un coeficiente de correlación mayor con la edad ($r = 0,880$). Los siguientes elementos esenciales Sr, Mg, K, Ba y B se correlacionaron de manera significativa y directa con la edad, con coeficientes de correlación inferiores a 0,4.

El análisis de regresión lineal mostró la existencia de una relación entre las variables que viene explicada por la ecuación $y = a + b * x$, donde “y” es la edad y “x” la concentración de cada elemento. El coeficiente “b” indica que para cada microgramo adicional en la concentración se espera que la edad aumente en una media de “b” microgramos.

Tabla 33

Ecuaciones de regresión para la estimación de la edad en función de las concentraciones de los elementos traza en dentina humana, en todo el rango de edad

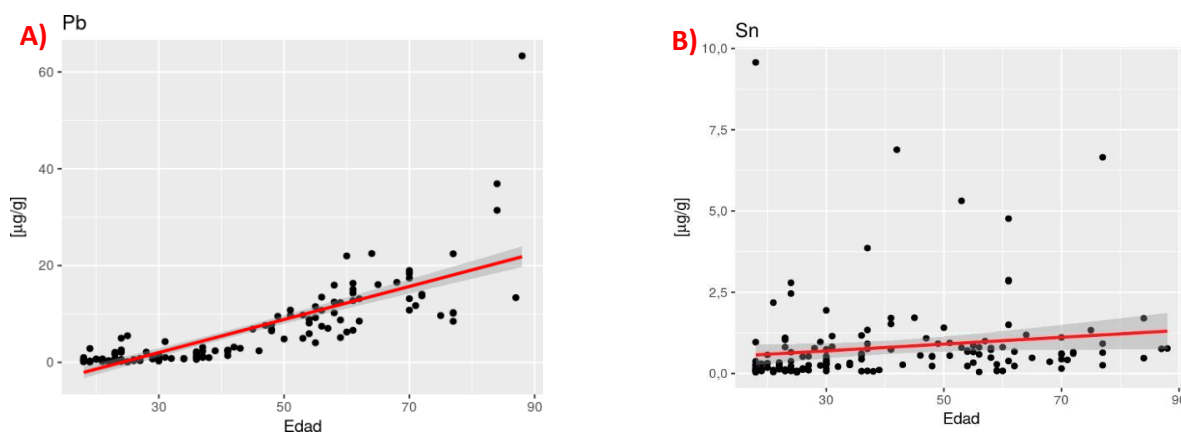
Elementos traza	Ecuación de regresión	R ²	p-valor
Tóxicos			
Pb	$y = 29,944 + 1,872 * x$	0,639	0,000
Sn	$y = 38,544 + 2,276 * x$	0,024	0,059
Li	$y = 39,682 + 2,073 * x$	0,025	0,055
Esenciales			
Mg	$y = 10,111 + 4,538 * x$	0,092	0,000
S	$y = 39,156 + 1,673 * x$	0,022	0,071
K	$y = 17,123 + 0,085 * x$	0,223	0,000
Sr	$y = 32,734 + 0,058 * x$	0,073	0,001
Zn	$y = 41,472 \pm 0,013 * x$	0,001	0,729
Ba	$y = 39,737 + 0,019 * x$	0,060	0,003
B	$y = 39,449 + 0,212 * x$	0,059	0,003

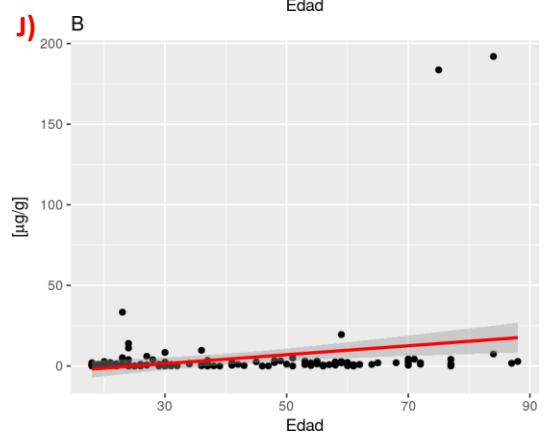
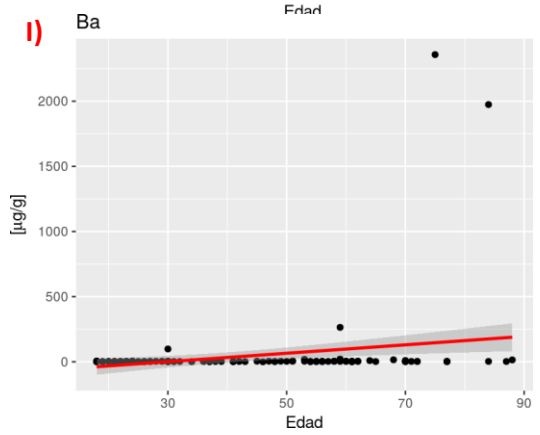
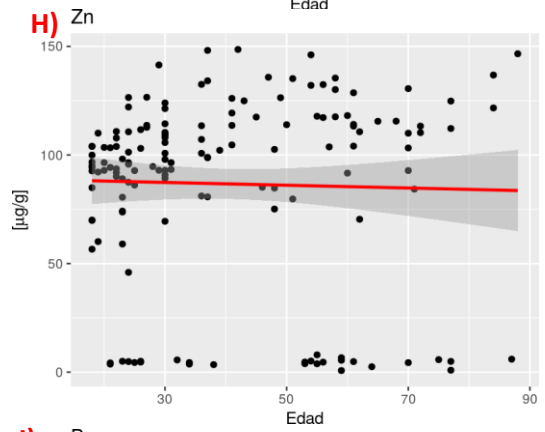
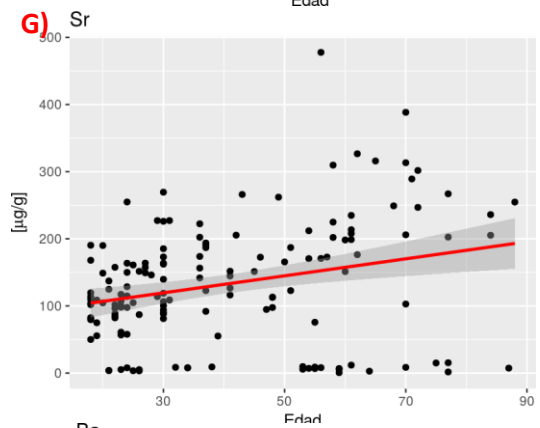
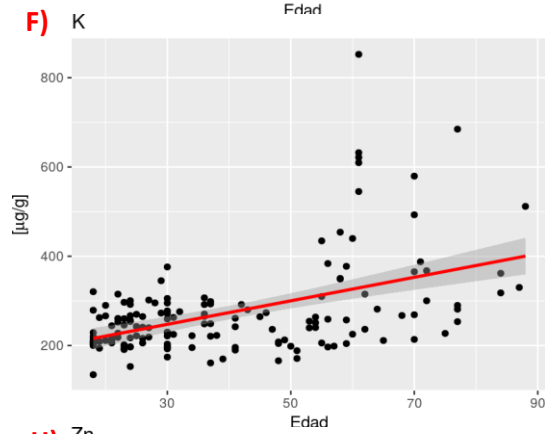
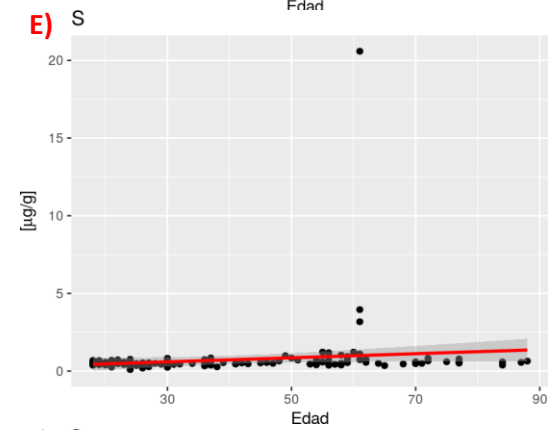
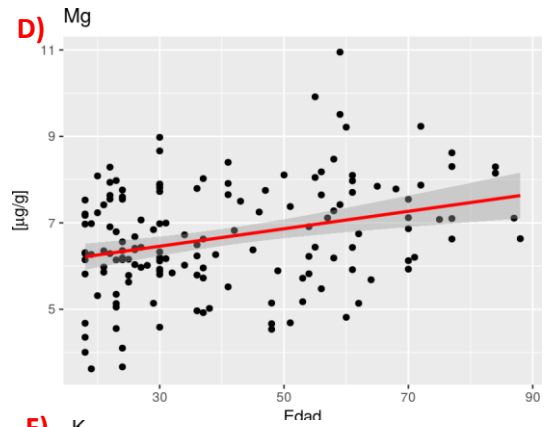
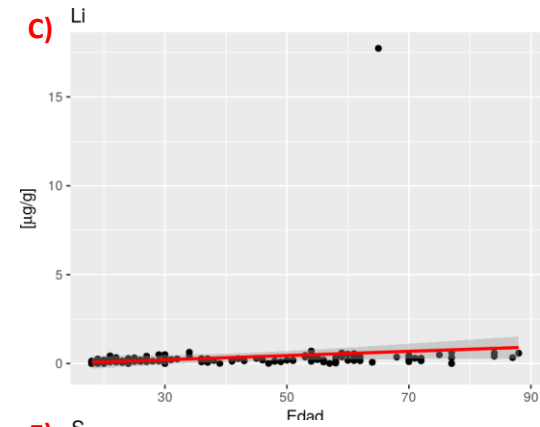
Nota. R², coeficiente de determinación; p, p-valor; "y" representa la edad del diente; "x" la concentración de cada elemento traza analizado. A partir de $p < 0,05$, se consideró estadísticamente significativo, resaltado en negrita.

En los siguientes gráficos de dispersión se muestra la relación lineal entre cada uno de los elementos traza en el rango de edad (18-88 años) del total de la muestra (n = 150) (Figura 46 A-J).

Figura 46

Gráficos de dispersión del total de los casos (n = 150) de las concentraciones de los distintos elementos traza





Nota. (A) Plomo; (B) Estaño; (C) Litio; (D) Magnesio; (E) Azufre; (F) Potasio; (G) Estroncio; (H) Zinc; (I) Bario; (J) Boro.

A continuación, realizamos un análisis de regresión lineal por grupos de edad de los elementos anteriormente mencionados (Pb, Sn, Li, Mg, S, K, Sr, Zn, Ba, B):

En la Tabla 34 se muestran las ecuaciones de regresión para la estimación de la edad con las concentraciones de Pb en dentina y las representaciones gráficas para los 3 grupos de edad (Figura 47 A-C).

Tabla 34

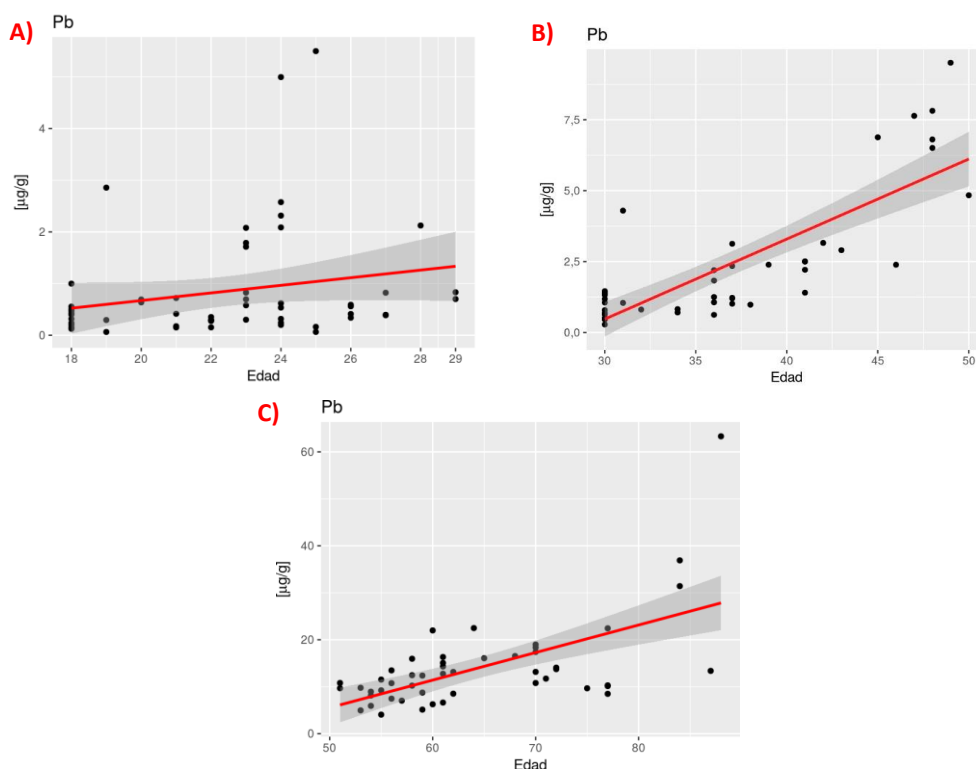
Ecuaciones de regresión para la estimación de la edad en función de las concentraciones de plomo por grupos de edad en dentina humana

Elemento traza	Rango de edad (años)	Ecuación de regresión	R ²	p-valor
Tóxico				
Pb	<30	$y = 21,862 + 0,627 * x$	0,046	0,112
	30-50	$y = 31,379 + 2,261 * x$	0,638	0,000
	>50	$y = 55,511 + 0,628 * x$	0,369	0,000

Nota. R², coeficiente de determinación; p, p-valor; "y" representa la edad del diente; "x" la concentración de plomo. A partir de $p < 0,05$, se consideró estadísticamente significativo, resaltado en negrita.

Figura 47

Ecuaciones de regresión del plomo en función de la edad



Nota. (A) Sujetos menores de 30 años; (B) Sujetos entre 30-50 años; (C) Sujetos mayores de 50 años.

La Tabla 35 muestra las ecuaciones de regresión para la estimación de la edad con las concentraciones de Sn en dentina y las representaciones gráficas para los 3 grupos de edad (Figura 48 A-C).

Tabla 35

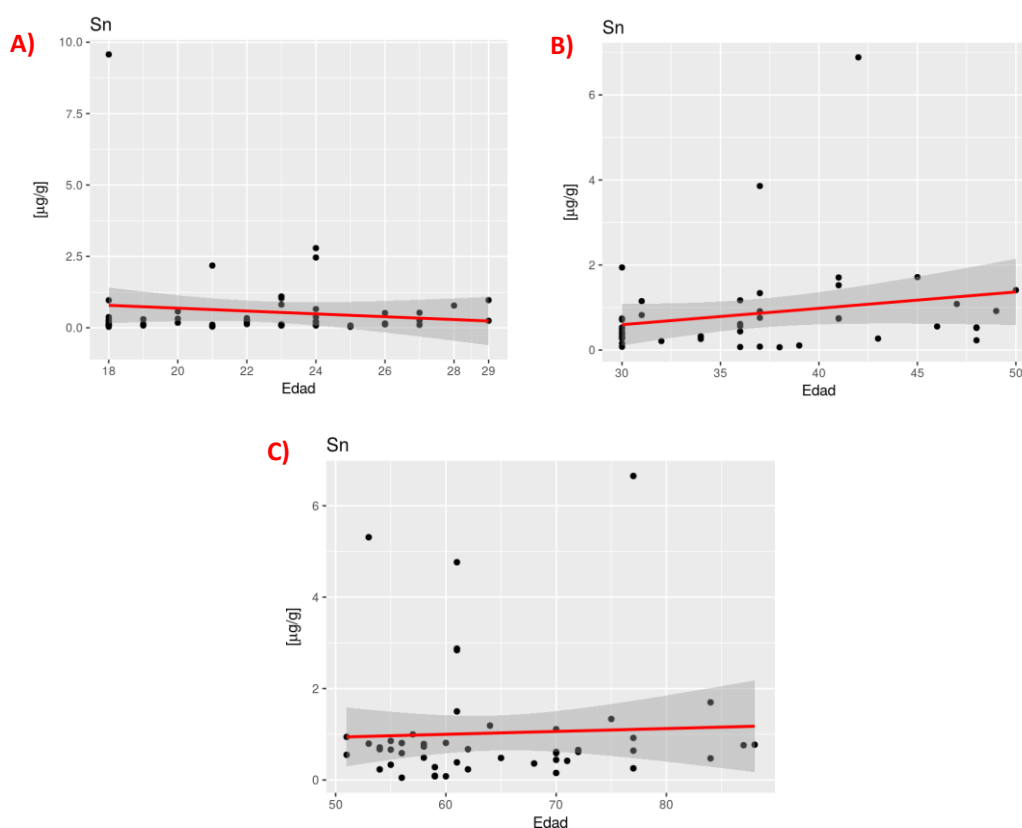
Ecuaciones de regresión para la estimación de la edad en función de las concentraciones de estaño por grupos de edad en dentina humana

Elemento traza	Rango de edad (años)	Ecuación de regresión	R ²	p-valor
Tóxico Sn	<30	$y = 22,549 \pm 0,274 * x$	0,014	0,391
	30-50	$y = 35,690 + 1,243 * x$	0,048	0,149
	>50	$y = 63,881 + 0,355 * x$	0,002	0,747

Nota. R², coeficiente de determinación; p, p-valor; “y” representa la edad del diente; “x” la concentración de estaño. A partir de p < 0,05, se consideró estadísticamente significativo, resaltado en negrita.

Figura 48

Ecuaciones de regresión del estaño en función de la edad



Nota. (A) Sujetos menores de 30 años; (B) Sujetos entre 30-50 años; (C) Sujetos mayores de 50 años

En la Tabla 36 se presentan las ecuaciones de regresión para la estimación de la edad con las concentraciones de Li en dentina y las representaciones gráficas para los 3 grupos de edad (Figura 49 A-C).

Tabla 36

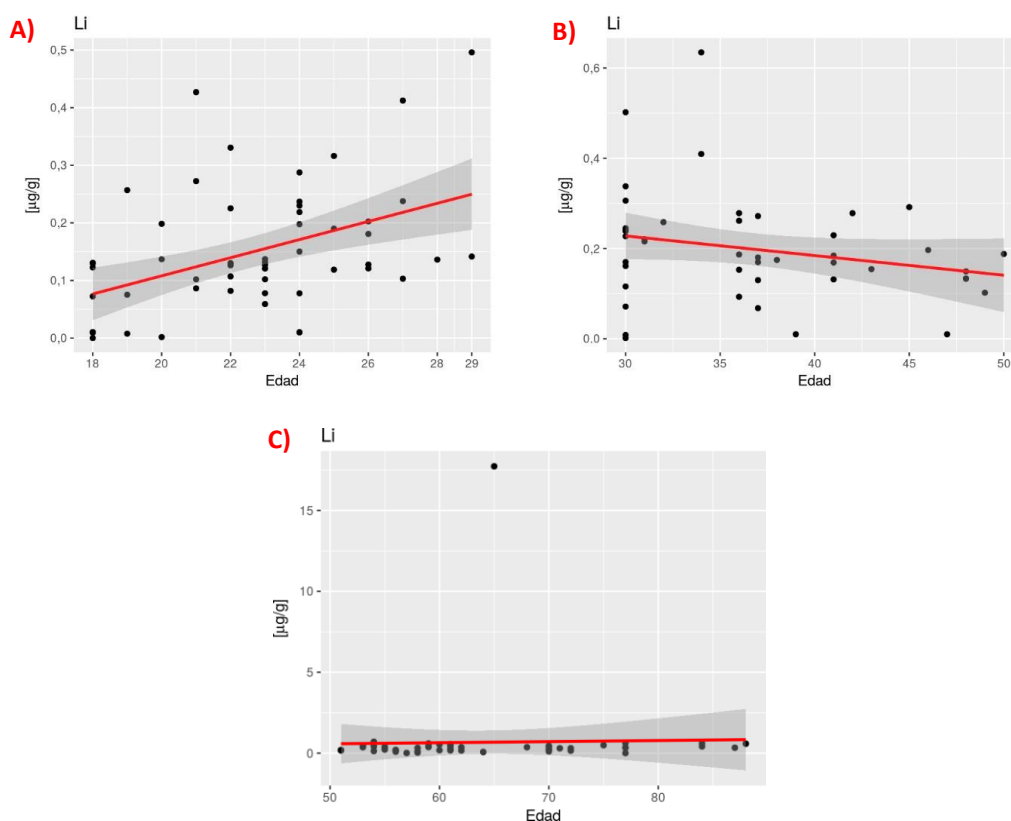
Ecuaciones de regresión para la estimación de la edad en función de las concentraciones de litio por grupos de edad en dentina humana

Elemento traza	Rango de edad (años)	Ecuación de regresión	R ²	p-valor
Li	<30	$y = 20,495 + 13,026 * x$	0,205	0,000
	30-50	$y = 39,269 \pm 12,662 * x$	0,055	0,12
	>50	$y = 64,173 + 0,107 * x$	0,001	0,855

Nota. R², coeficiente de determinación; p, p-valor; “y” representa la edad del diente; “x” la concentración de litio. A partir de $p < 0,05$, se consideró estadísticamente significativo, resaltado en negrita.

Figura 49

Ecuaciones de regresión del litio en función de la edad



Notas. (A) Sujetos menores de 30 años; (B) Sujetos entre 30-50 años; (C) Sujetos mayores de 50 años

A continuación, se presenta en la Tabla 37 las ecuaciones de regresión para la estimación de la edad con las concentraciones de Mg en dentina y las representaciones gráficas para los 3 grupos de edad (Figura 50 A-C).

Tabla 37

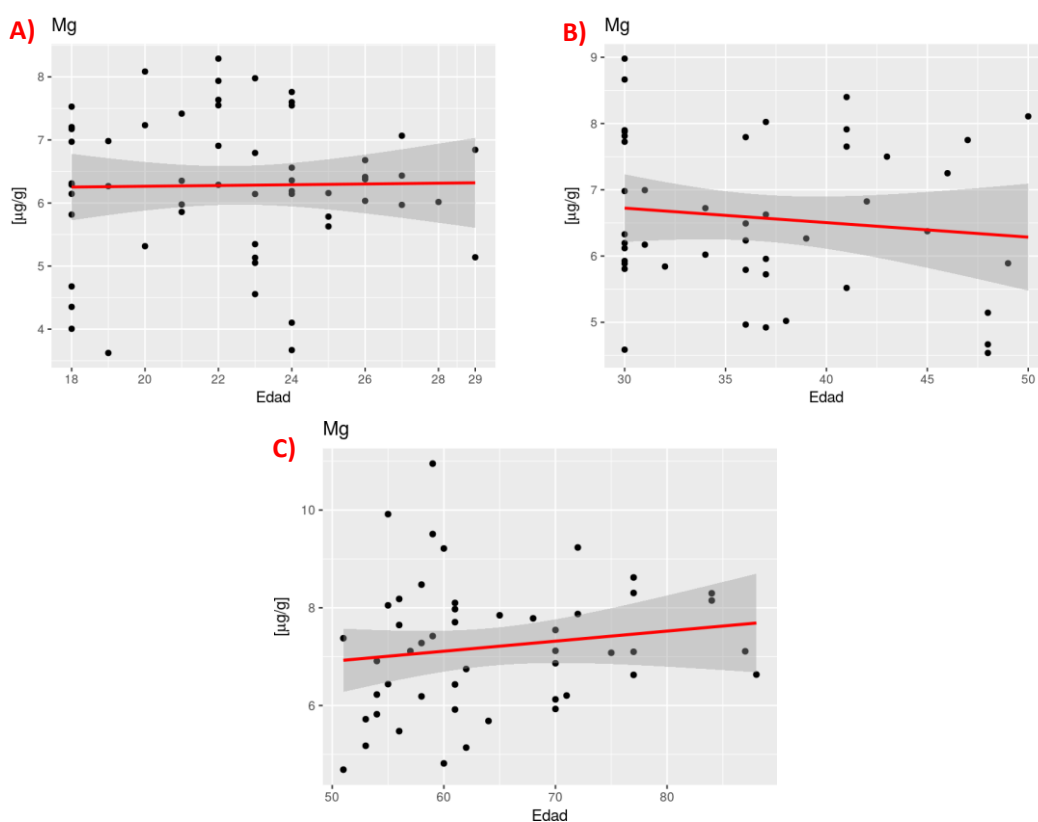
Ecuaciones de regresión para la estimación de la edad en función de las concentraciones de magnesio por grupos de edad en dentina humana

Elemento traza	Rango de edad (años)	Ecuación de regresión	R ²	p-valor
Esencial Mg	<30	$y = 22,092 + 0,048 * x$	0	0,9
	30-50	$y = 41,221 \pm 0,679 * x$	0,015	0,425
	>50	$y = 56,157 + 1,124 * x$	0,023	0,297

Nota. R², coeficiente de determinación; p, p-valor; “y” representa la edad del diente; “x” la concentración de magnesio. A partir de $p < 0,05$, se consideró estadísticamente significativo, resaltado en negrita.

