

**PATHOGENESIS OF DENTAL FLUOROSIS:
BIOCHEMICAL AND CELLULAR MECHANISMS¹**

**PATOGÉNESIS DE LA FLUOROSIS DENTAL:
MECANISMOS BIOQUÍMICOS Y CELULARES¹**

GINA ALEJANDRA CASTIBLANCO RUBIO², STEFANIA MARTIGNON³,

JAIME EDUARDO CASTELLANOS PARRA⁴, WILSON ALFONSO MEJÍA NARANJO⁵

Abstract. *The mechanisms involved in the development of dental fluorosis are still unknown. The development of in vivo and in vitro models using biologically relevant concentrations of fluoride for the emergence of fluorosis has allowed suggesting hypotheses that contribute to the understanding of the mechanisms that produce this defect in enamel development, with high prevalence in Colombia. This topic review presents an update on the normal mechanisms of the formation of enamel and how they are affected by exposure to high concentrations of fluoride. This is a thorough review of the deleterious effects of fluoride on the cells and the extracellular matrix, especially during the maturation stage, resulting in a delay of the removal of the protein matrix of amelogenins, as well as the appearance of mottled enamel—a characteristic of dental fluorosis. Finally, it shows the perspectives of the study of this defect in enamel development from biochemistry and cellular and molecular biology.*

Key words: dental fluorosis, amelogenesis, amelogenin, dental enamel proteins

RESUMEN. *Los mecanismos involucrados en el desarrollo de la fluorosis dental aún no se conocen a cabalidad. El desarrollo de modelos in vivo e in vitro que utilizan concentraciones de fluoruro biológicamente relevantes para la aparición de fluorosis ha permitido el planteamiento de hipótesis que aportan cada vez más al conocimiento de los mecanismos que generan este defecto del desarrollo del esmalte, de alta prevalencia en Colombia. Esta revisión presenta una actualización sobre los mecanismos normales de la formación del esmalte y cómo estos se ven afectados por la exposición a altas concentraciones de fluoruro. Se presenta una revisión en detalle de los efectos deletéreos del fluoruro sobre las células y sobre la matriz extracelular, especialmente durante la etapa de maduración, que tendrán como consecuencia el retraso de la remoción de la matriz proteica de amelogeninas y se traducirá en la aparición de esmalte moteado, característica de la fluorosis dental. Por último, se muestran las perspectivas del estudio de este defecto del desarrollo del esmalte desde la bioquímica y la biología celular y molecular.*

Palabras clave: fluorosis dental, amelogénesis, amelogenina, proteínas del esmalte dental

Castiblanco GA, Martignon S, Castellanos JE, Mejía WA. Pathogenesis of dental fluorosis: biochemical and cellular mechanisms [Patogénesis