Figura 50

Ecuaciones de regresión del magnesio en función de la edad



Nota. (A) Sujetos menores de 30 años; (B) Sujetos entre 30-50 años; (C) Sujetos mayores de 50 años

En la Tabla 38 se muestran las ecuaciones de regresión para la estimación de la edad con las concentraciones de S en dentina y las representaciones gráficas para los 3 grupos de edad (Figura 51 A-C).

Tabla 38

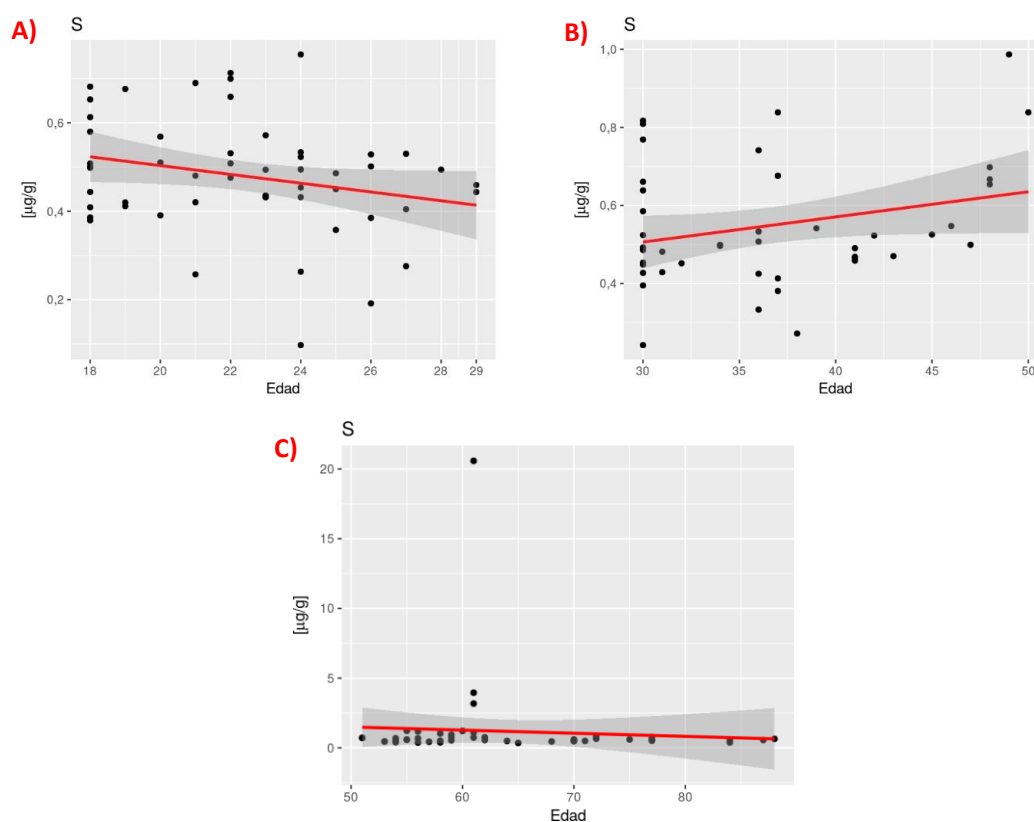
Ecuaciones de regresión para la estimación de la edad en función de las concentraciones de azufre por grupos de edad en dentina humana

Elemento traza	Rango de edad (años)	Ecuación de regresión	R ²	p-valor
S	<30	$y = 25,38 \pm 6,229 * x$	0,062	0,064
	30-50	$y = 30,789 + 10,852 * x$	0,07	0,079
	>50	$y = 64,552 \pm 0,261 * x$	0,006	0,601

Nota. R², coeficiente de determinación; p, p-valor; “y” representa la edad del diente; “x” la concentración de azufre. A partir de $p < 0,05$, se consideró estadísticamente significativo, resaltado en negrita.

Figura 51

Ecuaciones de regresión del azufre en función de la edad



Nota. (A) Sujetos menores de 30 años; (B) Sujetos entre 30-50 años; (C) Sujetos mayores de 50 años

La Tabla 39 muestra las ecuaciones de regresión para la estimación de la edad con las concentraciones de K en dentina y las representaciones gráficas para los 3 grupos de edad (Figura 52 A-C).

Tabla 39

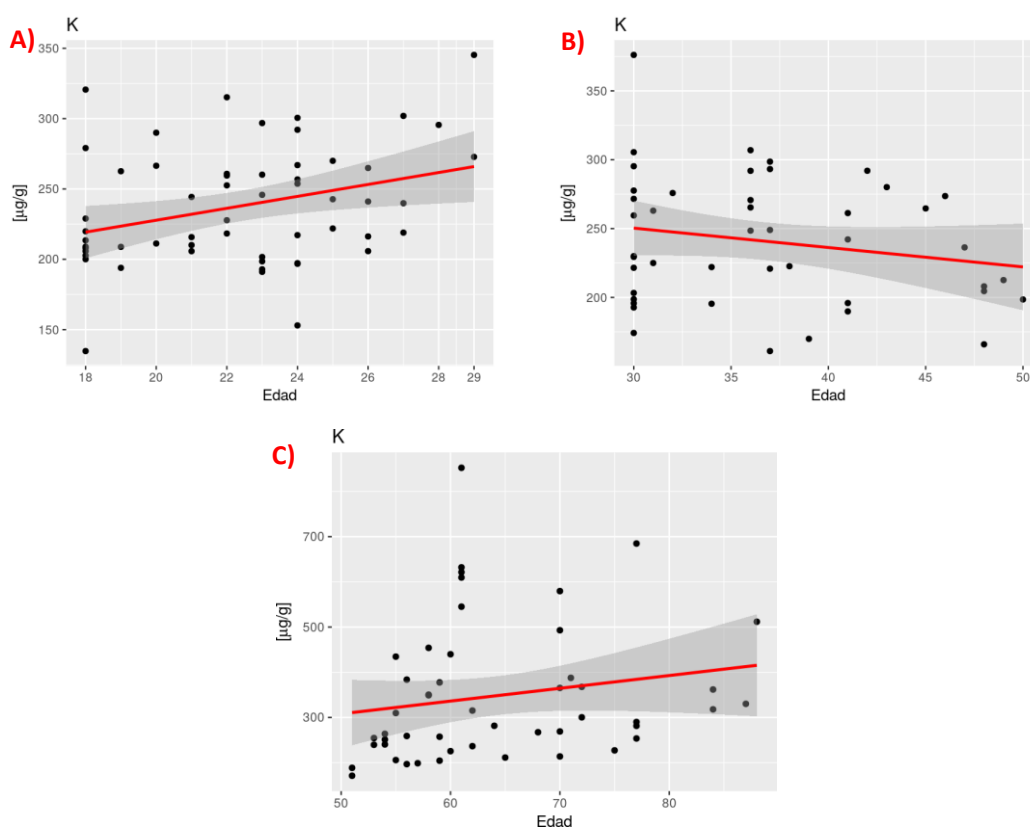
Ecuaciones de regresión para la estimación de la edad en función de las concentraciones de potasio por grupos de edad en dentina humana

Elemento traza	Rango de edad (años)	Ecuación de regresión	R ²	p-valor
Esencial K	<30	$y = 16,686 + 0,024 * x$	0,102	0,017
	30-50	$y = 43,498 \pm 0,028 * x$	0,039	0,191
	>50	$y = 59,996 + 0,012 * x$	0,034	0,201

Nota. R², coeficiente de determinación; p, p-valor; “y” representa la edad del diente; “x” la concentración de potasio. A partir de $p < 0,05$, se consideró estadísticamente significativo, resaltado en negrita.

Figura 52

Ecuaciones de regresión del potasio en función de la edad



Nota. (A) Sujetos menores de 30 años; (B) Sujetos entre 30-50 años; (C) Sujetos mayores de 50 años

A continuación, se presenta en la Tabla 40 las ecuaciones de regresión para la estimación de la edad con las concentraciones de Sr en dentina y las representaciones gráficas para los 3 grupos de edad (Figura 53 A-C).

Tabla 40

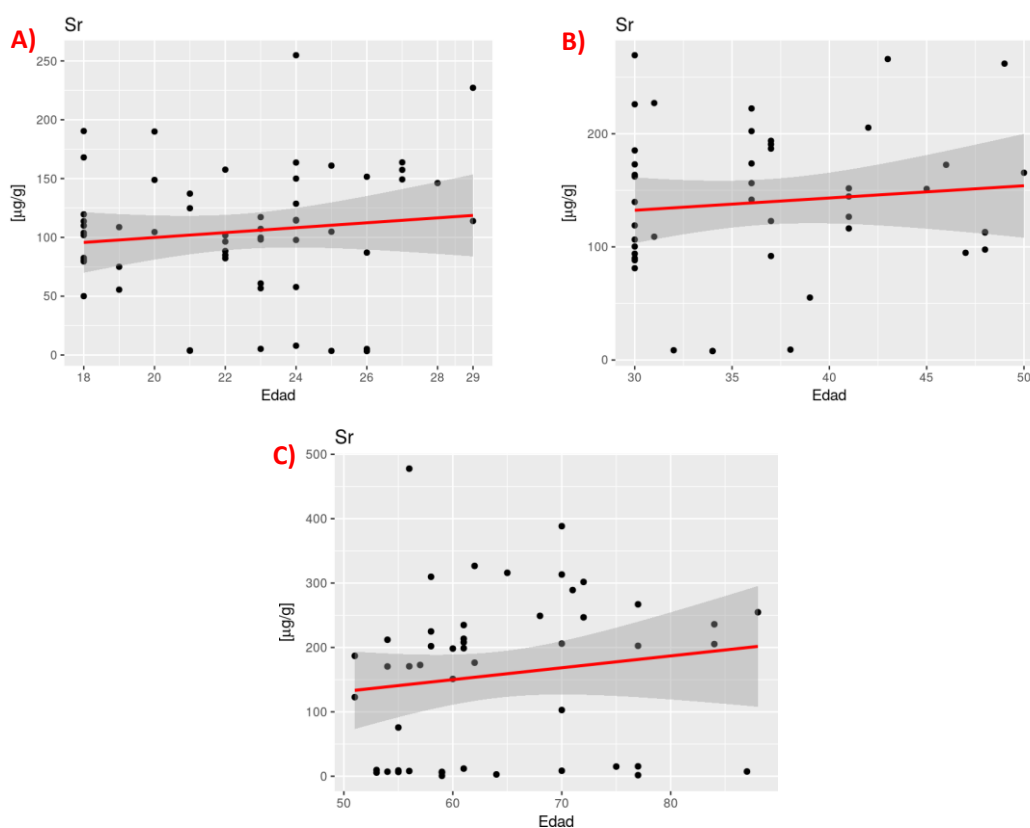
Ecuaciones de regresión para la estimación de la edad en función de las concentraciones de estroncio por grupos de edad en dentina humana

Elemento traza	Rango de edad (años)	Ecuación de regresión	R ²	p-valor
Esencial Sr	<30	$y = 21,683 + 0,007 * x$	0,014	0,383
	30-50	$y = 35,299 + 0,01 * x$	0,011	0,487
	>50	$y = 62,401 + 0,012 * x$	0,022	0,314

Nota. R², coeficiente de determinación; p, p-valor; “y” representa la edad del diente; “x” la concentración de estroncio. A partir de p < 0,05, se consideró estadísticamente significativo, resaltado en negrita.

Figura 53

Ecuaciones de regresión del estroncio en función de la edad



Nota. (A) Sujetos menores de 30 años; (B) Sujetos entre 30-50 años; (C) Sujetos mayores de 50 años

En la Tabla 41 se presentan las ecuaciones de regresión para la estimación de la edad con las concentraciones de Zn en dentina y las representaciones gráficas para los 3 grupos de edad (Figura 54 A-C).

Tabla 41

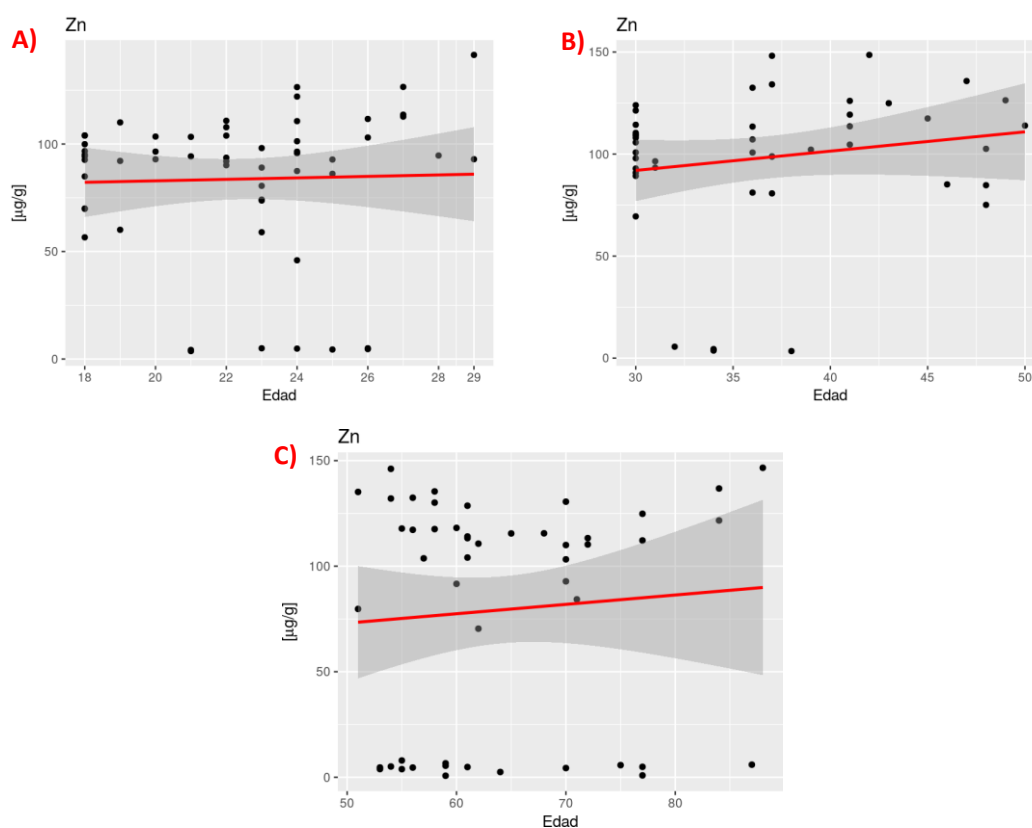
Ecuaciones de regresión para la estimación de la edad en función de las concentraciones de zinc por grupos de edad en dentina humana

Elemento traza	Rango de edad (años)	Ecuación de regresión	R ²	p-valor
Zn	<30	$y = 22,153 + 0,003 * x$	0,001	0,818
	30-50	$y = 33,481 + 0,033 * x$	0,031	0,244
	>50	$y = 63,089 + 0,015 * x$	0,006	0,583

Nota. R², coeficiente de determinación; p, p-valor; “y” representa la edad del diente; “x” la concentración de zinc. A partir de $p < 0,05$, se consideró estadísticamente significativo, resaltado en negrita.

Figura 54

Ecuaciones de regresión del zinc en función de la edad



Nota. (A) Sujetos menores de 30 años; (B) Sujetos entre 30-50 años; (C) Sujetos mayores de 50 años

La Tabla 42 muestra las ecuaciones de regresión para la estimación de la edad con las concentraciones de Ba en dentina y las representaciones gráficas para los 3 grupos de edad (Figura 55 A-C).

Tabla 42

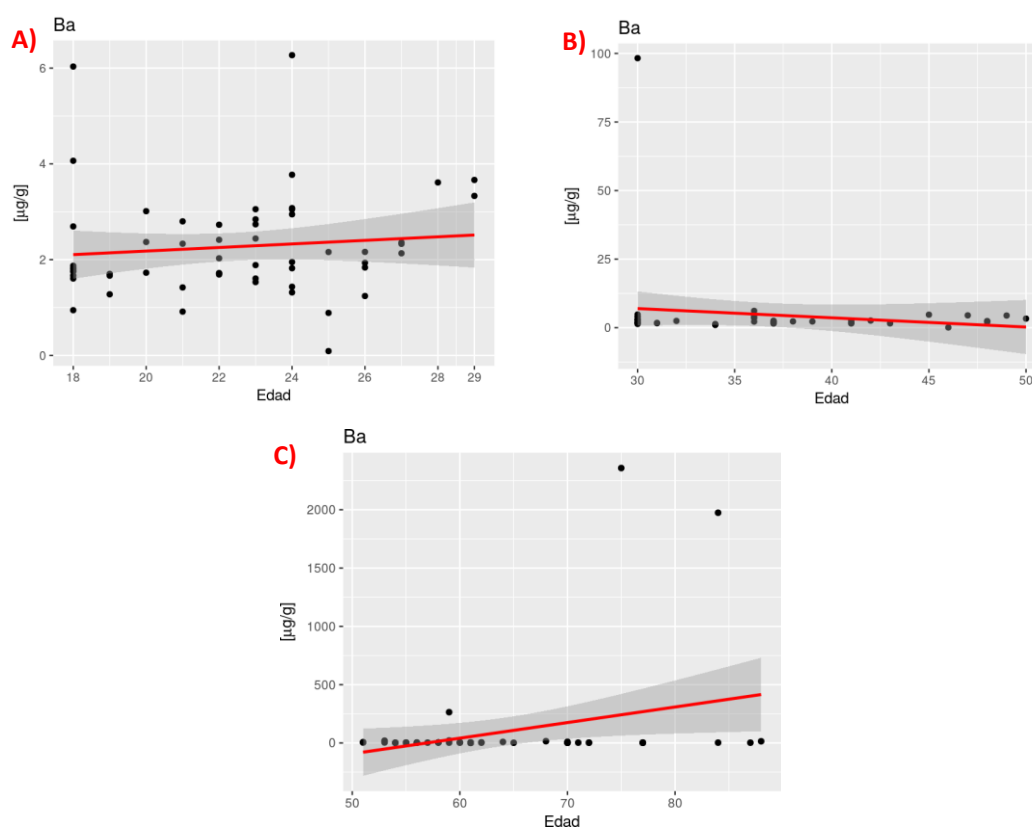
Ecuaciones de regresión para la estimación de la edad en función de las concentraciones de bario por grupos de edad en dentina humana

Elemento traza	Rango de edad (años)	Ecuación de regresión	R ²	p-valor
Esencial Ba	<30	$y = 21,674 + 0,317 * x$	0,012	0,426
	30-50	$y = 37,081 \pm 0,069 * x$	0,023	0,316
	>50	$y = 63,565 \pm 0,007 * x$	0,093	0,033

Nota. R², coeficiente de determinación; p, p-valor; “y” representa la edad del diente; “x” la concentración de bario. A partir de $p < 0,05$, se consideró estadísticamente significativo, resaltado en negrita.

Figura 55

Ecuaciones de regresión del bario en función de la edad



Nota. (A) Sujetos menores de 30 años; (B) Sujetos entre 30-50 años; (C) Sujetos mayores de 50 años

Finalmente, en la Tabla 43 se muestran las ecuaciones de regresión para la estimación de la edad con las concentraciones de B en dentina y las representaciones gráficas para los 3 grupos de edad (Figura 56 A-C).

Tabla 43

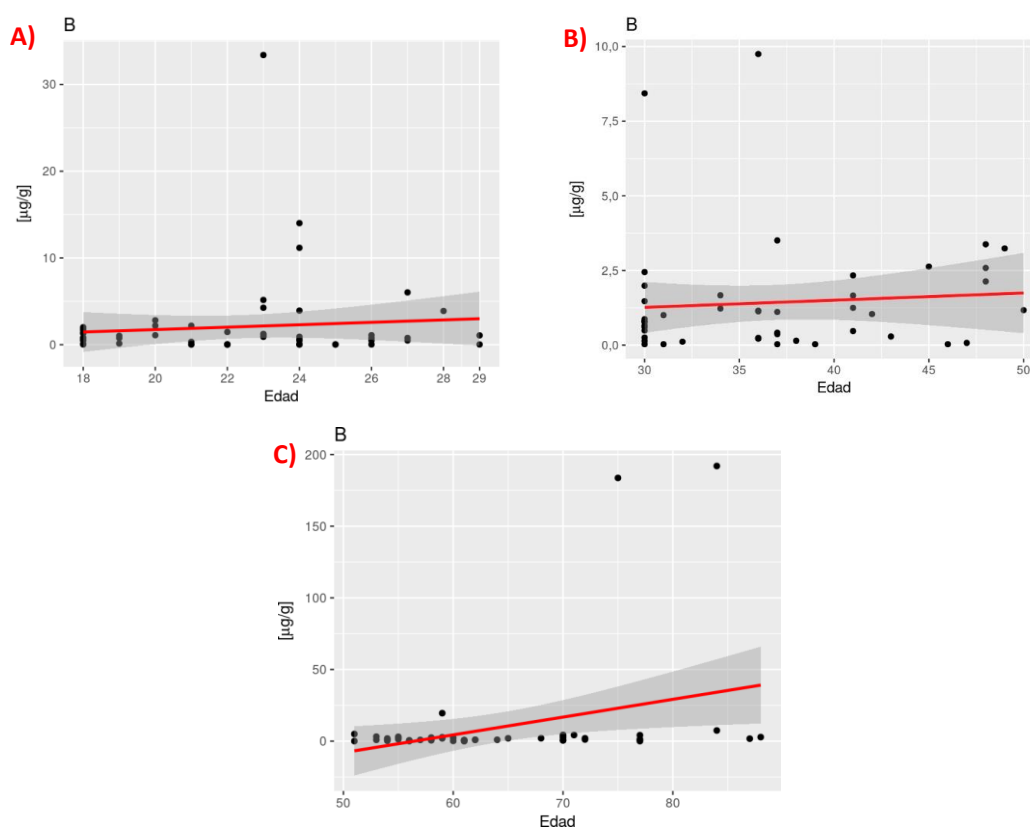
Ecuaciones de regresión para la estimación de la edad en función de las concentraciones de boro por grupos de edad en dentina humana

Elemento traza	Rango de edad (años)	Ecuación de regresión	R ²	p-valor
Esencial B	<30	$y = 22,275 + 0,057 * x$	0,008	0,514
	30-50	$y = 36,37 + 0,27 * x$	0,007	0,598
	>50	$y = 63,401 + 0,087 * x$	0,108	0,021

Nota. R², coeficiente de determinación; p, p-valor; “y” representa la edad del diente; “x” la concentración de boro. A partir de $p < 0,05$, se consideró estadísticamente significativo, resaltado en negrita.

Figura 56

Ecuaciones de regresión del boro en función de la edad



Nota. (A) Sujetos menores de 30 años; (B) Sujetos entre 30-50 años; (C) Sujetos mayores de 50 años

Los resultados más relevantes en el análisis de correlación y de regresión lineal para la estimación de la edad se evidencian en función de las concentraciones de plomo. Del resto de elementos, ninguno de los diagramas de dispersión mostró una relación evidente entre la edad y la concentración de estos, como podemos observar en la Tabla 33 y en la Figura 46 A-J. Respecto a los elementos tóxicos, ninguno de los elementos alcanzó un valor relevante para R^2 , excepto para el Pb ($R^2 = 0,639$). Tampoco se observó una relación significativa entre la edad y los elementos esenciales, el mayor valor de R^2 obtenido fue para el K con un $R^2 = 0,223$. Por tanto, de entre todos los elementos analizados nos centramos en el análisis del plomo para la determinación de la edad.

En el siguiente modelo de regresión no lineal, logarítmica, la variable respuesta es la edad y las covariables son Pb, Pb^2 y $\ln(Pb)$, como podemos ver en la Tabla 44.

Tabla 44

Modelo de regresión logarítmica para el plomo

	beta	SD	T	p-valor	95% CI	
Pb	2,00031	0,3127471	6,40	0,000	1,382213	2,618406
Pb²	-0,0227503	0,0048805	-4,66	0,000	-0,0323958	-0,0131049
ln(Pb)	4,924809	0,9355918	5,26	0,000	3,075756	6,773861
Constante	27,94913	1,007845	27,73	0,000	25,95728	29,94098

Nota. SD: Desviación estándar; p-valor; CI: intervalo de confianza.

El modelo para predecir la edad es el siguiente:

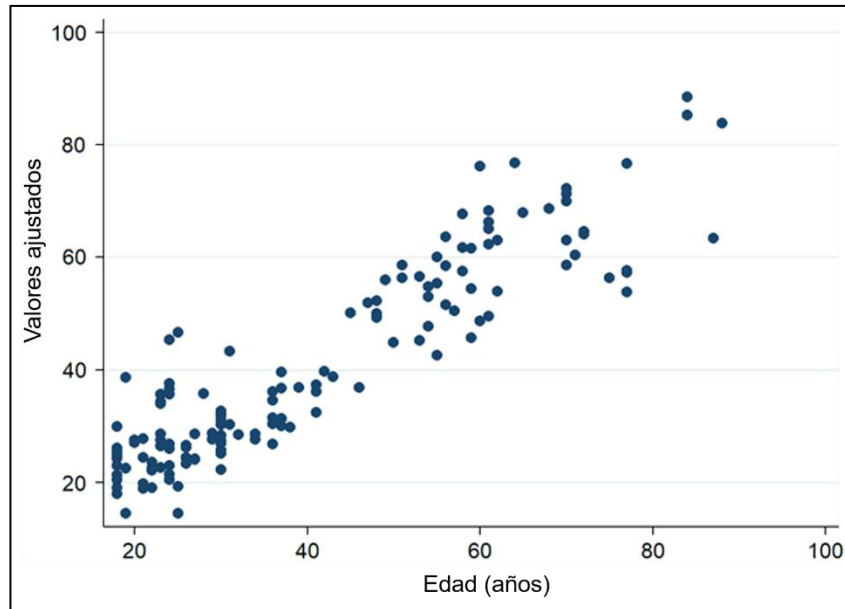
$$\text{Edad} = 27,94913 + 2,00031 * \text{Pb} - 0,0227503 * \text{Pb}^2 + 4,924809 * \ln(\text{Pb})$$

El valor de R^2 ajustado es 0,835, lo que indica que el modelo explica muy bien la edad. A este modelo se le añadió la variable sexo, pero no resultó estadísticamente significativa ($p = 0,536$), ni mejoró el valor R^2 ajustado. El análisis de los residuos mostró un residuo relativamente elevado (*Absolute Value of Studentized Residuals* > 3) para uno de los datos, y con una distancia de Cook mayor que $4/n = 0,027$. Cuando ese dato se descartó y se volvió a ajustar de nuevo el modelo, los resultados fueron prácticamente iguales.

La Figura 57 muestra la relación entre los valores ajustados y los observados de plomo en la dentina en función de la edad.

Figura 57

Valores ajustados de la concentración de plomo en función de la edad



En la Figura 58, observamos las concentraciones de plomo de cada sujeto en función de la edad. Y la Figura 59 muestra la línea de tendencia ajustada al modelo logarítmico.

Figura 58

Concentración de plomo ($\mu\text{g/g}$) de cada sujeto analizado en función de la edad

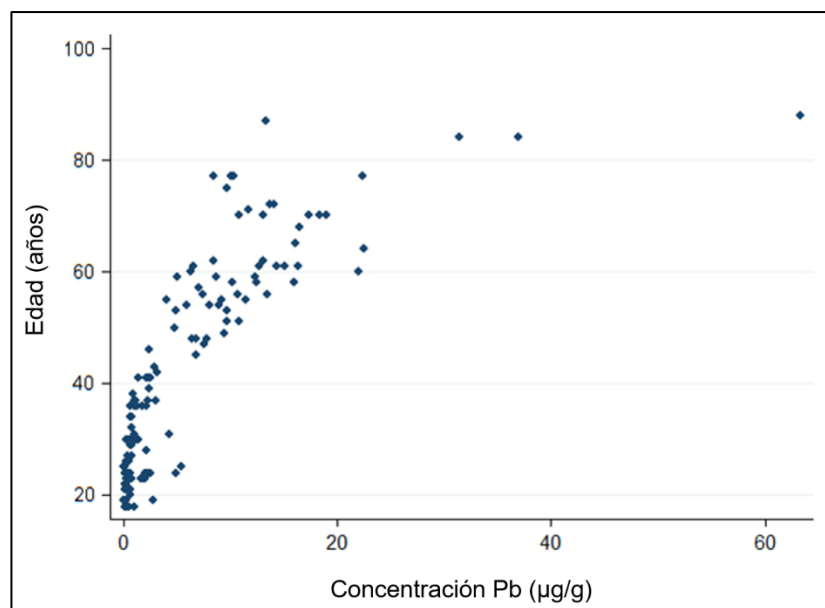
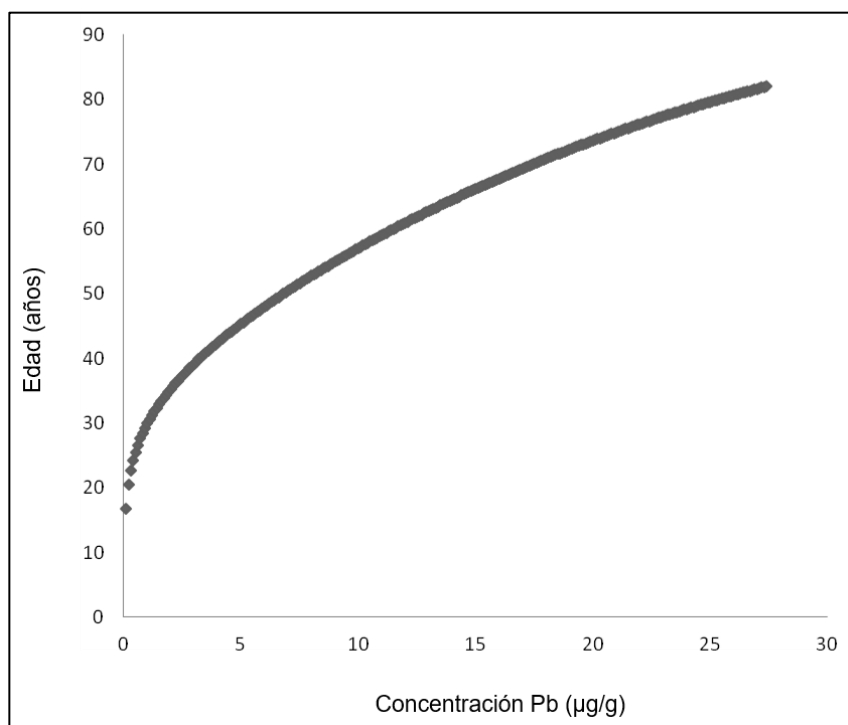


Figura 59

Línea de tendencia ajustada al modelo de regresión logarítmica propuesto para el plomo para la estimación de la edad

**4.1.7. Análisis de componentes principales (PCA)**

Realizamos también un Análisis de Componentes Principales (PCA) para identificar gráficamente si las muestras difieren y qué elementos traza eran los responsables de estas diferencias (Figura 60 A-D).

El PCA realizado con los 25 elementos traza correlacionados permitió encontrar tres dimensiones. El PCA reveló que existen tres componentes muy importantes en relación con la estimación de la edad.

El PCA global, para todo el rango de edad comprendido entre los 18 y los 88 años, se obtuvo con el test de Kaiser Meyer y Olkin, $KMO = 0,57$, los tres factores explican un 44% de la varianza. El factor 1 fue caracterizado por una alta contribución positiva de Ca, Na, Mg, P y Ti, mientras una contribución negativa fue observada en el caso de Co, Fe, As y Ni. Con relación al factor 2, Cr, V, Ni, Fe y Mn demostraron una fuerte contribución positiva. El factor 3 fue caracterizado por una alta contribución positiva de B, Ba y Al (Figura 60 A).

Al analizar el PCA por grupos de edad obtenemos los siguientes resultados:

En el grupo I (<30 años) la utilidad del PCA fue confirmada con el test Kaiser Meyer

y Olkin, $KMO = 0,60$, siendo explicado el 56% de la varianza con tres factores. El factor 1 fue caracterizado por una alta contribución positiva de Ca, Mg, Na, P y Ti, mientras una contribución negativa fue observada en el caso de Al, As, B, Co, Pb y Sn. Con relación al factor 2, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni y V demostraron una fuerte contribución positiva. El factor 3 fue caracterizado por una alta contribución positiva de Ba, K, Se, Sr y Zn (Figura 60 B).

En el grupo II (30-50 años), $KMO = 0,57$ indicó la utilidad del PCA, el cual explica el 54% de la variación con tres factores. El factor 1 fue caracterizado por una alta contribución positiva de Al, As, Co, Fe Ni y Pb y una alta contribución negativa de Ca, Mg, Na, P y Ti. El factor 2, Co, Fe, K y Sr presentaron una fuerte contribución positiva y Ti una fuerte contribución negativa. Factor 3 fue caracterizado por una fuerte contribución positiva de Sr, V y Zn (Figura 60 C).

Finalmente, el factor I del grupo III (>50 años), $KMO = 0,52$ indicó la utilidad del PCA, el cual explica el 45% de la variación con tres factores fue caracterizada por una contribución positiva de Ca, Mg, Na, P y Ti y una contribución negativa por As y Co. El factor 2 señaló tres fuertes contribuciones positivas de parte de Cr, Ni y S, mientras que el factor 3 fue caracterizado por una fuerte contribución positiva de la mano de Al, B y Ba (Figura 60 D).

Figura 60 A

Gráfico de cargas factoriales global, para todo el rango de edad (18-88 años)

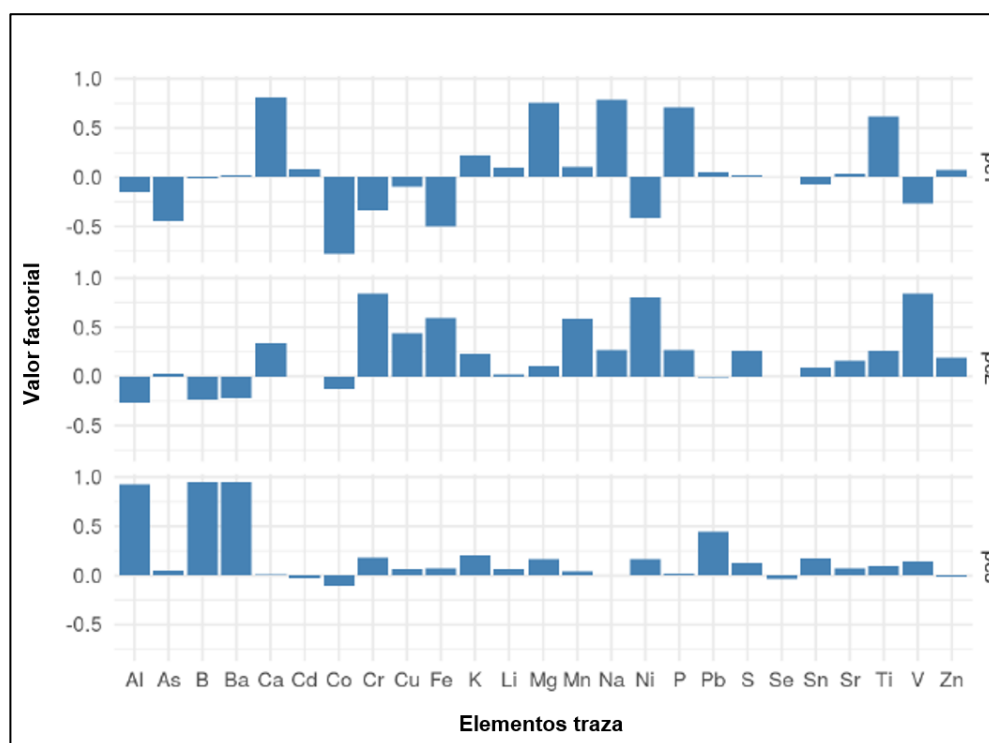


Figura 60 B

Gráfico de cargas factoriales para el rango de edad <30 años

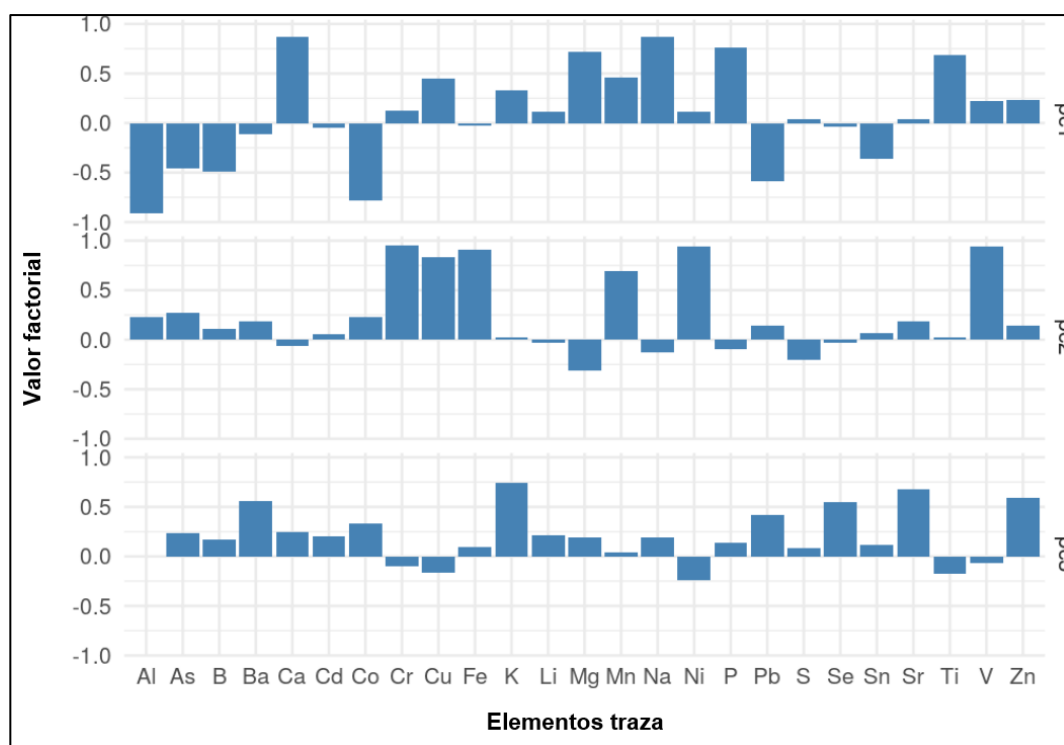


Figura 60 C

Gráfico de cargas factoriales para el rango de edad 30-50 años

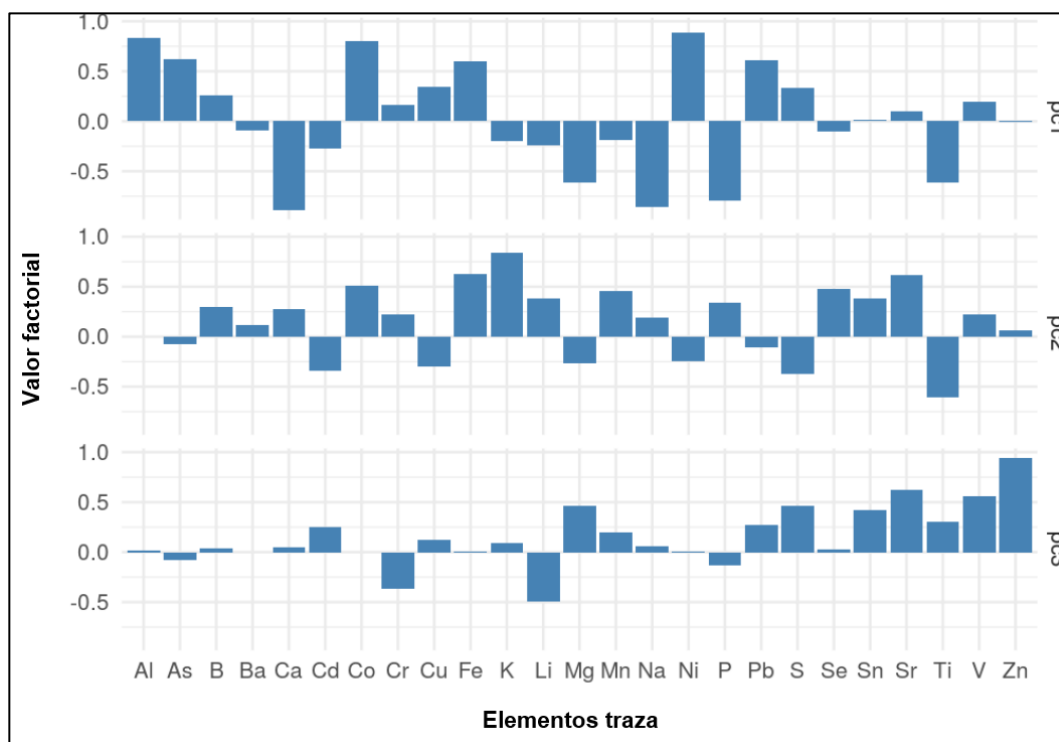
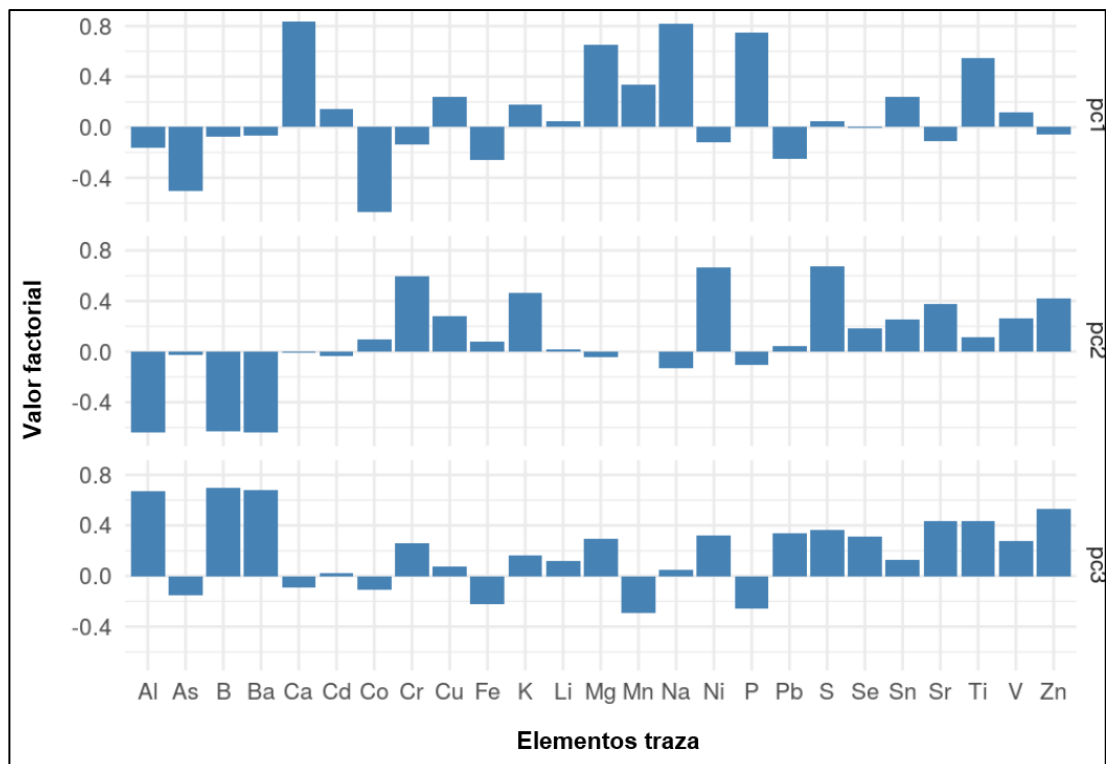


Figura 60 D

Gráfico de cargas factoriales para el rango de edad >50 años

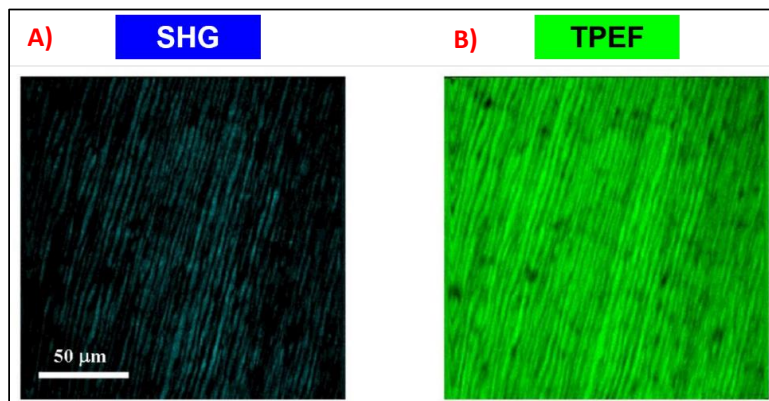


4.2. Objetivo 2

En la Figura 61 podemos observar la dentina, mediante la señal SHG (Figura 61 A) y TPEF (Figura 61 B) con la misma escala de colores. Se observa que la señal TPEF es mucho más intensa que la señal SHG.

Figura 61

Señal multifotónica emitida por la dentina



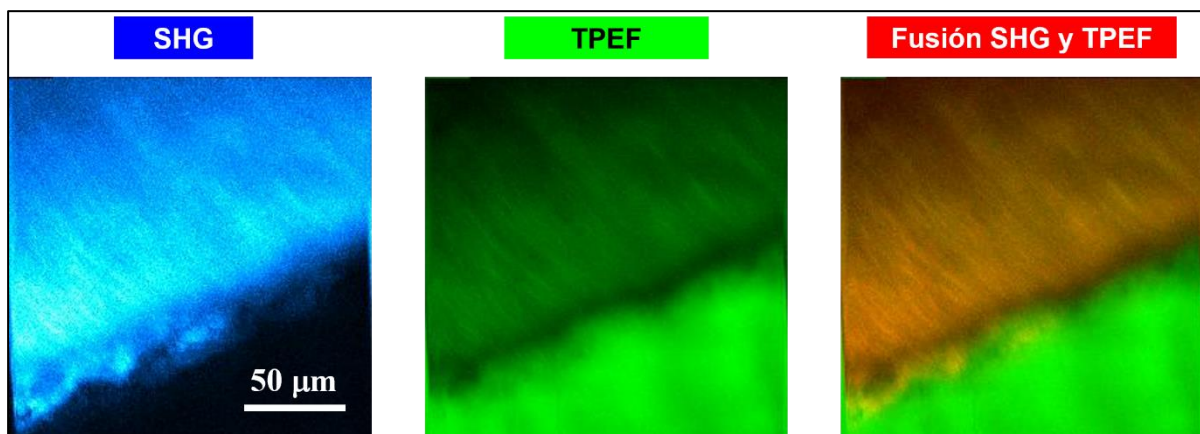
Nota. A) Señal SHG. B) Señal TPEF. Escala: 50 micrómetros.

4.2.1. Unión esmalte-dentina, zona transición estructural entre ambas

Se tomaron imágenes TPEF y SHG de la zona de unión entre el esmalte y la dentina de un sujeto de 24 años, como observamos en la Figura 62. La unión esmalte-dentina en la imagen de la izquierda, la señal SHG solamente la produce la dentina, el esmalte no emite esta señal (zona oscura). En la imagen TPEF, central, se pueden diferenciar claramente las dos zonas, como hemos visto anteriormente tanto esmalte como dentina emiten esta señal. El verde intenso corresponde al esmalte y la otra zona más tenue pertenece a la dentina, por lo que la emisión de TPEF en esta imagen es claramente inferior a la que se produce en el esmalte. En la parte de la derecha podemos ver la imagen que combina ambas señales no lineales superpuestas. En color marrón, la zona de la dentina, que combina ambas señales TPEF y SHG y en color verde la que proporciona el esmalte, únicamente en TPEF.

Figura 62

Ejemplo representativo de microscopía multifotónica correspondiente a la unión dentina-esmalte de un diente de un sujeto de 24 años



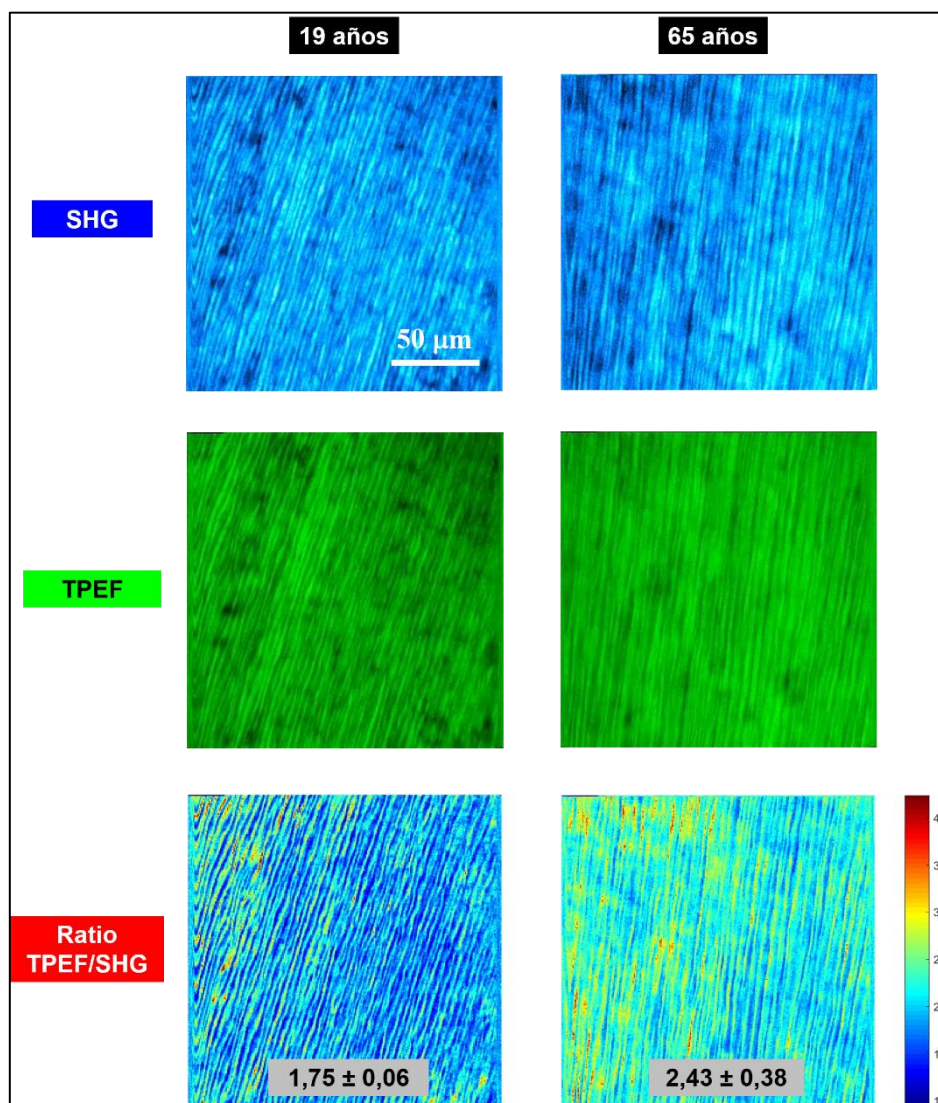
Nota. El esmalte solo produce señal TPEF, mientras que la dentina combina ambas SHG y TPEF.
Escala: 50 micrómetros.

4.2.2. Dentina

En la Figura 63 podemos observar las imágenes de la dentina pertenecientes a un diente de un sujeto de 19 años y a otro de 65 años. Las dos imágenes superiores presentan la señal SHG que emite la dentina (color azul) y las centrales, la señal TPEF que emite también la dentina (verde). En la parte inferior encontramos la superposición de imágenes TPEF y SHG con el mapa de resolución espacial y así como la ratio obtenida entre las intensidades de ambas señales. Se puede apreciar de forma clara los túbulos que presenta la dentina.

Figura 63

Imágenes obtenidas con el microscopio multifotónico (señal SHG y TPEF) de la dentina y superposición de ambas señales de un sujeto de 19 años y otro de 65 años



Nota. Escala: 50 micrómetros.

4.2.3. Ratio TPEF/SHG de la dentina

Los resultados presentes en la Tabla 45 revelan el cociente entre la intensidad TPEF y SHG de cada muestra. En la Figura 64 podemos observar que cada punto corresponde al valor medio obtenido de la ratio. A medida que aumenta la edad, aumenta el cociente entre ambas intensidades; los individuos menores de 30 años muestran una menor intensidad, respecto a los sujetos de mediana y avanzada edad.

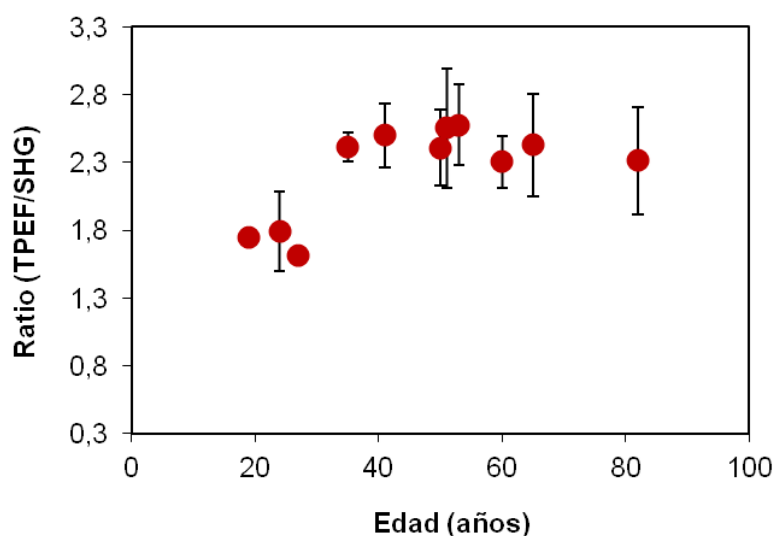
Tabla 45

Ratio de intensidades TPEF/ SHG de la dentina y desviación estándar en función de la edad

Edad (años)	Ratio (media)	Desviación estándar
19	1,75	0,06
24	1,79	0,29
27	1,61	0,05
35	2,42	0,10
41	2,50	0,24
50	2,41	0,28
51	2,55	0,44
53	2,58	0,30
60	2,31	0,19
65	2,43	0,38
82	2,31	0,40

Figura 64

Valores del cociente TPEF/ SHG en función de la edad para las muestras analizadas en el estudio



Si los agrupamos en 3 grupos de edad, se observa que entre el grupo menor de 30 años y el grupo entre 30-50 años hay diferencias significativas ($p = 0,046$), al igual que entre el grupo de menores de 30 años y el grupo de mayores de 50 años ($p = 0,024$). Sin embargo, entre este último grupo y el grupo de mediana edad no se observan diferencias significativas ($p = 0,877$) (Tabla 46 y Figura 65).

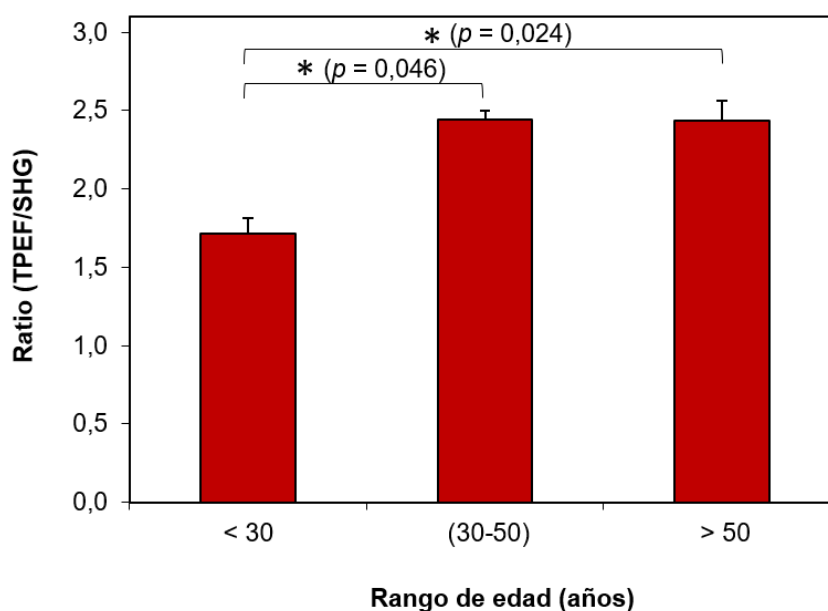
Tabla 46

Ratio TPEF/SHG (media) y desviación estándar en los 3 grupos de edad estudiados

Rango de edad (años)	Ratio (media)	Desviación estándar
Menor de 30	1,72	0,09
30 - 50	2,44	0,05
Mayor de 50	2,44	0,13

Figura 65

Razón TPEF/SHG media por grupos de edad; menor de 30 años, entre 30 y 50 años y mayor de 50 años



Nota. * A partir de $p < 0,05$, se consideró estadísticamente significativo.

4.2.4. Áreas locales e imagen global

Realizamos una comparación entre el cociente de la señal TPEF/SHG de las áreas individuales (local) y la imagen global y cómo podemos observar en la Tabla 47, no existen diferencias significativas entre la ratio TPEF/SHG local y global. Por lo tanto, no es necesario realizar un análisis local, siendo suficiente un análisis global. La relación entre las ratios global y local genera una línea recta ($y = 1,0525 * x + 0,0027$, $r = 0,996$), que podemos visualizar en la Figura 66.

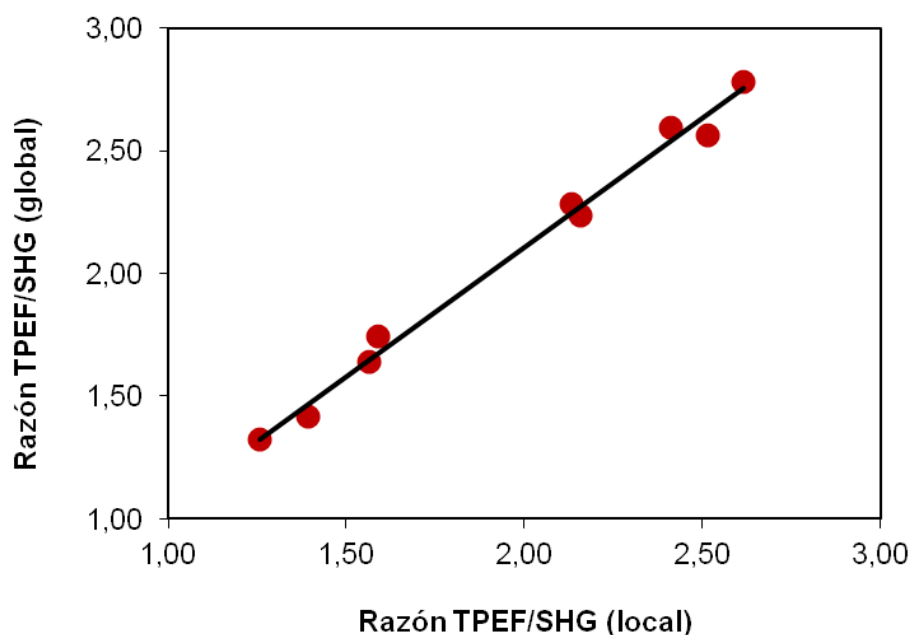
Tabla 47

Valores de la ratio TPEF/SHG de imágenes locales e imagen global de la dentina

Ratio TPEF/SHG local	Ratio TPEF/SHG global
1,39	1,42
1,56	1,64
1,26	1,32
1,59	1,75
2,61	2,78
2,16	2,24
2,51	2,56
2,41	2,59
2,13	2,28

Figura 66

Comparación entre la razón TPEF/SHG que se ha obtenido de forma local y de forma global



4.2.5. Valores Índice de edad

Los valores Índice de Edad "SAID", obtenidos a partir de la ecuación 3, también se incrementan al aumentar la edad, como la ratio TPEF/SHG. Como podemos ver en la Tabla 48 y en la Figura 67. La ecuación de la línea de ajuste de la gráfica es: $y = 0,003 * x + 0,2597$ y un coeficiente de correlación $r = 0,768$ ($p = 0,006$).

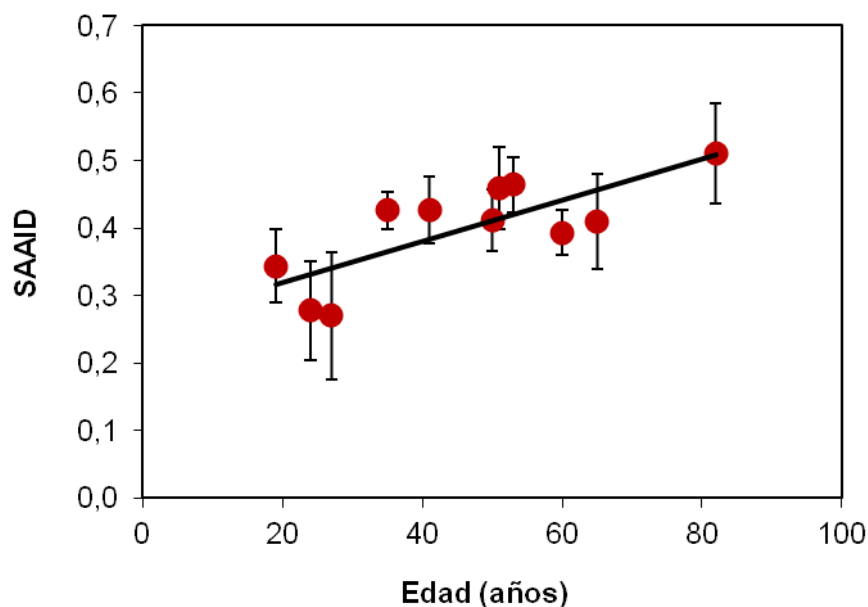
Tabla 48

Valores SAAID para todos los sujetos y su desviación estándar

Edad (años)	SAAID	Desviación estándar
19	0,34	0,05
24	0,28	0,07
27	0,27	0,09
35	0,43	0,03
41	0,43	0,05
50	0,41	0,05
51	0,46	0,06
53	0,46	0,04
60	0,39	0,03
65	0,41	0,07
82	0,51	0,07

Figura 67

Valores de SAAID en función de la edad para todas las muestras analizadas en el estudio



Nota. Las barras corresponden a la desviación estándar dentro de cada diente

A continuación, podemos observar en la Tabla 49 y en la Figura 68 y los valores medios del parámetro SAAID, obtenidos a partir de la ecuación 3, divididos en 3 grupos de edad. El parámetro varía significativamente entre los sujetos jóvenes (<30 años) y los de

mediana edad (30-50 años) ($p = 0,046$), al igual que entre el grupo de menores de 30 años y los de mayores de 50 años ($p = 0,024$). Mientras que no se encuentran diferencias significativas entre el grupo de mediana edad (30-50) y el de edad avanzada (>50 años) ($p = 0,544$).

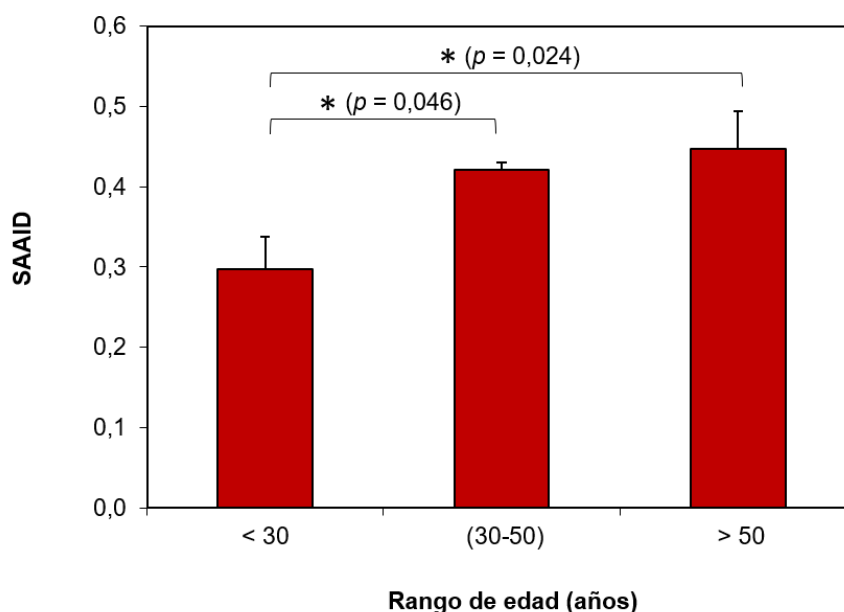
Tabla 49

SAAID (media) y desviación estándar en los 3 grupos de edad estudiados

Rango de edad (años)	SAAID (media)	Desviación estándar
Menor de 30	0,30	0,04
30 - 50	0,42	0,01
Mayor de 50	0,45	0,05

Figura 68

Valores medios del parámetro SAAID en los 3 grupos de edad



Nota. * A partir de $p < 0,05$, se consideró estadísticamente significativo

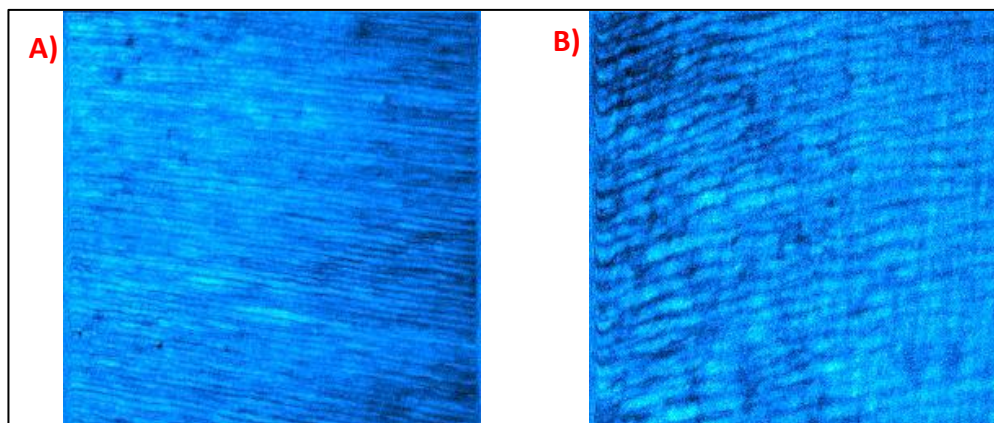
4.2.6. Tamaño de los túbulos de dentina

En cuanto al tamaño de las fibras, observamos que los túbulos más gruesos pertenecen a sujetos de mayor edad y los túbulos más estrechos a los más jóvenes. En las imágenes mostradas a continuación vemos los túbulos de una persona de 19 años (Figura 69 A) y otra de 82 años (Figura 69 B). En la Tabla 50 y Figura 70 observamos la variación

del tamaño de los túbulos de la dentina (μm) con la edad, se obtiene un coeficiente de correlación $r = 0,771$, con un p -valor = 0,005 ($y = 0,0407 * x + 3,1147$).

Figura 69

Túbulos de la dentina observados con SHG



Nota. A) Sujeto de 19 años. B) Sujeto de 82 años

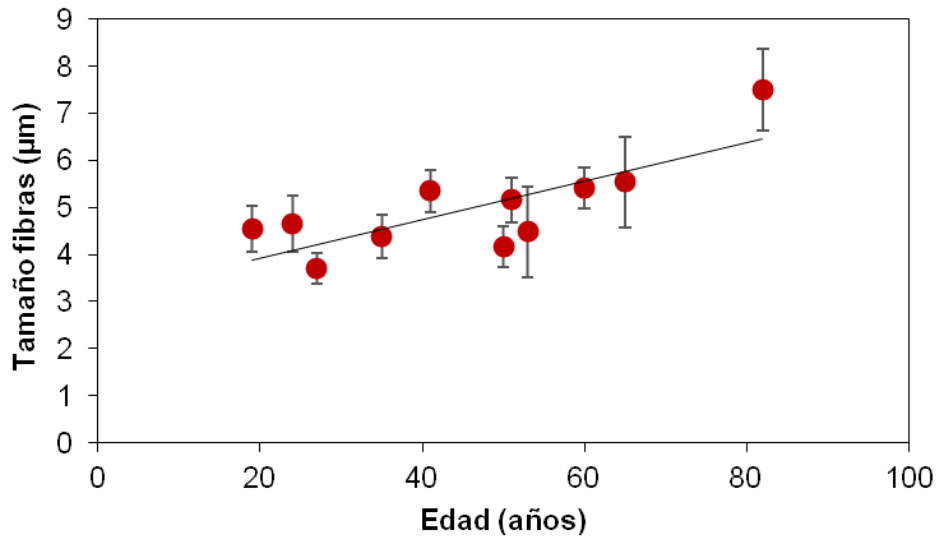
Tabla 50

Tamaño de las fibras de los túbulos de la dentina (μm) y desviación estándar en función de la edad (años)

Edad (años)	Tamaño túbulos de dentina(μm)	Desviación estándar
19	4,55	0,49
24	4,66	0,60
27	3,70	0,32
35	4,39	0,46
41	5,35	0,44
50	4,16	0,42
51	5,15	0,48
53	4,48	0,97
60	5,42	0,43
65	5,54	0,96
82	7,49	0,88

Figura 70

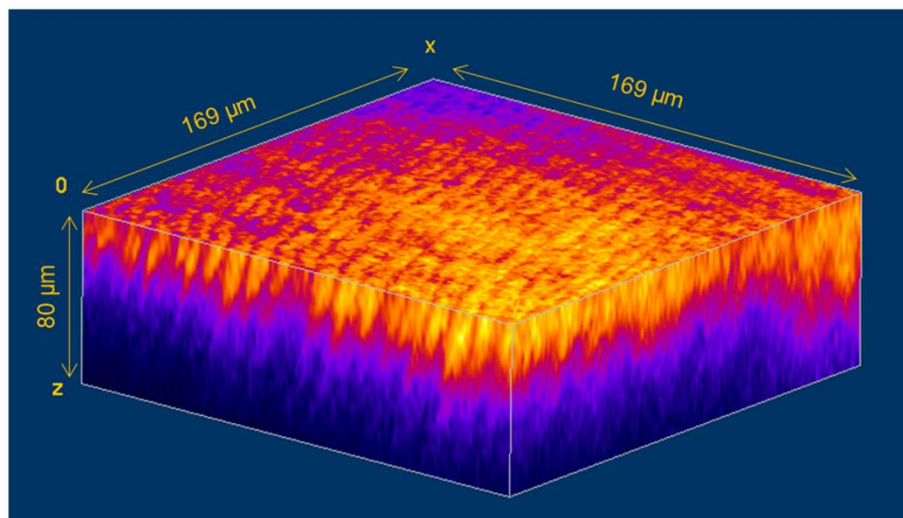
Variación de tamaño de las fibras de los túbulos de la dentina (μm) respecto a la edad (años)



En la Figura 71 observamos la reconstrucción 3D de la dentina por imágenes SHG, gracias a la confocalidad inherente de la microscopía multifotónica. El proceso tridimensional permite la visualización individual de los túbulos de la dentina y de las fibras de colágeno.

Figura 71

Imagen 3D de la dentina, a partir del SHG



5. DISCUSIÓN

La determinación de la edad es uno de los aspectos más importantes en la Antropología y Odontología Forense, tanto en sujetos vivos como fallecidos, su esclarecimiento en muchas ocasiones es determinante para la resolución de los casos. Son numerosos los procedimientos descritos por la literatura científica para la estimación de la edad, siendo los dientes, el objeto de nuestro estudio, una matriz biológica fiable debido a la naturaleza única y singular que presentan estos.

5.1. Objetivo 1: Determinación de elementos traza en dentina humana para la estimación de la edad

En este estudio hemos analizado las concentraciones de 25 elementos traza en la dentina de 150 sujetos sanos con una media de edad de $40,37 \pm 1,55$ años, en función del sexo (42% hombres y 58% mujeres), para determinar la relación entre la acumulación de estos elementos traza y la edad, con el fin de establecer si la dentina es un material biológico apropiado del depósito de los elementos a largo plazo para el estudio de la edad en investigaciones forenses.

En los años 30, Dreal, Lowater y Murray señalaron que los dientes contienen una amplia variedad de elementos traza (Dreal, 1936, Lowater & Murray, 1937). Los elementos traza en los dientes se incorporan al organismo por diferentes medios, tales como la comida, el aire o el agua (Asaduzzaman et al., 2017). Algunos de ellos tienen un papel esencial, tanto para la salud humana en general como para la salud dental; participan en importantes procesos biológicos, aunque en muchos casos no se conoce la función que realizan de forma precisa (Nordberg & Nordberg, 2016). En el caso de los elementos tóxicos o potencialmente tóxicos, estudios previos indican la importancia del análisis de los elementos traza en la dentina y en el esmalte de dientes permanentes para proporcionar información cronológica sobre la exposición, actuando como un bioindicador fiable de la contaminación ambiental (Asaduzzaman et al., 2017).

Como indica Brown et al. (2004) y Asaduzzaman et al. (2017), en sus respectivas investigaciones, es importante estudiar las concentraciones de los elementos en la dentina y el esmalte por separado; ya que la dentina, como hemos dicho, es un buen indicador del estado de salud actual y del estado mineral debido a que se van depositando elementos a lo largo de la vida, y en cambio el esmalte puede ser más representativo de los cambios acumulados a lo largo del tiempo y del estado mineral, pero solo hasta que el diente madura, ya que el esmalte se convierte entonces en un sistema inactivo.

En los dientes primarios la mineralización de la corona comienza intrauterinamente y se completa después del nacimiento, por lo que suelen ser afectados por alteraciones

sistémicas prenatales (Fischer et al., 2009), en cambio en los dientes permanentes, la mineralización comienza en el momento del nacimiento, excepto algunas excepciones, por lo que solo pueden ser afectados por trastornos postnatales (de Ferraris & Muñoz, 2009), de ahí el hecho de que seleccionáramos para nuestra investigación estos últimos. Las concentraciones de los elementos traza en los dientes permanentes están influenciados por el estilo de vida, el ambiente bucal, la edad, etc. Los elementos se depositan primero en la estructura de los dientes durante la calcificación de estos y después de la erupción se van incorporando a través del intercambio que se produce con la sangre y la saliva. Los procesos mediante los cuales se van depositando los elementos en la dentina son graduales, además el metabolismo de los dientes es más lento que en otros órganos, por lo que su movilidad es mucho más baja que en otros tejidos duros. Por tanto, las concentraciones de los elementos permanecen sin cambios significativos durante un largo periodo de tiempo (Tanaka et al., 2004; Fischer et al., 2009). En los últimos años se ha considerado al diente como una excelente matriz para el estudio a largo plazo de la acumulación de los elementos traza, debido a su fácil obtención, morfología, microestructura y composición química (Kumagai et al., 2012), en comparación con el hueso, que es difícil de obtener. Otras matrices distintas como el pelo y las uñas pueden ser también útiles para la determinación de elementos traza, pero son inadecuados debido a la alta probabilidad de contaminación por polvo, champú, laca de uñas, tinte, etc. y serían bioindicadores asociados a medio plazo, ya que la acumulación sería de pocos meses o años. Otros bioindicadores como la sangre u orina proporcionan solamente información de exposiciones recientes (Arruda-Neto et al., 2009).

Los molares y premolares fueron los dientes analizadas en este estudio porque son las extracciones más comunes con propósitos ortodónticos (Schroeder et al., 2012; Araújo & Caldas, 2019). Son los dientes más grandes y los que están mejor protegidos en la cavidad oral. Ambos tipos de dientes emergen y marcan el inicio del reemplazo dental. Además, desde un punto de vista forense, como en los casos de destrucción de un cuerpo por putrefacción o en situaciones de grandes catástrofes, son normalmente los dientes mejores preservados (Krishan et al., 2015). Para analizar la posible estimación de la edad con las concentraciones de los elementos traza estudiados, analizamos 150 dientes sanos, de las que 109 eran molares y 41 premolares.

Las variaciones étnicas y geográficas han demostrado ser un factor distintivo en las concentraciones de los elementos traza en los dientes, por lo que se requiere analizar a cada población independientemente. Este hecho se confirma en distintos estudios, donde evidencian diferencias significativas de los elementos traza entre diferentes poblaciones. En este sentido, en el estudio realizado por Brown et al. (2004), analiza las concentraciones

de oligoelementos en dientes (esmalte y dentina) de dos poblaciones, Uganda y Reino Unido, de forma separada. Al igual que en las investigaciones realizadas por Asaduzzaman et al. (2017), en este caso distinguiendo entre población china, malasia e india y He et al. (2016), en el que diferencia entre etnia Han y Hui (musulmana) en Xi'an, China.

En nuestro conocimiento en población española, no existen descritas concentraciones de elementos traza en grandes series de dientes permanentes, de ahí, la importancia de esta investigación. Por otro lado, otros factores que hemos tenido en cuenta en nuestro estudio han sido el género, la edad y el tipo de diente. Como indican Fischer et al. (2009) el consumo de tabaco y la dieta influyen en las concentraciones de los elementos en la dentina, por lo que excluimos muestras de pacientes fumadores e incluimos solamente sujetos españoles por suponer un consumo generalizado de dieta mediterránea.

Para una mejor comprensión de los resultados, clasificamos los elementos traza en dos grandes grupos. Como elementos esenciales más importantes, encontramos, calcio y fósforo, siendo los elementos más abundantes obtenidos. Aluminio y plomo son los elementos tóxicos más cuantiosos encontrados. En nuestra investigación, la espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) fue la técnica aplicada principalmente para determinar las concentraciones de los elementos traza debido a su alta sensibilidad. La espectrometría de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES) fue usada en los casos donde no fue necesaria una sensibilidad tan elevada, ya que las concentraciones de los elementos traza eran mayores.

En nuestro estudio hemos encontrado como elementos esenciales o potencialmente esenciales más abundantes en la dentina, además de calcio y fósforo, el magnesio y sodio. Como señalan Fischer et al. (2009) y Prashanth et al. (2015), estos cuatro elementos constituyen los iones metálicos más abundantes que forman el tejido mineralizado de los dientes, la hidroxiapatita. Su fórmula en general es $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, abreviado como CaHAP (Wakamura et al., 1998; de Ferraris & Muñoz, 2009) y son mayoritariamente sales minerales cálcicas de fosfato y carbonato. Las concentraciones medias más elevadas obtenidas en nuestra investigación fueron de calcio y fósforo (251937,1 ppm y 122143,3 ppm respectivamente). Debido a que como indican entre otros autores Loch et al. (2014), son los dos componentes principales de la hidroxiapatita. El calcio es el principal integrante, representando una media del 43% de los componentes minerales de la dentina y el fósforo constituye aproximadamente el 32%, siendo el segundo elemento principal. La concentración de calcio en nuestro estudio no se correlacionó de manera estadísticamente significativa con la edad, ya que es el principal componente de la apatita, al igual que indican Saber-Tehrani et al. (2007) en su investigación.

La hidroxiapatita no es estequiométrica respecto a su fórmula química, ya que se

van incorporando distintos iones a lo largo de la vida (de Ferraris & Muñoz, 2009; Fischer et al., 2013; Loch et al., 2014; Singh et al., 2015). Las sustituciones por elementos menos abundantes son muy comunes (el nombre “apatito” viene del griego y significa “engañoso”) (Carlson, 1990). El agua que existe en la periferia del cristal constituye la capa de solvatación o de hidratación que facilita el transporte de los iones hacia el cristal de la hidroxiapatita (Carlson, 1990; de Ferraris & Muñoz, 2009).

La superficie estructural y las propiedades de la hidroxiapatita van siendo alteradas por el intercambio iónico del Ca^{2+} (radio 0,099 nm) con diferentes metales iónicos. Se ha observado que los iones divalentes como Cu^{2+} (radio 0,072 nm), Ni^{2+} (radio 0,069 nm) y Pb^{2+} se introducen en esta, influenciados por la actividad catalítica de este material (Wakamura et al., 1998). También algunos elementos poseen propiedades similares a los que forman la CaHAP contenida en los dientes y demás tejido calcificado, van reemplazando los componentes minerales de esta, por ejemplo, los cationes divalentes tales como el Ba y particularmente el Sr interactúan y reemplazan los huecos isovalentes del calcio en la dentina (Li et al., 2013; Asaduzzaman et al., 2017), tanto los cationes de bario como los de estroncio presentan un diámetro mayor que el calcio (Wakamura et al., 1998).

Los elementos tóxicos más abundantes que encontramos en la dentina han sido el aluminio y el plomo, cuya mayor acumulación también coincide con los resultados obtenidos por Carlson (1990). En este mismo sentido Amr & Helal (2010) observaron un alto contenido en plomo en su estudio, en el que se analizaron 64 dientes de niños y 112 dientes permanentes, cuya edad oscilaba entre los 40 y 60 años, de sujetos procedentes de El-Kanayat (Egipto).

Se observa que el Ca^{2+} es fácilmente sustituido por el Pb^{2+} en la hidroxiapatita (Wakamura et al., 1998; Rao et al., 2010), los iones de Pb^{2+} (0,12 nm) reemplazan a los iones de Ca^{2+} (0,099 nm), siguiendo esta ecuación $\text{Pb}_{(10-x)}\text{Ca}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (Ghadimi et al., 2013). Ya en 1964 Dallemagne observó este reemplazo (Frank et al., 1990). El plomo es uno de los elementos más significativos contaminantes del medio ambiente. Los dientes y especialmente la dentina son el principal lugar de deposición acumulativa de plomo, debido a la baja solubilidad del fosfato de plomo (Åberg et al., 1998), lo que proporciona una evidencia de la exposición temprana a este (Rao et al., 2010; Zapico et al., 2019b). Convirtiéndose los dientes, por tanto, en un indicador de la contaminación por plomo y más específicamente la dentina cuya acumulación se produce a lo largo de la vida y se relaciona con el plomo presente en la sangre (Bercovitz & Laufer, 1990).

El aluminio puede reemplazar al calcio, y tal vez al fósforo, en los minerales de apatito y parece ofrecer protección contra la caries. Sin embargo, los mecanismos de reacción química en la hidroxiapatita no se han estudiado con mucho detalle (Tanaka et al.,

2004). La exposición de aluminio en humanos va aumentando, mediante la biodisponibilidad en las plantas y en la vida acuática, las cuales parecen haber aumentado debido a la lluvia ácida y a las emisiones industriales (Brown et al., 2004).

Nuestros resultados mostraron que, con la excepción del Zn en ambos tipos de dientes y B y Ba en premolares, la mayoría de los elementos aumentan al incrementarse el rango de edad, alcanzando una significación estadística en la mayoría de ellos. Por lo tanto, en base a nuestros resultados, ambos tipos de dientes podrían ser usados para estimar la edad. En la literatura científica existe escasa y dispar información de la concentración de los elementos traza en distintos tipos de dientes. En este sentido, un estudio que analizó la concentración de plomo en esmalte y dentina demostró que su acumulación depende del tipo de diente, los dientes con una erupción o formación más antigua presentaban un mayor contenido en plomo (Purchase & Fergusson, 1986). En cambio, otros autores (Bercovitz & Laufer, 1990) refieren que el tipo de diente no es un factor que afecte a la acumulación de plomo en adultos. Por otro lado, en la investigación realizada por Nowak y Kozłowski (1998), donde se analizaron 40 dientes cariados no se encontraron diferencias en las concentraciones de los elementos traza entre incisivos, caninos, molares y premolares. En el estudio de Kumagai realizado en una muestra de 121 dientes sanos de población japonesa, tampoco se encontraron diferencias entre los tipos de dientes analizados: caninos, premolares y molares (Kumagai et al., 2012).

En nuestro estudio, los dientes los clasificamos en tres grupos de edad y para encontrar los valores de corte apropiados usamos la Curva ROC. En las investigaciones forenses, dar un amplio rango de edad, unos 20 años al menos, es lo frecuente y recomendado, especialmente en casos de personas fallecidas y particularmente en adultos, ya que proporcionar un menor rango de edad puede llevar a una estimación de la edad incorrecta (Cunha et al., 2009).

Diferentes métodos para estimar la edad usando tanto tejidos dentales e histológicos, como técnicas radiográficas y procedimientos bioquímicos están siendo desarrollados en la actualidad (Cugati et al., 2015; Pinchi et al., 2015; Shruthi et al., 2015; Elshehawi et al., 2016; Capitaneanu et al., 2017; Nedunchezian et al., 2018; Sirin et al., 2018). La madurez dental juega un papel significativo en la estimación de la edad tanto infantil como adolescente (Ambarkova et al., 2014). Los métodos radiográficos ayudan a determinar la mineralización que presentan los dientes (Nuzzolese & di Vella, 2012; Olze et al., 2012), estos proporcionan una mejor aproximación de la edad cronológica que la de los huesos (Williams, 2001), ya que dicha mineralización de los dientes resulta menos afectada por la variabilidad del estado nutricional del individuo y del sistema endocrino. Las etapas de desarrollo de los dientes, dadas por Demirjian et al. (Arto et al., 1973) son las más usadas

para la estimación de la edad en diferentes poblaciones (Krishan et al., 2015).

Numerosos estudios han estimado la edad de los dientes basándose en otros métodos, tales como, la racemización del ácido aspártico, los cambios morfológicos, histológicos y funcionales en los dientes, la imagen dental, cambios en la dureza y en la elasticidad de la dentina (Valenzuela et al., 2002; Senawongse et al., 2006; Carvalho & Lussi, 2017; Marroquin et al., 2017; Sirin et al., 2018).

Diferentes autores sugieren que los valores de referencia de los elementos traza en la dentina pueden ser útiles para la estimación de la edad (Ritz-Timme, 2000; Kumagai et al., 2012). La formación de la dentina continúa durante toda la vida del diente, a su vez la cavidad pulpar se va reduciendo de forma progresiva, las altas concentraciones de plomo en la pulpa podría ser debido a la presencia de dentina secundaria, que concentra el plomo o la materia orgánica residual en la pulpa (Kang et al., 2004). La dentina y la pulpa están interconectadas, por lo que los cambios que se producen en una se reflejan en la otra. Ya que la cantidad de elementos traza que hay en la dentina puede cambiar con la edad, se considera un índice biológico fiable (*reliable biological load index*) (Kumagai et al., 2012). Pero a pesar de todo esto, los estudios en la literatura científica de elementos traza en la dentina son escasos (Kumagai et al., 2012; Derise & Ritchey, 1974; Derise et al., 1974). Kumagai et al. 2012, en su análisis de relación con la edad de la concentración de 10 elementos traza en dentina -B, Mn, Co, Cu, Zn, Rb, Sr, Mo, Cd, Pb- sugirió que la dentina humana es un material apropiado para la estimación del sexo y la edad, acordes con los resultados de nuestro estudio.

El análisis de las concentraciones de Pb evidencian que es el único elemento tóxico analizado que exhibe diferencias significativas en función del sexo, los hombres presentaron mayores niveles que las mujeres. Respecto a los elementos esenciales en nuestro estudio observamos diferencias estadísticamente significativas entre ambos sexos, en Na y Co (concentraciones más altas en mujeres) y en K, Ba y Ni (concentraciones más altas en hombres). Estos resultados, corroboran las observaciones hechas por otros autores como Kumagai et al. (2012), para el Pb y Co y Al-Qattan y Elfawal (2010) para el Pb.

Nuestros datos muestran que, del total de 25 elementos analizados, solo 10 tienen una correlación significativa positiva con la edad, de los cuales 3 son tóxicos o potencialmente tóxicos y 7 son esenciales (Sr, Mg, S, K, Zn, Ba, B). Los coeficientes de correlación con la edad en los elementos tóxicos oscilaron entre 0,401 y 0,880. Y en el caso de los elementos esenciales oscilaron entre 0,185 y 0,399. En cuanto a los elementos tóxicos o potencialmente tóxicos, los tres (Li, Sn, Pb), correlacionan de forma positiva y estadísticamente significativa con la edad (Alomary et al., 2006).

Respecto al análisis de la media de las concentraciones de Pb, Li y Sn en nuestro estudio encontramos un incremento significativo en los 3 grupos de edad analizados, mientras que el resto de los elementos tóxicos no mostraron esta tendencia. La mayor correlación positiva de Pb con la edad ($r = 0,880$) puede ser debido a su afinidad por las fibras de colágeno y a su acumulación en el tejido calcificado (Lane & Peach, 1997; Vandeputte et al., 1990), el cual también ha sido referido por otros autores (Nowak & Chmielnicka, 2000; Kern & Mathiason, 2012; Kumagai et al., 2012; Assaduzzaman et al., 2017). Por otro lado, el Pb está asociado con los procesos de contaminación ambiental (Lei et al., 2016; Rehman et al., 2017) y su acumulación puede afectar a las concentraciones de otros elementos esenciales como Fe, Zn y Cu (Nowak & Chmielnicka, 2000). Sin embargo, nuestros datos muestran que la acumulación de Pb disminuye significativamente la absorción de Na, pero no con el resto de los elementos analizados.

En el estudio realizado por Skalnaya et al. (Skalnaya et al., 2016) en 618 muestras de cabellos de mujeres, con una edad comprendida entre los 10 y los 59 años, procedentes de Orenburg (Rusia), también se observó que las concentraciones de Li y Sn aumentan con la edad. El Li es ampliamente usado como un tratamiento efectivo para trastornos del estado de ánimo y sin embargo, su uso no está exento de efectos secundarios y que en ocasiones se ha asociado a disfunciones endocrinas importantes como hipotiroidismo, diabetes insípida y alteraciones del metabolismo de la glucosa. Además en relación con su nefrotoxicidad se ha demostrado un descenso de la capacidad de concentración de la orina (Mcknight et al., 2012). Se ha observado que la intoxicación de Sn altera las actividades de algunas enzimas, afectando al metabolismo de Zn, Cu, Fe y Ca y modificando las concentraciones de algunos otros elementos en los tejidos (Assaduzzaman et al., 2017).

Como observamos, Pb, Sn y Li presenta una correlación positiva con la edad y a su vez una importante ($p < 0,01$) correlación positiva entre los tres elementos, $r_{\text{Pb-Li}} = 0,387$, $r_{\text{Pb-Sn}} = 0,459$, $r_{\text{Li-Sn}} = 0,232$. La similitud en el comportamiento de estos tres elementos es explicada por el estudio realizado por Van der Marel et al. (1980), en el que los valores de Li-Sn (1,30 V) eran muy similares a los de Li-Pb (1,25 V). Esto indica que la transferencia de electrones de litio a estaño y de litio a plomo podría tener lugar, ya que se considera que tienen un comportamiento similar, al igual que indica Alblas et al. (1984); las propiedades del sistema de aleación Li-Pb se parecen mucho al de Li-Sn. El modelo propuesto por Van der Marel et al. (1980) asume que los tres metales presentan bandas de conducción parcialmente solapadas. Cuando el plomo o el estaño es añadido al litio, algunos electrones van desde la banda de litio a la del plomo o a la del estaño. El Li-Pb presenta una fuerte tendencia a la heterocoordinación (Anusionwu et al., 2005).

En este sentido, Kumagai et al. (2012) observaron correlaciones positivas entre las concentraciones de B, Co, Cu, Sr, Zn y la edad, corroborando nuestros resultados para B, Sr y Zn, ya que el resto de los elementos analizados no son estudiados en su investigación. Respecto al potasio, Derise et al. (Derise & Ritchey, 1974; Derise et al., 1974) observaron que las concentraciones de este aumentaban con la edad; coincidiendo con nuestros resultados.

El K está implicado en la biomineralización de los cristales de hidroxiapatita, junto a numerosos elementos traza. En nuestro estudio el K es el elemento esencial que mejor explica la variación de su concentración con la edad. Resultados similares fueron obtenidos en la investigación de Sehrawat y Singh (2020) donde diferentes elementos esenciales en la dentina fueron analizados y solo el K exhibió una correlación significativa con la edad.

El magnesio es considerado fisiológicamente como antagonista del calcio, considerándose una vía importante de regulación de las funciones celulares. Se ha observado que los iones de Mg^{2+} con un radio de 0,066 nm interfieren en el crecimiento del cristal de CaHAP (Wakamura et al., 1998). En sujetos sanos la concentración en suero es generalmente estable. Altas concentraciones de Mg séricas son protectoras contra varias enfermedades (El Solh & Rousselet, 1981). Desequilibrios del metabolismo de Mg son frecuentes y pueden contribuir a múltiples condiciones patológicas (Touyz, 2004). Recientes estudios indican que la periodontitis puede ser un factor de riesgo para las enfermedades cardiovasculares, las cuales están también asociadas a deficiencias en Mg (Scannapieco et al., 2003). Interacciones entre distintos elementos traza en las diferentes fases patológicas de la periodontitis podrían explicar su relación entre el estado periodontal y la ratio Mg/Ca. Una alta concentración de magnesio en los dientes puede aumentar la susceptibilidad a la desmineralización y por tanto a la aparición de la caries (Gutowska et al., 2011).

El boro es un elemento que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, en los alimentos y en el agua potable, siendo el origen principal de incorporación al organismo el uso de fertilizantes que contienen borato (Edition, 2011). El boro tiene efectos beneficiosos en el metabolismo de los lípidos, en la prevención de la obesidad y en el metabolismo del tiroides, y podría ser usado como agente cariostático en odontología (Kuru et al., 2019). Se sospecha que la acumulación de dicho elemento en los huesos es varias veces mayor que la concentración de este en sangre y afecta al contenido de calcio en estos (Edition, 2011). El boro se deposita en los dientes como borato cálcico en lugar de fosfato cálcico, cambiando las propiedades del diente así como su resistencia a la caries (Riyat & Sharma, 2010). Nuestros resultados muestran una correlación negativa entre B y Ca y una correlación positiva de B con Li, Pb y Sn.

El estroncio es un elemento esencial en las personas (Schroeder et al., 1972), las concentraciones presentes en los tejidos humanos son relativamente estables. Su presencia es abundante en la naturaleza y está presente en plantas y animales (Riyat & Sharma, 2010). En numerosos estudios como el de Enomoto et al. (2012) se observa como el estroncio actúa como un agente protector contra la caries dental, por las sustituciones que se producen con el calcio de la hidroxiapatita. Se acumula en los huesos y en los dientes, donde presenta importantes funciones, tales como el endurecimiento de ambos tejidos (Riyat & Sharma, 2010). Cuando se produce una exposición crónica o excesiva puede causar disfunciones metabólicas y problemas en la mineralización de los huesos, ya que produce una disminución del calcio presente en estos, conduciendo a una hipocalcemia (Asaduzzaman et al., 2017).

Diversas investigaciones han demostrado que el estroncio presente en la dieta mejora la acumulación del tejido óseo dentinario en los dientes y su carencia afecta negativamente a su mineralización. En los últimos años se ha observado que la administración de suplementos de estroncio como el ranelato de estroncio, disminuye la resorción del hueso y promueve el desarrollo del osteoblasto y la nueva formación de hueso para el tratamiento de la osteoporosis en las mujeres (Reginster, 2002). La adecuada ingesta de oligoelementos es principal, sobre todo en las mujeres, debido a los cambios hormonales que sufren. Se ha observado que también las hormonas influyen en el metabolismo de los elementos traza (Favier, 1996). Las células osteoblásticas parecen tener también un receptor específico que responde solo al estroncio y no a otros minerales tales como el calcio o el sodio (Reginster, 2002).

Nuestros resultados muestran una fuerte correlación entre Sr-Pb y Sr-Sn. Respecto a la correlación positiva significativa que presenta en nuestro estudio el estroncio y la edad, también ha sido observada anteriormente por otros autores, como Kumagai et al. (2012), Sowden y Stitch (1957).

En el estudio llevado a cabo por Asaduzzaman et al. (Asaduzzaman et al., 2017) en 50 dientes permanentes, se observó que la concentración de Ba fue mayor en los sujetos de edad avanzada, coincidiendo con nuestros resultados. El bario tiene una mínima toxicidad para los humanos en general y reemplaza el Ca en la hidroxiapatita de la dentina, pero altos niveles pueden causar una intoxicación aguda (Asaduzzaman et al., 2017). Este elemento es encontrado con un alto porcentaje en los huesos y tejido conectivo y en pequeñas cantidades en el músculo, grasa y piel (Riyat & Sharma, 2010). Se ha observado que la concentración de bario depende del lugar geográfico del estudio realizado (Brown et al., 2004).

Con respecto a las concentraciones de Co y Zn, encontramos diferencias significativas entre los diferentes rangos de edades, observándose una disminución de la concentración de ambos elementos a partir de los 50 años. Los osteoblastos expuestos a iones tales como el cobalto y cromo experimentan una reducción en la reproducción de estos, en función del tiempo de exposición (Fleury et al., 2006).

En nuestro estudio, hemos observado una correlación positiva entre zinc y estaño y por otro lado, las concentraciones de ambos elementos se correlacionan de forma positiva y estadísticamente significativa con la edad. En la investigación realizada por Scholtanus et al. (2009) demostraron que los constituyentes de la amalgama, tales como Zn y Sn penetran en la dentina desmineralizada con mayor facilidad, lo que podría relacionarse con los resultados obtenidos en nuestro estudio. El Zn estimula el crecimiento y la mineralización de los huesos, ya que presenta un efecto sobre los osteoblastos (Rao et al., 2010).

El aumento significativo de S conforme aumenta la edad, puede ser debido a la degradación del tejido óseo, en este caso del tejido dental, ya que se sabe que el azufre es importante para numerosos procesos celulares y metabólicos que se producen en los huesos y el desarrollo de otros tejidos (Nganvongpanit et al., 2016).

En cuanto a las concentraciones de titanio no observamos diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los grupos estudiados, ni ninguna relación significativa con la edad. Se ha demostrado en diferentes estudios que los iones de titanio son tóxicos a concentración a partir de 10 en 24 horas (Zhu et al., 2018).

Otros estudios pasados muestran que, las concentraciones de los iones no metálicos afectan a la diferenciación y a la función de los osteoblastos *in vitro* (El Solh & Rousselet, 1981).

La diversidad de elementos químicos y las múltiples correlaciones existentes entre los elementos traza que componen la dentina, es también confirmada por el PCA.

En general, una elevada contribución positiva de Ca, Na, Mg y P identificamos en el total de la muestra y en los tres grupos de edad. Estos son los cuatro elementos principales que constituyen la dentina y cuyas concentraciones se mantienen a lo largo del tiempo. Resultados similares fueron observados en el estudio realizado por Fischer et al. (2009), en su análisis de componentes principales realizado en sujetos polacos a partir de 142 dientes sanos; 44 deciduos y 98 permanentes, analizados de forma independiente. En este sentido, en el análisis de correlaciones comprobamos en nuestro caso, correlaciones bivariadas estadísticamente significativas entre estos cuatro elementos ($p < 0,01$) y también una alta contribución positiva de Ti, este resultado podría estar asociado a una disminución del tamaño de los cristales y a un aumento de la dureza de los dientes (Ghadimi et al., 2013),

lo que corrobora la alta variabilidad que presenta la hidroxiapatita (Fischer et al., 2009).

En lo que respecta al PCA global, observamos una fuerte contribución positiva de Al, B y Ba, al igual que en el grupo de sujetos mayores de 50 años. Como hemos analizado, boro y bario muestran una correlación significativa positiva con la edad y ambos elementos están fuertemente correlacionados ($p < 0,01$). Por otro lado, también presentan fuertes correlaciones ($p < 0,01$), el boro y el bario con el aluminio.

En términos generales contemplamos como en función de la edad, la contribución de los distintos elementos y la dinámica en la composición de la dentina va variando. La correlación que presentan los elementos traza se confirma a lo largo de la edad.

En el caso del plomo igualmente observamos como su contribución positiva aumenta con la edad, al igual que el resto de los elementos tóxicos, lo que confirma la existencia de una fuerte correlación bivariada entre el plomo, lito y estaño y un aumento estadísticamente significativo en sus concentraciones al aumentar la edad.

En las ecuaciones de regresión, los elementos que son significativamente estadísticos para todo el rango de edad de la muestra analizada son Pb, Sr, Mg, K, Ba y B, siendo el plomo con un coeficiente de determinación mayor; 0,639, el que mejor ajuste presenta. El resto de los elementos exhiben unos coeficientes por debajo de 0,1, lo que indica que el ajuste de la recta no es bueno, excepto en el caso del K, cuyo R^2 es 0,223.

Es el plomo, el elemento que mejor explica la edad en función de la concentración que presenta la dentina. Para la obtención de un mejor ajuste en la ecuación del plomo, realizamos un modelo de regresión logarítmica, en el que obtenemos un coeficiente de determinación elevado, cercano a 1 ($R^2 = 0,835$) y por tanto un gran ajuste, un buen modelo ($y = 27,94913 + 2,00031 * x - 0,0227503 * x^2 + 4,924809 * \ln(x)$, donde $y =$ edad, $x =$ concentración de plomo). En la literatura científica, solo hemos encontrado el estudio realizado Al-Qattan y Elfawal (2010), en el que también se obtiene un modelo de regresión para la estimación de la edad en función del plomo con fines forenses, en este caso es una ecuación lineal ($R^2 = 0,654$) y al igual que la nuestra, es válida para ambos géneros. Dicha investigación está realizada sobre 398 muestras de dientes permanentes de población de Kuwait, con un rango de edad comprendido entre los 11 y los 74 años. En la investigación realizada por Fischer y Wiechula (2016), también obtienen una ecuación de regresión lineal, para todo el rango de edad, significativa pero con un coeficiente de determinación muy bajo ($R^2 = 0,0756$). El estudio está realizado sobre 390 muestras de dientes sanos permanentes de sujetos polacos, con una edad comprendida entre los 13 y los 84 años. Ambos trabajos fueron realizados con espectrometría de absorción atómica (AAS).

Son numerosos los estudios donde relacionan la concentración de plomo y la edad, tales como Bu-Olayan y Thomas (1999), con una muestra de 216 dientes incisivos sanos y una edad entre los 3 y los 74 años, realizada en población kuwaití. Bercovitz y Laufer (1991) también realizaron un estudio sobre 143 dientes permanentes, en Israel, con una edad comprendida entre los 14 y los 60 años.

5.2. Objetivo 2: Microscopía multifotónica aplicada a dientes humanos para la estimación de la edad

La microscopía electrónica ha revelado que los espacios extracelulares se mineralizan con el paso de los años, esto incluye también todas las estructuras de colágeno y todo el volumen existente entre las fibras de colágeno. Actualmente no hay una certeza absoluta si existe más mineral dentro del colágeno o fuera de él, aunque recientes estudios indican que hay más mineral depositado entre el colágeno que dentro de las propias fibras. La microscopía electrónica también revela que las estructuras de colágeno difieren considerablemente del espacio extracelular, este resultado depende tanto de las especies como de los tejidos examinados, así como de la edad y la maduración que presentan (Nanci, 2017).

Desde hace muchos años se ha utilizado la microscopía para el estudio de la morfología y de la composición de la dentina, en principio usando la microscopía óptica, posteriormente la electrónica y en los últimos años la atómica y la confocal. Recientemente se ha aplicado la microscopía de generación armónica, la cual hemos observado que presenta ventajas sobre la tradicional (Elbaum et al., 2007); esta señal se observa a lo largo de la dentina, por la alta cristalización y no-centrosimetría de la matriz orgánica basada en las fibras de colágeno. La microscopía multifotónica es una herramienta apta tanto para *ex vivo* como *in vivo* para la caracterización de tejidos duros y blandos de la cavidad oral (Martínez-Ojeda et al., 2020).

Las ventajas de la microscopía multifotónica no lineal, frente a la fluorescencia lineal son, tal y como indican Uturbe et al. (2007), Bueno et al. (2010), Ávila (2016), Bueno et al. (2016), Martínez-Ojeda et al. (2020):

Debido a su naturaleza no lineal, la probabilidad de absorción depende cuadráticamente de la intensidad de excitación, por lo que solo será posible en un pequeño volumen alrededor del punto focal (autoconfocalidad). Este pequeño volumen, hace que toda la señal detectable se pueda registrar, mejorando por tanto, la relación señal-ruido.

Obteniendo un registro de la señal de fluorescencia más eficiente.

Mayor capacidad de penetración en los tejidos, gracias a la luz infrarroja. Este sistema permite penetrar hasta 700 micrómetros en el tejido, debido a la débil absorción que presenta el agua a estas longitudes de onda. Un microscopio confocal puede penetrar hasta los 200 micrómetros solamente.

No necesita un *pinhole* delante del detector para eliminar la luz proveniente de fuera de foco, ya que posee una confocalidad inherente.

Se reducen los efectos relacionados con el *photobleaching* y la *photo-toxicity*, ya que la luz incidente empleada posee baja energía y, por tanto, alta longitud de onda.

La muestra no necesita preparación previa, ni productos exógenos que la dañen, como son las tinciones o la fijación.

Se obtienen imágenes de alta resolución de forma rápida incluso en capas profundas de los tejidos.

La naturaleza autoconfocal permite el seccionado óptico de los tejidos, así como la realización de reconstrucciones tridimensionales a partir de diferentes imágenes a distintos planos (con separaciones de micrómetros entre sí).

Como desventaja podríamos indicar el elevado coste que supone la adquisición y mantenimiento del láser de luz pulsada.

En los últimos años el uso de la microscopia multifotónica se ha convertido en una herramienta muy útil y con muchas aplicaciones para el estudio de los tejidos, ya que se obtiene de forma no invasiva secciones ópticas a una gran profundidad. Algunos ejemplos son: el estudio de tejidos con patologías, los órganos internos, las estructuras oculares, el tejido cerebral y las diferentes estructuras de la cavidad oral (Martínez-Ojeda et al., 2020).

Todos los estudios consultados indican que la señal multifotónica puede usarse para mostrar el estado de salud dental. Se ha demostrado que el cociente TPEF y SHG es un indicador fiable de la aparición de la caries. Otras aplicaciones importantes son el estudio de las infecciones endodónticas, la observación de anomalías que puede presentar el esmalte y la estimación de la edad, bien mediante el aumento de la densidad mineral del esmalte y la dentina con los años o a través de la degradación de colágeno con la edad (Martínez-Ojeda et al., 2020).

El esmalte, la dentina y los ligamentos periodontales, emiten señal multifotónica. El esmalte junto con los odontoblastos y ameloblastos emiten una fuerte señal TPEF, debido al esmalte prismático, mientras que el aprismático interior presenta una baja señal TPEF; el esmalte no emite señal SHG debido a que no existen proteínas no-centrosimétricas en

él. Mientras que la dentina (Figura 63) presenta también señal en TPEF (cuanto más mineralizada se encuentre, más fuerte es la señal) y en SHG, la dentina que se encuentra menos mineralizada (la circumpulpar) emite solamente esta señal, siendo esta más débil (aumenta conforme nos adentramos en ella) en comparación con la de TPEF (Figura 61). La señal TPEF de la dentina está posiblemente relacionada con el proceso odontoblástico que envuelve las proteínas fluorescentes; por otro lado, la señal SHG de la dentina es más débil ya que existe una baja cantidad de moléculas altamente no-centrosimétricas, como son el colágeno o los microtúbulos. Debido a la composición básicamente formada por el colágeno de los ligamentos periodontales nos permite su observación en SHG, al igual que la predentina y el cemento dental (Martínez-Ojeda et al., 2020).

Gracias a las diferencias en las respuestas de los dos tipos de microscopía multifotónica, la superposición de imágenes TPEF+SHG nos permite la visualización precisa de la unión esmalte-dentina, como podemos también observar en otros estudios como el de Cloitre et al. (2012) y Chen et al. (2007). Como observamos en la Figura 62, la zona de transición es una línea oscura (de no fluorescencia) que indica una baja concentración de proteínas en la unión esmalte-dentina (Cloitre et al., 2012) y una reducción de la mineralización a lo largo de la unión (Chen et al., 2007). Las fibrillas de colágeno en la unión están orientadas paralelamente unas a otras y perpendicularmente al plano de unión

Además, la combinación de ambas señales en el área de la dentina muestra una variación con la edad. En nuestro estudio analizamos 11 dientes, de sujetos con una edad comprendida entre los 19 y los 82 años, mediante las técnicas de microscopía multifotónica; Fluorescencia por excitación de dos fotones (TPEF) y la Generación de segundo armónico (SHG). Obtuvimos diferencias de un 41,9 % en la ratio TPEF/SHG cuando se compararon los dientes de los sujetos más mayores (n = 5) respecto al grupo de menores de 30 años (n = 3), al igual que con el grupo de mediana edad (n = 3) y el grupo más joven. Se obtiene por tanto, un incremento en la ratio TPEF/SHG, lo que indica que la concentración de colágeno presente en la dentina se va reduciendo al aumentar la edad.

En nuestro estudio comprobamos si la imagen obtenida de toda la superficie global del diente era representativa o bien si era necesario hacer una media de las imágenes obtenidas de diferentes áreas del diente. En la representación gráfica de la ratio TPEF/SHG global y local obtuvimos un buen ajuste de la recta y un coeficiente de correlación $r = 0,996$ ($p = 0,000$), por lo que es suficiente la obtención de imágenes generales para el análisis.

Tanto la cuantificación como la clasificación de la disposición o grado de organización del colágeno se encuentra asociada a diferentes patologías vinculadas a alteraciones en el colágeno, por lo que el SHG está emergiendo como una herramienta

poderosa en biomedicina y diagnóstico médico temprano no invasivo. Estos cambios en el colágeno se producen en las primeras etapas de la enfermedad, a escala molecular, antes que la estructura se vea afectada a nivel micrométrico (Bueno et al., 2016). También el colágeno resulta afectado por la edad o por procesos traumáticos, por lo que con su estudio podemos obtener información sobre el estado de salud de los tejidos. Con la edad las fibras de colágeno tipo I, organizadas, tienden a ser sustituidas por el colágeno tipo III, desorganizadas (Ávila, 2016).

Las señales de la microscopía multifotónica son muy valiosas para la determinación de los procesos cancerosos como puede ser en la mucosa, basados en los cambios que se producen en la matriz colágena, como la pérdida de organización o la reducción del número y longitud de fibras colágenas. La intensidad de la señal TPEF aumenta en tejido precanceroso y la señal SHG disminuye, por lo que también se encuentra el cociente TPEF/SHG como una herramienta muy útil de diagnóstico. Los cromóforos endógenos proporcionan información sobre el estado metabólico del tejido durante el proceso de varias patologías, como el cáncer (Martínez-Ojeda et al., 2020).

En nuestra investigación observamos un incremento estadísticamente significativo entre los valores de Índice de Edad (SAAID) de los sujetos más jóvenes comparado con el grupo de mediana edad, con un aumento del 40%. También comprobamos diferencias estadísticamente significativas entre los sujetos menores de 30 años y los pertenecientes al grupo de mayor edad, con un aumento del 50% en el valor de este parámetro. Entre el grupo de 30-50 años y los de mayor edad no hallamos diferencias estadísticamente significativas. En este sentido, el estudio de Lin et al. (2005) concluye que para la evaluación del envejecimiento cutáneo, la MPM es una herramienta útil y el SAAID es un buen indicador, coincidiendo con los resultados obtenidos en nuestra investigación para la estimación de la edad en los dientes.

Respecto al valor de SAAID, en la investigación desarrollada por Lin et al. (2005), demostraron que es un buen indicador para cuantificar el fotoenvejecimiento de la piel. En su estudio concluyeron que al aumentar la edad disminuye el SAAID; los valores más próximos a -1 reflejan que el colágeno es completamente reemplazado por las fibras elásticas al aumentar la edad. Estos resultados se asemejan a los obtenidos en nuestro estudio, ya que Lin et al. (2005) no utilizaron valores absolutos.

El estudio desarrollado por Tan et al. (2007), demostró la utilidad de las señales TPEF y SHG para la identificación temprana de los patógenos causantes de las infecciones corneales, demostrando el valor de esta técnica de imágenes para el diagnóstico clínico. Observó que la ratio SAAID puede ser usada para caracterizar la extensión de la córnea dañada, el valor absoluto de SAAID crece al aumentar la infección, indicando la destrucción

del colágeno del estroma durante los procesos infecciosos, disminuyendo o desorganizándose por tanto, la señal SHG. Aunque en este estudio no se pudo demostrar los efectos de la edad con la infección de la córnea, Kernacki et al. (2000) sí demostraron que el envejecimiento afecta a los procesos infecciosos, ya que la respuesta inmunológica disminuye.

En nuestro estudio, respecto al tamaño de los túbulos de la dentina (Figura 69) observamos que estos se incrementan, al aumentar la edad, debido a que el componente mineral va aumentando y el colágeno se va reduciendo con el paso de los años, como hemos dicho anteriormente. Entre el sujeto de 19 años y el de mayor edad (82 años), hay un incremento del 64,6 % del tamaño de los túbulos dentinarios, ya que con el envejecimiento se produce una disminución del diámetro de los túbulos de la dentina debido al aumento del espesor de la dentina peritubular, lo que conlleva a una disminución de la permeabilidad, tal y como indican Llamas Cadaval et al. (1997). También podemos observar en la Figura 69 que los túbulos dentinarios se hacen más ondulados, menos regulares y cambian de dirección con el avance de la edad (Portales Médicos, 2020) y tal y como indican Burke y Samarawickrama (1995) el número de túbulos presentes decrece con la edad.

En la Figura 71 podemos observar una imagen tridimensional de la dentina que realizamos con la generación de segundo armónico en uno de los dientes de nuestro estudio. También Elbaum et al. (2007), determinaron gracias a la imagen en tres dimensiones, que las fibras de colágeno se organizan perpendicularmente a los túbulos, sin embargo, cerca de la unión dentina-esmalte se extienden a lo largo del eje longitudinal de los túbulos. La disposición del colágeno influye en la propiedad mecánica de la dentina, y por lo tanto, en la resistencia a su fractura.

6. CONCLUSIONES

1. La dentina es la parte del diente más idónea para determinar la acumulación de elementos traza a largo plazo. Las concentraciones obtenidas permiten la posibilidad de establecer valores de referencia de concentraciones de elementos traza en dentina de población española sana.
2. El sodio, potasio, bario, níquel y cobalto son los elementos esenciales que presentan variabilidad en función del sexo, sodio y cobalto fueron más elevados en mujeres. El plomo fue el único elemento tóxico significativamente superior en varones.
3. Molares y premolares son indistintamente dientes válidos para la determinación de la edad mediante el análisis de los elementos traza en la dentina.
4. Del total de 25 elementos analizados, diez se correlacionaron significativamente con la edad, de los cuales tres son tóxicos (Pb, Sn y Li) o potencialmente tóxicos y siete esenciales (Sr, Mg, S, K, Zn, Ba, B). Sus concentraciones medias fueron significativamente superiores al aumentar el rango de edad, con excepción del B y el Zn.
5. Los elementos tóxicos plomo, litio y estaño se correlacionan de forma significativa y positiva entre sí y con los elementos esenciales que aumentan significativamente con la edad (Sr, Mg, S, K, Zn, Ba, B).
6. El Análisis de Componentes Principales confirma la diversidad de elementos traza que componen la dentina, la estabilidad elemental de su estructura y a su vez la dinámica en su composición en función de la edad.
7. El plomo es el elemento que mejor explica la edad en función de sus concentraciones en la dentina mediante un modelo de regresión logarítmica.
8. Con microscopía multifotónica las diferentes respuestas de las señales TPEF y SHG permiten identificar las distintas partes de los dientes. La zona de la dentina combina señales TPEF y SHG, mientras que el esmalte emite únicamente señal TPEF.

9. No hay diferencias significativas entre la ratio de las señales TPEF/SHG de áreas locales y global de la dentina, existiendo una correlación entre ambas cercana a 1. Por lo tanto, no es necesario realizar un análisis con microscopía multifotónica local, siendo suficiente un análisis global.

10. La ratio de la intensidad de las señales multifotónicas (TPEF/SHG) y el Índice de edad (SAID) aumentan de manera progresiva y significativa en dientes desde los 18 años hasta la década de los 50 años, debido a la pérdida de colágeno en la dentina, manteniéndose más estables a partir de esta edad. Ambos parámetros se confirman como buenos indicadores de la estimación de la edad en los dientes.

11. El análisis mediante la señal SHG muestra un aumento del espesor de los túbulos dentinarios en función de la edad, probablemente debido al depósito progresivo de componente mineral y a la reducción de colágeno. Entre el sujeto de menor y mayor edad hay un incremento del 65% del tamaño de los túbulos dentinarios.

12. El análisis de los elementos traza y la microscopía multifotónica en la dentina humana son herramientas complementarias eficaces para la estimación de la edad, siendo de especial trascendencia en diferentes circunstancias en el ámbito médico-forense.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Åberg, G., Fosse, G., & Stray, H. (1998). Man, nutrition and mobility: a comparison of teeth and bone from the Medieval era and the present from Pb and Sr isotopes. *Science of the total environment*, 224(1-3), 109-119. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(98\)00347-7](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(98)00347-7)
2. Adriano-Anaya, M. D. P., Caudillo-Joya, T., & Caudillo-Adriano, P. A. (2015). Edad de la erupción permanente en una población infantil de la Ciudad de México. *International journal of odontostomatology*, 9(2), 255-262. <http://doi.org/10.4067/S0718-381X2015000200012>
3. Adserias-Garriga, J. (2019). Evolution of methods and state-of-the-art in dental age estimation. In J. Adserias-Garriga (Ed.), *Age Estimation* (pp. 77-87). Academic Press.
4. Agarwal, A., Coleno, M. L., Wallace, V. P., Wu, W. Y., Sun, C. H., Tromberg, B. J., & George, S. C. (2001). Two-photon laser scanning microscopy of epithelial cell-modulated collagen density in engineered human lung tissue. *Tissue engineering*, 7(2), 191-202. <http://doi.org/10.1089/107632701300062813>
5. Al-Fartusie, F. S., & Mohssan, S. N. (2017). Essential trace elements and their vital roles in human body. *Indian Journal of Advances in Chemical Science*, 5(3), 127-136. <https://doi.org/10.22607/IJACS.2017.503003>
6. Al-Qattan, S. I., & Elfawal, M. A. (2010). Significance of teeth lead accumulation in age estimation. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 17(6), 325-328. <http://doi.org/10.1016/j.jflfm.2010.05.001>
7. Alblas, B. P., Van der Lugt, W., Dijkstra, J., & Van Dijk, C. (1984). Structure of liquid Li-Sn alloys. *Journal of Physics F: Metal Physics*, 14(9), 1995-2006.
8. Alomary, A., Al-Momani, I. F., & Massadeh, A. M. (2006). Lead and cadmium in human teeth from Jordan by atomic absorption spectrometry: Some factors influencing their concentrations. *Science of the total environment*, 369(1-3), 69-75. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.04.023>

9. Ambarkova, V., Galić, I., Vodanović, M., Biočina-Lukenda, D., & Brkić, H. (2014). Dental age estimation using Demirjian and Willems methods: cross sectional study on children from the Former Yugoslav Republic of Macedonia. *Forensic science international*, 234, 187-e1. <http://doi.org/10.1016/j.forsciint.2013.10.024>
10. Amr, M. A., & Helal, A. F. I. (2010). Analysis of trace elements in teeth by ICP-MS: implications for caries. *Journal of Physical Science*, 21(2), 1-12.
11. Antoine, J. M., Fung, L. A. H., Grant, C. N., Dennis, H. T., & Lalor, G. C. (2012). Dietary intake of minerals and trace elements in rice on the Jamaican market. *Journal of Food Composition and Analysis*, 26(1-2), 111-121. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2012.01.003>
12. Anusionwu, B. C., Adebayo, G. A., & Orji, C. E. (2005). Influence of strong heterocoordination on surface properties of Li–Pb melts. *Physics and Chemistry of Liquids*, 43(6), 495-506.
13. Aral, H., & Vecchio-Sadus, A. (2008). Toxicity of lithium to humans and the environment—a literature review. *Ecotoxicology and environmental safety*, 70(3), 349-356. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.02.026>
14. Araújo, T. M. D., & Caldas, L. D. (2019). Tooth extractions in Orthodontics: first or second premolars?. *Dental press journal of orthodontics*, 24(3), 88-98. <https://doi.org/10.1590/2177-6709.24.3.088-098>
15. Arora, M., Hare, D., Austin, C., Smith, D. R., & Doble, P. (2011). Spatial distribution of manganese in enamel and coronal dentine of human primary teeth. *Science of the Total Environment*, 409(7), 1315-1319. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.12.018>
16. Arto, D., Goldstein H. & Tanner J.M. (1973). A new system of dental age assessment. *Human biology*, 211-227.
17. Asaduzzaman, K., Khandaker, M. U., Baharudin, N. A. B., Amin, Y. B. M., Farook, M. S., Bradley, D. A., & Mahmoud, O. (2017). Heavy metals in human teeth dentine: A bio-

-
- indicator of metals exposure and environmental pollution. *Chemosphere*, 176, 221-230. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.02.114>
18. Ávila, F. J. (2016). *Polarización y microscopía multifotónica para el análisis de estructuras oculares*. Proyecto de investigación. <http://hdl.handle.net/10201/47879>
19. Baccino, E., & Schmitt, A. (2006) Determination of Adult Age at Death in the Forensic Context. In: A. Schmitt, E. Cunha, & J. Pinheiro (Eds), *Forensic Anthropology and Medicine* (pp. 259-280). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-099-7_11
20. Baccino, E., & Zerilli, A. (1997, February). The two step strategy (TSS) or the right way to combine a dental (Lamendin) and an anthropological (Suchey–Brooks system) method for age determination. In *Proceedings of American Academy of Forensic Sciences* (Vol. 150).
21. Bakirdere, S., Orenay, S., & Korkmaz, M. (2010). Effect of boron on human health. *The Open Mineral Processing Journal*, 3(1). <https://doi.org/10.2174/1874841401003010054>
22. Bang, G., & Ramm, E. (1970). Determination of age in humans from root dentin transparency. *Acta Odontologica Scandinavica*, 28(1), 3-35.
23. Bercovitz, K., & Laufer, D. (1990). Tooth type as indicator of exposure to lead of adults and children. *Archives of oral biology*, 35(11), 895-897. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(90\)90069-M](https://doi.org/10.1016/0003-9969(90)90069-M)
24. Bercovitz, K., & Laufer, D. (1991). Age and gender influence on lead accumulation in root dentine of human permanent teeth. *Archives of oral biology*, 36(9), 671-673. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(91\)90020-U](https://doi.org/10.1016/0003-9969(91)90020-U)
25. Bloembergen, N., & Pershan, P. S. (1962). Light waves at the boundary of nonlinear media. *Physical review*, 128(2), 606. <http://doi.org/10.1103/PhysRev.128.606>

26. Blunden, S., & Wallace, T. (2003). Tin in canned food: a review and understanding of occurrence and effect. *Food and Chemical Toxicology*, 41(12), 1651-1662. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(03\)00217-5](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(03)00217-5)
27. Brooks, S. T. (1955). Skeletal age at death: the reliability of cranial and pubic age indicators. *American journal of physical anthropology*, 13(4), 567-597. <https://doi.org/10.1002/ajpa.1330130403>
28. Brooks, S., & Suchey, J. M. (1990). Skeletal age determination based on the os pubis: a comparison of the Acsádi-Nemeskéri and Suchey-Brooks methods. *Human evolution*, 5(3), 227-238. <https://doi.org/10.1007/BF02437238>
29. Brown, C. J., Chenery, S. R., Smith, B., Mason, C., Tomkins, A., Roberts, G. J., Sserunjogi, L., & Tiberindwa, J. V. (2004). Environmental influences on the trace element content of teeth—implications for disease and nutritional status. *Archives of Oral Biology*, 49(9), 705-717. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2004.04.008>
30. Brown, C. J., Chenery, S. R., Smith, B., Tomkins, A., Roberts, G. J., Sserunjogi, L., & Thompson, M. (2002). A sampling and analytical methodology for dental trace element analysis. *Analyst*, 127(2), 319-323. <https://doi.org/10.1039/B109066F>
31. Bu-Olayan, A. H., & Thomas, B. V. (1999). Dental lead levels in residents from industrial and suburban areas of Kuwait. *Science of the total environment*, 226(2-3), 133-137.
32. Bueno, J. M., Ávila, F. J., & Artal, P. (2016). Second harmonic generation microscopy: a tool for quantitative analysis of tissues. *Microscopy and Analysis*, 99-119. <http://doi.org/10.5772/63493>
33. Bueno, J. M., Gualda, E. J., & Artal, P. (2010). Adaptive optics multiphoton microscopy to study ex vivo ocular tissues. *Journal of Biomedical Optics*, 15(6), 066004. <http://doi.org/10.1117/1.3505018>.

34. Bueno, J.M., Martínez-Ojeda, R.M., Ávila, F.J., Fernández-Escudero, A.C., López-Nicolás, M., & Pérez-Cárceles, M.D. (2019). Multiphoton imaging microscopy of dental pieces as a tool in forensic sciences. In: *Program and Abstract Book Focus on Microscopy 2019* (p. 266). London (2019). p. 266.
35. Burke, F. M., & Samarawickrama, D. Y. D. (1995). Progressive changes in the pulp-dentinal complex and their clinical consequences. *Gerodontology*, 12(2), 57-66.
36. Calvo, M.S., & Lamberg-Allardt, C.J. (2015). Phosphorus. *Advances in Nutrition*, 6(6), 860–862, <https://doi.org/10.3945/an.115.008516>
37. Campagnola, P. J., Lewis, A., & Loew, L. M. (1999). High-resolution nonlinear optical imaging of live cells by second harmonic generation. *Biophysical journal*, 77(6), 3341-3349. [http://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77165-1](http://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77165-1)
38. Campagnola, P. J., & Loew, L. M. (2003). Second-harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms. *Nature biotechnology*, 21(11), 1356-1360. <http://doi.org/10.1038/nbt894>
39. Campagnola, P. J., Millard, A. C., Terasaki, M., Hoppe, P. E., Malone, C. J., & Mohler, W. A. (2002). Three-dimensional high-resolution second-harmonic generation imaging of endogenous structural proteins in biological tissues. *Biophysical journal*, 82(1), 493-508. [http://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)75414-3](http://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75414-3)
40. Capitaneanu, C., Willems, G., Jacobs, R., Fieuws, S., & Thevissen, P. (2017). Sex estimation based on tooth measurements using panoramic radiographs. *International journal of legal medicine*, 131(3), 813-821. <https://doi.org/10.1007/s00414-016-1434-0>
41. Carlson, S. J. (1990). Vertebrate dental structures. *Skeletal biomineralization: patterns, processes and evolutionary trends*, 1, 531-556. http://doi.org/10.1007/978-1-4899-5740-5_21

42. Carvalho, T. S., & Lussi, A. (2017). Age-related morphological, histological and functional changes in teeth. *Journal of oral rehabilitation*, 44(4), 291-298. <http://doi.org/10.1111/joor.12474>
43. Chen, M. H., Chen, W. L., Sun, Y., Fwu, P. T., & Dong, C. Y. (2007). Multiphoton autofluorescence and second-harmonic generation imaging of the tooth. *Journal of biomedical optics*, 12(6), 064018. <http://doi.org/10.1117/1.2812710>
44. Chiego, D. J. (2014). *Principios de histología y embriología bucal: con orientación clínica*. Elsevier
45. Cloitre, T., Panayotov, I. V., Tassery, H., Gergely, C., Levallois, B., & Cuisinier, F. J. (2013). Multiphoton imaging of the dentine-enamel junction. *Journal of biophotonics*, 6(4), 330-337. <http://doi.org/10.1002/jbio.201200065>
46. Cornell Engineering (junio de 2020). Cornell Engineering, Applied and Engineering Physics. <https://www.aep.cornell.edu/drbio/MPE/mpe.html> (Último acceso: junio de 2020).
47. Cox, G., Kable, E., Jones, A., Fraser, I., Manconi, F., & Gorrell, M. D. (2002). 3-dimensional imaging of collagen using second harmonic generation. *Journal of structural biology*, 141(1), 53-62. [http://doi.org/10.1016/s1047-8477\(02\)00576-2](http://doi.org/10.1016/s1047-8477(02)00576-2)
48. Cugati, N., Kumaresan, R., Srinivasan, B., & Karthikeyan, P. (2015). Dental age estimation of growing children by measurement of open apices: A Malaysian formula. *Journal of forensic dental sciences*, 7(3), 227. <https://dx.doi.org/10.4103/0975-1475.172445>
49. Cunha, E., Baccino, E., Martrille, L., Ramsthaler, F., Prieto, J., Schuliar, Y., Lynnerup, N., & Cattaneo, C. (2009). The problem of aging human remains and living individuals: a review. *Forensic science international*, 193(1-3), 1-13. <http://doi.org/10.1016/j.forsciint.2009.09.008>

-
50. Dallemagne, M. J. (1964). Apatites Phosphates Calciques de Synthese, Sels Osseux et Dentaires. In O. Eichler & A. Farah (Eds.), *Handbuch der Experimentellen Pharmakologie*, Vol. 2, (pp. 273-345). Berlin, Springer.
51. De Boer, H. H., Maat, G. J., Kadarmo, D. A., Widodo, P. T., Kloosterman, A. D., & Kal, A. J. (2018). DNA identification of human remains in Disaster Victim Identification (DVI): An efficient sampling method for muscle, bone, bone marrow and teeth. *Forensic science international*, 289, 253-259. <http://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.05.044>
52. De Ferraris, M. E. G., & Muñoz, A. C. (2009). *Histología, embriología e ingeniería tisular bucodental/Histology, embryology and oral tissue engineering*. Ed. Médica Panamericana.
53. Demirjian, A., Goldstein, H., & Tanner, J. M. (1973). A new system of dental age assessment. *Human biology*, 211-227. <https://doi.org/10.2307/41459864>
54. Denk, W., Strickler, J. H., & Webb, W. W. (1990). Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 248(4951), 73-76. <http://doi.org/10.1126/science.2321027>
55. Derise, N. L., & Ritchey, S. J. (1974). Mineral composition of normal human enamel and dentin and the relation of composition to dental caries: II. Microminerals. *Journal of dental research*, 53(4), 853-858. <http://doi.org/10.1177/00220345740530041601>
56. Derise, N. L., Ritchey, S. J., & Furr, A. K. (1974). Mineral composition of normal human enamel and dentin and the relation of composition to dental caries: I. Macrominerals and comparison of methods of analyses. *Journal of Dental Research*, 53(4), 847-852. <http://doi.org/10.1177/00220345740530041501>
57. Djouina, M., Esquerre, N., Desreumaux, P., Vignal, C., & Body-Malapel, M. (2016). Toxicological consequences of experimental exposure to aluminum in human intestinal epithelial cells. *Food and Chemical Toxicology*, 91, 108-116. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.03.008>

58. Dreal, W. F. (1936). Spectrum analysis of dental tissues for trace elements. *Journal of Dental Research*, 15, 403-406. doi:10.1177/00220345350150060401
59. Edition, F. (2011). Guidelines for drinking-water quality. *WHO chronicle*, 38(4), 104-8.
60. El Solh, N., & Rousselet, F. (1981). Effects of stable strontium administration on calcium metabolism with particular reference to low-calcium diet. In S. Skoryna (Ed.), *Handbook of stable strontium* (pp. 515-544). Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-3698-3_31
61. Elbaum, R., Tal, E., Perets, A. I., Oron, D., Ziskind, D., Silberberg, Y., & Wagner, H. D. (2007). Dentin micro-architecture using harmonic generation microscopy. *Journal of dentistry*, 35(2), 150-155. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2006.07.007>
62. Elshehawi, W., Alsaffar, H., Roberts, G., Lucas, V., McDonald, F., & Camilleri, S. (2016). Dental age assessment of Maltese children and adolescents. Development of a reference dataset and comparison with a United Kingdom Caucasian reference dataset. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 39, 27-33. <http://doi.org/10.1016/j.jflm.2016.01.003>
63. Enomoto, A., Tanaka, T., Kawagishi, S., Nakashima, H., Watanabe, K., & Maki, K. (2012). Amounts of Sr and Ca eluted from deciduous enamel to artificial saliva related to dental caries. *Biological trace element research*, 148(2), 170-177.
64. Exley, C. (2016). The toxicity of aluminium in humans. *Morphologie*, 100(329), 51-55. <https://doi.org/10.1016/j.morpho.2015.12.003>
65. Favier, A. (1996). Relevance of trace element supplements in women of different ages. In J. Nève, P. Chappuis & M. Lamand (Eds.), *Therapeutic Uses of Trace Elements* (pp. 83-91). Springer, Boston, MA.
66. Fazekas, I. G., & Kósa, F. (1978). *Forensic fetal osteology*. Akadémiai Kiadó.

-
67. Federación Dental Internacional. (2015). *El Desafío de las Enfermedades Bucodentales - Una llamada a la acción global. Atlas de Salud Bucodental*. 2ª ed. Ginebra. https://www.fdiworlddental.org/sites/default/files/media/documents/book_spreads_oh2_spanish.pdf (Último acceso: junio de 2020).
68. Fine, S., & Hansen, W. P. (1971). Optical second harmonic generation in biological systems. *Applied optics*, 10(10), 2350-2353. <http://doi.org/10.1364/AO.10.002350>
69. Fischer, A., & Wiechuła, D. (2016). Age-dependent changes in Pb concentration in human teeth. *Biological trace element research*, 173(1), 47-54. <https://doi.org/10.1007/s12011-016-0643-1>
70. Fischer, A., Wiechuła, D., Postek-Stefańska, L., & Kwapuliński, J. (2009). Concentrations of metals in maxilla and mandible deciduous and permanent human teeth. *Biological trace element research*, 132(1-3), 19-26. <https://doi.org/10.1007/s12011-009-8383-0>
71. Fischer, A., Wiechuła, D., & Przybyła-Misztela, C. (2013). Changes of concentrations of elements in deciduous teeth with age. *Biological trace element research*, 154(3), 427-432. <https://doi.org/10.1007/s12011-013-9744-2>
72. Fleury, C., Petit, A., Mwale, F., Antoniou, J., Zukor, D. J., Tabrizian, M., & Huk, O. L. (2006). Effect of cobalt and chromium ions on human MG-63 osteoblasts in vitro: morphology, cytotoxicity, and oxidative stress. *Biomaterials*, 27(18), 3351-3360. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.035>
73. Frank, R. M., Sargentini-Maier, M. L., Turlot, J. C., & Leroy, M. J. F. (1990). Comparison of lead levels in human permanent teeth from Strasbourg, Mexico City, and rural zones of Alsace. *Journal of dental research*, 69(1), 90-93. <http://doi.org/10.1177/00220345900690011601>
74. Freund, I., Deutsch, M., & Sprecher, A. (1986). Connective tissue polarity. Optical second-harmonic microscopy, crossed-beam summation, and small-angle scattering in rat-tail tendon. *Biophysical journal*, 50(4), 693-712. [http://doi.org/10.1016/S0006-3495\(86\)83510](http://doi.org/10.1016/S0006-3495(86)83510)

75. Gannaway, J. N., & Sheppard, C. J. R. (1978). Second-harmonic imaging in the scanning optical microscope. *Optical and Quantum Electronics*, 10(5), 435-439. <http://doi.org/10.1007/BF00620308>
76. Gauderon, R., Lukins, P. B., & Sheppard, C. J. R. (1998). Three-dimensional second-harmonic generation imaging with femtosecond laser pulses. *Optics letters*, 23(15), 1209-1211. <http://doi.org/10.1364/OL.23.001209>
77. Georgiou, E., Theodossiou, T., Hovhannisyanyan, V., Politopoulos, K., Rapti, G. S., & Yova, D. (2000). Second and third optical harmonic generation in type I collagen, by nanosecond laser irradiation, over a broad spectral region. *Optics Communications*, 176(1-3), 253-260. [http://doi.org/10.1016/S0030-4018\(00\)00504-6](http://doi.org/10.1016/S0030-4018(00)00504-6)
78. Ghadimi, E., Eimar, H., Marelli, B., Nazhat, S. N., Asgharian, M., Vali, H., & Tamimi, F. (2013). Trace elements can influence the physical properties of tooth enamel. *SpringerPlus*, 2(1), 499. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-499>
79. Girkin, J. M., Hall, A. F., & Creanor, S. L. (1999). Multi-photon imaging of intact dental tissue. In G. K. Stookey (Ed.), *Proceedings of the 4th Annual Indiana Conference* (pp. 155-168). Indiana University School of Dentistry, Indianapolis, Indiana. <http://doi.org/10.1016/j.jfma.2012.03.016>
80. Girkin, J. M., Hall, A. F., & Creanor, S. L. (2000). Two-photon imaging of intact dental tissue. *Dental Caries*, 2, 317-325. <http://doi.org/10.1364/oe.16.006274>
81. Glastre, W., Jacquin, O., Hugon, O., De Chatellus, H. G., & Lacot, E. (2012). Synthetic aperture laser optical feedback imaging using a translational scanning with galvanometric mirrors. *Journal of the Optical Society of America A*, 29(8), 1639-1647. <https://doi.org/10.1364/JOSAA.29.001639>
82. Godinho, R. M., Oliveira-Santos, I., Maurício, A., Valera, A., & Gonçalves, D. (2019). Is enamel the only reliable hard tissue for sex metric estimation of burned skeletal remains in biological anthropology? *Journal of Archaeological Science: Reports*, 26, 101876. <http://doi.org/10.1016/J.JASREP.2019.101876>

-
83. Göppert-Mayer, M. (2009). Elementary processes with two quantum transitions. *Annalen der Physik*, 18(7-8), 466-479. <http://doi.org/10.1002/andp.200910358>
84. Greulich, W. W., & Pyle, S. I. (1959). *Radiographic atlas of skeletal development of the hand and wrist*. Stanford university press.
85. Gupta, S., Agnihotri, A., Chandra, A., & Gupta, O. P. (2014). Contemporary practice in forensic odontology. *Journal of oral and maxillofacial pathology: JOMFP*, 18(2), 244. <http://doi.org/10.4103/0973-029X.140767>
86. Gustafson, G. (1950). Age determinations on teeth. *The Journal of the American Dental Association*, 41(1), 45-54.
87. Gutowska, I., Baranowska-Bosiacka, I., Rybicka, M., Noceń, I., Dudzińska, W., Marchlewicz, M., Wiszniewska, B., & Chlubek, D. (2011). Changes in the concentration of microelements in the teeth of rats in the final stage of type 1 diabetes, with an absolute lack of insulin. *Biological trace element research*, 139(3), 332-340. <http://doi.org/10.1007/s12011-010-8666-5>
88. He, M., Lu, H., Luo, C., & Ren, T. (2016). Determining trace metal elements in the tooth enamel from Hui and Han Ethnic groups in China using microwave digestion and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). *Microchemical Journal*, 127, 142-144. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.02.009>
89. Heaney, R. P. (2006). Absorbability and utility of calcium in mineral waters—. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 84(2), 371-374. <https://doi.org/10.1093/ajcn/84.2.371>
90. Helfman, P. M., & Bada, J. L. (1975). Aspartic acid racemization in tooth enamel from living humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72(8), 2891-2894.
91. Helmchen, F., & Denk, W. (2005). Deep tissue two-photon microscopy. *Nature methods*, 2(12), 932-940. <http://doi.org/10.1038/nmeth818>

92. Herráez, A. (2018). Biomodel 1. Estructura cuaternaria: Colágeno. <http://biomodel.uah.es/model1j/prot/colageno-cuat.htm> (Último acceso: junio de 2020).
93. Imaizumi, K. (2015). Forensic investigation of burnt human remains. *Research and Reports in Forensic Medical Science*, 5, 67. <https://doi.org/10.2147/RRFMS.S75141>
94. Işcan, M. Y., Loth, S. R., & Wright, R. K. (1984). Age estimation from the rib by phase analysis: white males. *Journal of Forensic Science*, 29(4), 1094-1104. <https://doi.org/10.1520/JFS11776J>.
95. Işcan, M. Y., Loth, S. R., & Wright, R. K. (1985). Age estimation from the rib by phase analysis: white females. *Journal of Forensic Science*, 30(3), 853-863. <https://doi.org/10.1520/JFS11018J>
96. Işcan, M. Y., Loth, S. R., & Wright, R. K. (1987). Racial variation in the sternal extremity of the rib and its effect on age determination. *Journal of Forensic Science*, 32(2), 452-466 <https://doi.org/10.1520/JFS11147J>
97. Johanson, G. (1971). *Age Determinations from Human Teeth: A Critical Evaluation with Special Consideration of Changes After Fourteen Years of Age*. Akademisk Avhandling (Doctoral dissertation, Berlingska Boktryckeriet).
98. Kabata-Pendias, A., & Mukherjee, A. B. (2007). Human. In: Kabata-Pendias & Mukherjee, *Trace elements from soil to human* (pp. 67-83). Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-32714-1_7
99. Kaiser, W., & Garrett, C. G. B. (1961). Two-photon excitation in Ca F 2: Eu 2+. *Physical review letters*, 7(6), 229. <http://doi.org/10.1103/PhysRevLett.7.229>
100. Kang, D., Amarasiriwardena, D., & Goodman, A. H. (2004). Application of laser ablation–inductively coupled plasma–mass spectrometry (LA–ICP–MS) to investigate trace metal spatial distributions in human tooth enamel and dentine growth layers and

-
- pulp. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378(6), 1608-1615.
<http://doi.org/10.1007/s00216-004-2504-6>
101. Kao, F. J. (2004). The use of optical parametric oscillator for harmonic generation and two-photon UV fluorescence microscopy. *Microscopy research and technique*, 63(3), 175-181. <http://doi.org/10.1002/jemt.20026>
102. Kao, F. J., Wang, Y. S., Huang, M. K., Huang, S. L., & Cheng, P. C. (2000, July). Second-harmonic generation microscopy of tooth. In *Optical Sensing, Imaging, and Manipulation for Biological and Biomedical Applications* (Vol. 4082, pp. 119-124). International Society for Optics and Photonics. <https://doi.org/10.1117/12.390534>
103. Kerley, E. R. (1965). The microscopic determination of age in human bone. *American journal of physical anthropology*, 23(2), 149-163.
<https://doi.org/10.1002/ajpa.1330230215>
104. Kern, J., & Mathiason, L. (2012). The determination of copper, zinc and lead in human teeth using inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES). *The Concordia College Journal of Analytical Chemistry*, 3, 33-39.
<http://doi.org/10.1016/j.forschiint.2011.11.012>
105. Kernacki, K. A., Barrett, R. P., McClellan, S. A., & Hazlett, L. D. (2000). Aging and PMN response to *P. aeruginosa* infection. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 41(10), 3019-3025.
106. Kim, B. M., Eichler, J., & Da Silva, L. B. (1999). Frequency doubling of ultrashort laser pulses in biological tissues. *Applied optics*, 38(34), 7145-7150.
<http://doi.org/10.1364/AO.38.007145>
107. Kim, B. M., Eichler, J., Reiser, K. M., Rubenchik, A. M., & Da Silva, L. B. (2000). Collagen structure and nonlinear susceptibility: effects of heat, glycation, and enzymatic cleavage on second harmonic signal intensity. *Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery*, 27(4), 329-335.

108. Kravchenko, J., Darrah, T. H., Miller, R. K., Lyerly, H. K., & Vengosh, A. (2014). A review of the health impacts of barium from natural and anthropogenic exposure. *Environmental geochemistry and health*, 36(4), 797-814. <https://doi.org/10.1007/s10653-014-9622-7>
109. Krishan, K., Kanchan, T., & Garg, A. K. (2015). Dental evidence in forensic identification—An overview, methodology and present status. *The open dentistry journal*, 9, 250. <http://doi.org/10.2174/1874210601509010250>
110. Kumagai, A., Fujita, Y., Endo, S., & Itai, K. (2012). Concentrations of trace element in human dentin by sex and age. *Forensic science international*, 219(1-3), 29-32. <http://doi.org/10.1016/j.forsciint.2011.11.012>
111. Kuru, R., Yilmaz, S., Balan, G., Tuzuner, B. A., Tasli, P. N., Akyuz, S., Ozturk, F.Y., Altuntas, Y., Yarat, A., & Sahin, F. (2019). Boron-rich diet may regulate blood lipid profile and prevent obesity: A non-drug and self-controlled clinical trial. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 54, 191-198. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2019.04.021>
112. Kvaal, S., & Solheim, T. (1994). A non-destructive dental method for age estimation. *The Journal of forensic odonto-stomatology*, 12(1), 6.
113. Lamendin, H., Baccino, E., Humbert, J. F., Tavernier, J. C., Nossintchouk, R. M., & Zerilli, A. (1992). A simple technique for age estimation in adult corpses: the two criteria dental method. *Journal of Forensic Science*, 37(5), 1373-1379. <https://doi.org/10.1520/JFS13327J>
114. Lane, D. W., & Peach, D. F. (1997). Some observations on the trace element concentrations in human dental enamel. *Biological trace element research*, 60(1-2), 1-11. <https://doi.org/10.1007/BF02783305>

-
115. Lei, K., Giubilato, E., Critto, A., Pan, H., & Lin, C. (2016). Contamination and human health risk of lead in soils around lead/zinc smelting areas in China. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(13), 13128-13136. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6473-z>
116. Leica (junio de 2020). Leica Microsystems, Area of Application, Ciencias Biológicas, Fluorescencia. <https://www.leica-microsystems.com/es/aplicaciones/ciencias-biologicas/fluorescencia/>_(Último acceso: junio de 2020).
117. Li, Z., He, M., Peng, B., & Jin, Z. (2013). Strontium concentrations and isotope ratios in enamel of healthy and carious teeth in southern Shaanxi, China. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 27(17), 1919-1924. <https://doi.org/10.1002/rcm.6646>
118. Lin, S. J., Wu, R. J., Tan, H. Y., Lo, W., Lin, W. C., Young, T. H., Hsu, C.J., Chen, J.S., Jee, S. H., & Dong, C. Y. (2005). Evaluating cutaneous photoaging by use of multiphoton fluorescence and second-harmonic generation microscopy. *Optics letters*, 30(17), 2275-2277. <http://doi.org/10.1364/ol.30.002275>
119. Lippert, F., & Hara, A. T. (2013). Strontium and caries: a long and complicated relationship. *Caries research*, 47(1), 34-49. <https://doi.org/10.1159/000343008>
120. Llamas Cadaval, R., Jiménez Planas, A., Jiménez Rubio-Manzanares, A., & Bonilla, R. (1997). Bases estructurales y respuestas biológicas del complejo dentino pulpar que condicionan la permeabilidad dentinaria. URL disponible en: <https://www.uv.es/pascuala/ejdr/Art00004.htm>
121. Loch, C., Swain, M. V., Fraser, S. J., Gordon, K. C., Kieser, J. A., & Fordyce, R. E. (2014). Elemental and chemical characterization of dolphin enamel and dentine using X-ray and Raman microanalyzes (Cetacea: Delphinoidea and Inioidea). *Journal of Structural Biology*, 185(1), 58-68. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2013.11.006>

122. Logan, W. H., & Kronfeld, R. (1933). Development of the human jaws and surrounding structures from birth to the age of fifteen years. *The Journal of the American Dental Association* (1922), 20(3), 379-428.
123. Lowater, F., & Murray, M. M. (1937). Chemical composition of teeth. V. Spectrographic analysis. *Biochemical Journal*, 31, 837-841. <https://doi.org/10.1042/bj0310837>
124. Mahurpawar, M. (2015). Effects of heavy metals on human health. *International Journal of Research-Granthaalayah*, 530, 1-7.
125. Maples, W. R. (1978). An improved technique using dental histology for estimation of adult age. *Journal of Forensic Science*, 23(4), 764-770. <https://doi.org/10.1520/JFS10735J>.
126. Marroquin, T. Y., Karkhanis, S., Kvaal, S. I., Vasudavan, S., Kruger, E., & Tennant, M. (2017). Age estimation in adults by dental imaging assessment systematic review. *Forensic science international*, 275, 203-211. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2017.03.007>
127. Marshall, W. A., & Tanner, J. M. (1969). Variations in pattern of pubertal changes in girls. *Archives of disease in childhood*, 44(235), 291-303. <http://doi.org/10.1136/adc.44.235.291>
128. Marshall, W. A., & Tanner, J. M. (1970). Variations in the pattern of pubertal changes in boys. *Archives of disease in childhood*, 45(239), 13-23. <http://doi.org/10.1136/adc.45.239.13>
129. Martin-de las Heras, S., Valenzuela, A., & Villanueva, E. (1999). Deoxypyridinoline crosslinks in human dentin and estimation of age. *International journal of legal medicine*, 112(4), 222-226. <https://doi.org/10.1007/s004140050240>

-
130. Martínez-Ojeda, R. M., Pérez-Cárceles, M. D., Ardelean, L. C., Stanciu, S. G., & Bueno, J. M. (2020). Multiphoton Microscopy of Oral Tissues. *Frontiers in Physics*, 8, 128. <https://doi.org/10.3389/fphy.2020.00128>
131. Masters, B. R. (2014). Fluorescence microscopy: from principles to biological applications. *Journal of Biomedical Optics*, 19(4), 049901. <http://doi.org/10.1117/1.JBO.19.4.049901>
132. Masters, B. R., & So, P. T. C. (2001). Confocal microscopy and multi-photon excitation microscopy of human skin in vivo. *Optics express*, 8(1), 2-10. <http://doi.org/10.1364/OE.8.000002>
133. Masters, B. R., So, P. T. C., & Gratton, E. (1998). Optical biopsy of in vivo human skin: multi-photon excitation microscopy. *Lasers in Medical Science*, 13(3), 196-203. <http://doi.org/10.1007/s101030050074>
134. McCaughey, S. A., & Scott, T. R. (1998). The taste of sodium. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 22(5), 663-676. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(97\)00067-5](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(97)00067-5)
135. McKnight, R. F., Adida, M., Budge, K., Stockton, S., Goodwin, G. M., & Geddes, J. R. (2012). Lithium toxicity profile: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet*, 379(9817), 721-728. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61516-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61516-X)
136. Mincer, H. H., Harris, E. F., & Berryman, H. E. (1993). The ABFO study of third molar development and its use as an estimator of chronological age. *Journal of Forensic Science*, 38(2), 379-390. <https://doi.org/10.1520/JFS13418J>
137. Moreaux, L., Sandre, O., & Mertz, J. (2000). Membrane imaging by second-harmonic generation microscopy. *JOSA B*, 17(10), 1685-1694. <http://doi.org/10.1364/JOSAB.17.001685>

138. Mudgal, V., Madaan, N., Mudgal, A., Singh, R. B., & Mishra, S. (2010). Effect of toxic metals on human health. *The Open Nutraceuticals Journal*, 3(1). <https://doi.org/10.2174/18763960010030100094>
139. Nanci, A. (2017). *Ten Cate's Oral Histology-e-book: development, structure, and function*. Elsevier Health Sciences.
140. Nedunchezian, K., Aswath, N., & Srinivasan, V. (2018). Age estimation using radicular dentine transparency: A new innovative approach. *Journal of forensic dental sciences*, 10(1), 22. http://doi.org/10.4103/jfo.jfds_71_16
141. Nelson, S. J. (2014). *Wheeler's Dental Anatomy, Physiology and Occlusion-E-Book*. Elsevier Health Sciences
142. Nganvongpanit, K., Buddhachat, K., Brown, J. L., Klinhom, S., Pitakarnnop, T., & Mahakkanukrauh, P. (2016). Preliminary study to test the feasibility of sex identification of human (*Homo sapiens*) bones based on differences in elemental profiles determined by handheld X-ray fluorescence. *Biological trace element research*, 173(1), 21-29. <https://doi.org/10.1007/s12011-016-0625-3>
143. Nordberg, M., & Nordberg, G. F. (2016). Trace element research-historical and future aspects. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 38, 46-52. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2016.04.006>
144. Nowak, B., & Chmielnicka, J. (2000). Relationship of lead and cadmium to essential elements in hair, teeth, and nails of environmentally exposed people. *Ecotoxicology and Environmental safety*, 46(3), 265-274. <https://doi.org/10.1006/eesa.2000.1921>
145. Nowak, B., & Kozłowski, H. (1998). Heavy metals in human hair and teeth. *Biological trace element research*, 62(3), 213. <https://doi.org/10.1007/BF02783972>
146. Nuzzolese, E., & Di Vella, G. (2012). Digital radiological research in forensic dental investigation: case studies. *Minerva Stomatologica*, 61(4), 165-73.

147. Olze, A., Hertel, J., Schulz, R., Wierer, T., & Schmeling, A. (2012). Radiographic evaluation of Gustafson's criteria for the purpose of forensic age diagnostics. *International journal of legal medicine*, 126(4), 615-621. <https://doi.org/10.1007/s00414-012-0701-y>
148. Palmer, B. F., & Clegg, D. J. (2016). Physiology and pathophysiology of potassium homeostasis. *Advances in physiology education*, 40(4), 480-490. <https://doi.org/10.1152/advan.00121.2016>
149. Pilmane, M., Salma-Ancane, K., Loca, D., Locs, J., & Berzina-Cimdina, L. (2017). Strontium and strontium ranelate: Historical review of some of their functions. *Materials Science and Engineering: C*, 78, 1222-1230. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.042>
150. Pinchi, V., Pradella, F., Buti, J., Baldinotti, C., Focardi, M., & Norelli, G. A. (2015). A new age estimation procedure based on the 3D CBCT study of the pulp cavity and hard tissues of the teeth for forensic purposes: A pilot study. *Journal of forensic and legal medicine*, 36, 150-157. <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2015.09.015>
151. Portales Médicos (junio de 2020). Portales Médicos, Envejecimiento y cambios en los tejidos dentarios 3. <https://www.portalesmedicos.com/publicaciones/articulos/500/3/Envejecimiento-y-cambios-en-los-tejidos-dentarios> (Último acceso junio de 2020).
152. Prabhu, R. V., Satoskar, S., Dinkar, A. D., & Prabhu, V. D. (2013). Dental age estimation among female commercial sex workers in Goa. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 20(6), 788-791. <http://doi.org/10.1016/j.jflm.2013.06.004>
153. Prasad, A. S. & Brewer, G. J. (2020). *Essential and Toxic Trace Elements and Vitamins in Human Health*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/C2015-0-02469-8>
154. Prasad, R., & Shivay, Y. S. (2018). Sulphur in soil, plant and human nutrition. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 88(2), 429-434. <https://doi.org/10.1007/s40011-016-0769-0>

155. Prashanth, L., Kattapagari, K. K., Chitturi, R. T., Baddam, V. R. R., & Prasad, L. K. (2015). A review on role of essential trace elements in health and disease. *Journal of Dr. NTR University of Health Sciences*, 4(2), 75. <https://doi.org/10.4103/2277-8632.158577>
156. Pretty, I. A., & Sweet, D. (2001). A look at forensic dentistry–Part 1: The role of teeth in the determination of human identity. *British dental journal*, 190(7), 359-366. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.4800972>
157. Prince, D. A., & Ubelaker, D. H. (2002). Application of Lamendin's adult dental aging technique to a diverse skeletal sample. *Journal of Forensic Science*, 47(1), 107-116.
158. Przysańska, A., Lorkiewicz-Muszyńska, D., Abreu-Głowacka, M., Glapiński, M., Sroka, A., Rewekant, A., Hyrczała, A., Bartecki, B., Żaba, C., & Kulczyk, T. (2017). Analysis of human dentition from Early Bronze Age: 4000-year-old puzzle. *Odontology*, 105(1), 13-22. <http://doi.org/10.1007/s10266-016-0284-z>.
159. Purchase, N. G., & Fergusson, J. E. (1986). Lead in teeth: the influence of the tooth type and the sample within a tooth on lead levels. *Science of the Total Environment*, 52(3), 239-250. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(86\)90124-5](https://doi.org/10.1016/0048-9697(86)90124-5)
160. Rao, R. V., Anupama, P. M., Mahesh, D. G., Iqbal, A. W., Ramakrishna, Y., & Venkateswarulu, P. (2010). Estimation of trace elements in various parts of human teeth using external beam PIXE. *International J of Physics and Applications*, 2(3), 123-34.
161. Real Academia de Ingeniería. (s.f.). Filtro paso alto. *En el Diccionario Español de Ingeniería*. Recuperado en junio de 2020, de <http://diccionario.raing.es/es/lema/filtro-paso-alto-0>
162. Real Academia de Ingeniería. (s.f.). Filtro paso banda. *En el Diccionario Español de Ingeniería*. Recuperado en junio de 2020, de <http://diccionario.raing.es/es/lema/filtro-paso-banda-0>

-
163. Real Academia Española. (s.f.). Oligoelemento. *En el Diccionario de la Lengua Española*. Recuperado en junio de 2020, de https://dle.rae.es/oligoelemento?m=30_2
164. Reesu, G. V., Augustine, J., & Urs, A. B. (2015). Forensic considerations when dealing with incinerated human dental remains. *Journal of forensic and legal medicine*, 29, 13-17. <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2014.10.006>
165. Reginster, J. (2002). Strontium ranelate in osteoporosis. *Current pharmaceutical design*, 8(21), 1907-1916. <https://doi.org/10.2174/1381612023393639>
166. Rehman, Z. U., Khan, S., Brusseau, M. L., & Shah, M. T. (2017). Lead and cadmium contamination and exposure risk assessment via consumption of vegetables grown in agricultural soils of five-selected regions of Pakistan. *Chemosphere*, 168, 1589-1596. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.11.152>
167. Ritz-Timme, S., Cattaneo, C., Collins, M. J., Waite, E. R., Schütz, H. W., Kaatsch, H. J., & Borrman, H. I. M. (2000). Age estimation: the state of the art in relation to the specific demands of forensic practise. *International journal of legal medicine*, 113(3), 129-136. <http://doi.org/10.1007/s004140050283>
168. Riyat, M., & Sharma, D. C. (2010). Significance of trace element profile of blood of persons with multiple caries versus sound teeth. *Biological trace element research*, 134(2), 174-179. <https://doi.org/10.1007/s12011-009-8470-2>
169. Roth, S., & Freund, I. (1980). Coherent optical harmonic generation in rat-tail tendon. *Optics Communications*, 33(3), 292-296. [http://doi.org/10.1016/0030-4018\(80\)90246-1](http://doi.org/10.1016/0030-4018(80)90246-1)
170. Rubio, L., Sioli, J. M., Gaitán, M. J., & Martin-de-las-Heras, S. (2018). Dental color measurement to predict DNA concentration in incinerated teeth for human identification. *PLoS one*, 13(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196305>

171. Rüdél, H. (2003). Case study: bioavailability of tin and tin compounds. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56(1), 180-189. [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(03\)00061-7](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(03)00061-7)
172. Saber-Tehrani, M., Givianrad, M. H., & Kakhkashan, P. (2007). Assessment of some elements in human permanent healthy teeth, their dependence on number of metallic amalgam fillings, and interelements relationships. *Biological trace element research*, 116(2), 155-169. <https://doi.org/10.1007/BF02685928>
173. Scannapieco, F. A., Bush, R. B., & Paju, S. (2003). Associations between periodontal disease and risk for atherosclerosis, cardiovascular disease, and stroke. A systematic review. *Annals of Periodontology*, 8(1), 38-53.
174. Schroeder, H. A., Tipton, I. H., & Nason, A. P. (1972). Trace metals in man: strontium and barium. *Journal of chronic diseases*, 25(9), 491-517.
175. Scholtanus, J. D., Özcan, M., & Huysmans, M. C. D. (2009). Penetration of amalgam constituents into dentine. *journal of dentistry*, 37(5), 366-373. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2009.01.009>
176. Schour, I., & Massler, M. (1941). The development of the human dentition. *Journal of the American Dental Association*, 28, 1153-1160.
177. Schroeder, M. A., Schroeder, D. K., Santos, D. J. S., & Leser, M. M. (2011). Extrações de molares na Ortodontia. *Dental Press Journal of Orthodontics*, 16(6), 130-157. <https://doi.org/10.1590/S2176-94512011000600019>
178. Sehrawat, J. S., & Singh, M. (2020). Application of Trace Elemental Profile of Known Teeth for Sex and Age Estimation of Ajnala Skeletal Remains: a Forensic Anthropological Cross-Validation Study. *Biological Trace Element Research*, 193(2), 295-310. <https://doi.org/10.1007/s12011-019-01712-8>

-
179. Senawongse, P., Otsuki, M., Tagami, J., & Mjör, I. (2006). Age-related changes in hardness and modulus of elasticity of dentine. *Archives of Oral Biology*, 51(6), 457-463. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2005.11.006>
180. Shah, P., Velani, P. R., Lakade, L., & Dukle, S. (2019). Teeth in forensics: A review. *Indian Journal of Dental Research*, 30(2), 291. http://doi.org/10.4103/ijdr.IJDR_9_17
181. Shishniashvili, T. E., Suladze, N. N., & Margvelashvili, V. V. (2016). Primary teeth and hair as indicators of environmental pollution. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 40(2), 152-155. <https://doi.org/10.17796/1053-4628-40.2.152>
182. Shruthi, B. S., Donoghue, M., Selvamani, M., & Kumar, P. V. (2015). Comparison of the validity of two dental age estimation methods: A study on South Indian population. *Journal of Forensic Dental Sciences*, 7(3), 189. <https://doi.org/10.4103/0975-1475.172431>
183. Singh, J., & Kalamdhad, A. S. (2011). Effects of heavy metals on soil, plants, human health and aquatic life. *International journal of Research in Chemistry and Environment*, 1(2), 15-21.
184. Singh, V. K., Kumar, V., & Sharma, J. (2015). Importance of laser-induced breakdown spectroscopy for hard tissues (bone, teeth) and other calcified tissue materials. *Lasers in medical science*, 30(6), 1763-1778. <https://doi.org/10.1007/s10103-014-1549-9>
185. Sirin, N., Matzenauer, C., Reckert, A., & Ritz-Timme, S. (2018). Age estimation based on aspartic acid racemization in dentine: what about caries-affected teeth? *International journal of legal medicine*, 132(2), 623-628. <https://doi.org/10.1007/s00414-017-1667-6>
186. Skalnaya, M. G., Tinkov, A. A., Demidov, V. A., Serebryansky, E. P., Nikonorov, A. A., & Skalny, A. V. (2016). Age-related differences in hair trace elements: a cross-sectional study in Orenburg, Russia. *Annals of human biology*, 43(5), 438-444. <https://doi.org/10.3109/03014460.2015.1071424>

187. Sowden, E. M., & Stitch, S. R. (1957). Trace elements in human tissue. 2. Estimation of the concentrations of stable strontium and barium in human bone. *Biochemical Journal*, 67(1), 104-109.
188. Tan, H. Y., Sun, Y., Lo, W., Teng, S. W., Wu, R. J., Jee, S. H., Lin, W. C., Hsiao, C. H., Lin, H. C., Chen, Y. F., Ma D. H. K., Huang. S. C. M, Lin, S. J., & Dong, C. Y (2007). Multiphoton fluorescence and second harmonic generation microscopy for imaging infectious keratitis. *Journal of biomedical optics*, 12(2), 024013. <http://doi.org/10.1021/ac1032325>
189. Tanaka, T., Maki, K., Hayashida, Y., & Kimura, M. (2004). Aluminum concentrations in human deciduous enamel and dentin related to dental caries. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 18(2), 149-154. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2004.07.002>
190. Tanner, J. M., Whitehouse, R. H., Cameron, N., Marshall, W. A., Healy, M. J. R., & Goldstein, H. (2001). *Assessment of skeletal maturity and prediction of adult height (TW2 method)* (pp. 1-110). London: Saunders.
191. Terashima, T., Chubachi, S., Matsuzaki, T., Nakajima, T., Satoh, M., Iwami, E., Yoshida, K., Katakura, A., & Betsuyaku, T. (2017). The association between dental health and nutritional status in chronic obstructive pulmonary disease. *Chronic respiratory disease*, 14(4), 334-341. <https://doi.org/10.1177/1479972316643076>
192. Timme, M., Steinacker, J. M., & Schmeling, A. (2017). Age estimation in competitive sports. *International journal of legal medicine*, 131(1), 225-233. <http://doi.org/10.1007/s00414-016-1456-7>
193. Touyz, R. M. (2004). Magnesium in clinical medicine. *Front Biosci*, 9(1-3), 1278-1293.8 <https://doi.org/10.2741/1316>
194. Ubelaker, D. H., & Khosrowshahi, H. (2019). Estimation of age in forensic anthropology: historical perspective and recent methodological advances. *Forensic sciences research*, 4(1), 1-9. <http://doi.org/10.1080/20961790.2018.1549711>

-
195. Uturbe, F. M., Lago, M. R., & Alonso, R. C. (2007). *Neuroimagen. Técnicas y procesos cognitivos*. Elsevier España.
196. Valenzuela, A., Martín-de las Heras, S., Mandojana, J. M., de Dios Luna, J., Valenzuela, M., & Villanueva, E. (2002). Multiple regression models for age estimation by assessment of morphologic dental changes according to teeth source. *The American journal of forensic medicine and pathology*, 23(4), 386-389.
197. Valenzuela-Garach, A. & Martín-de las Heras, S. (2018). 95. Odontología forense. En: J.A. Gisbert-Calabuig (Ed.), *Medicina Legal y Toxicología (7ª Ed.)* (pp. 1315-1316). Elsevier-Masson, Barcelona.
198. Van der Marel, C., Geertsma, W., & Van der Lugt, W. (1980). ⁷Li Knight shift of liquid Li-Pb and Li-Sn alloys. *Journal of Physics F: Metal Physics*, 10(10), 2305-2312.
199. Vandeputte, D. F., Jacob, W. A., & Van Grieken, R. E. (1990). Phosphorus, calcium and lead distribution in collagen in lead induced soft tissue calcification. An ultrastructural and X-ray microanalytical study. *Matrix*, 10(1), 33-37. [https://doi.org/10.1016/S0934-8832\(11\)80135-6](https://doi.org/10.1016/S0934-8832(11)80135-6)
200. Wakamura, M., Kandori, K., & Ishikawa, T. (1998). Surface composition of calcium hydroxyapatite modified with metal ions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 142(1), 107-116. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(98\)00486-5](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(98)00486-5)
201. Watts, D. L. (1990). Trace elements and neuropsychological problems as reflected in tissue mineral analysis (TMA) patterns. *Journal of Orthomolecular Medicine*, 5(3), 159-166.
202. Williams, G. (2001). A review of the most commonly used dental age estimation techniques. *Journal of Forensic Odonto-Stomatology*, 19(1), 9-17.
203. World Health Organization (WHO). (1996). *Trace elements in human nutrition and health*. World Health Organization.

204. Wright, S. J., Centonze, V. E., Stricker, S. A., DeVries, P. J., Paddock, S. W., & Schatten, G. (1993). Chapter 1 Introduction to confocal microscopy and three-dimensional reconstruction. In B. Matsumoto (Ed.), *Methods in cell biology* (Vol. 38, pp. 1-45). Academic Press. [http://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)60998-X](http://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)60998-X)
205. Yasui, T., Tohno, Y., & Araki, T. (2004). Determination of collagen fiber orientation in human tissue by use of polarization measurement of molecular second-harmonic-generation light. *Applied optics*, 43(14), 2861-2867. <http://doi.org/10.1364/AO.43.002861>
206. Zahra, N., & Kalim, I. (2017). Perilous effects of heavy metals contamination on human health. *Pakistan Journal of Analytical & Environmental Chemistry*, 18(1), 1-17. <http://doi.org/10.21743/pjaec/2017.06.01>
207. Zapico, S. C., DeGaglia, C. M., & Adserias-Garriga, J. (2019b). Age estimation based on chemical approaches. In J. Adserias-Garriga (Ed.), *Age Estimation* (pp. 199-211). Academic Press.
208. Zapico, S. C., Stone-Gordon, R., & Adserias-Garriga, J. (2019a). The evolution of methodology in biochemical age estimation. In J. Adserias-Garriga (Ed.), *Age Estimation* (pp. 189-197). Academic Press.
209. Zhu, W. Q., Ming, P. P., Qiu, J., Shao, S. Y., Yu, Y. J., Chen, J. X., Yang, J, Xu, L. N., Zang, S. M., & Tang, C. B. (2018). Effect of titanium ions on the Hippo/YAP signaling pathway in regulating biological behaviors of MC3T3-E1 osteoblasts. *Journal of Applied Toxicology*, 38(6), 824-833.

8. ANEXO. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Artículos

Fernández-Escudero, A. C., Legaz, I., Prieto-Bonete, G., López-Nicolás, M., Maurandi-López, A., & Pérez-Cárceles, M. D. (2020). Aging and trace elements in human coronal tooth dentine. *Scientific reports*, 10(1), 1-14.

Congresos

1. Bueno, J. M., Martínez-Ojeda, R. M., Ávila, F. J., Fernández-Escudero, A. C., López-Nicolás, M., & Pérez-Cárceles, M. D. (Universidad de Murcia, Spain). "Multiphoton Imaging Microscopy of Dental Pieces as a Tool in Forensic Sciences". Póster. Congreso de Focus on Microscopy 2019 (FOM2019). Londres, abril 2019.
2. Fernández-Escudero, A. C., López-Nicolás, M., & Pérez-Cárceles, M. D. "Estudio introductorio en dentina humana de la concentración de elementos traza y su relación con la edad." Comunicación oral. II Congreso Interdisciplinar de Jóvenes Investigadores. Universidad de Murcia, octubre 2018.
3. Fernández-Escudero, A. C., Prieto-Bonete, G., López-Nicolás, M., & Pérez-Cárceles, M. D. "Estudio introductorio en dentina humana de la concentración de elementos traza y su relación con la edad." Comunicación oral. IV Jornadas Doctorales. Universidad de Murcia, mayo 2018.
4. Fernández-Escudero, A. C., López-Nicolás, M., & Pérez-Cárceles, M. D. "Estudio introductorio en dentina humana: Concentración de elementos traza y su relación con la edad." Comunicación oral. I Jornadas Interdisciplinarias de Jóvenes Investigadores. Universidad de Murcia, octubre 2017.
5. Fernández-Escudero, A. C., Prieto-Bonete, G., López-Nicolás, M., Luna, A., & Pérez-Cárceles, M. D. "Estudio introductorio en dentina humana de la concentración de elementos traza y su relación con la edad." Comunicación oral III Jornadas Doctorales de la Universidad de Murcia. Universidad de Murcia, mayo 2017.

6. Fernández-Escudero, A. C., López-Nicolás, M., Motas-Guzmán, M., Luna-Maldonado, A., & Pérez-Cárceles, M. D. "Trace element in human dentine: influence of age. preliminary study." Póster. 23rd Congress of the International Academy of Legal Medicine. Dubai, enero 2015.

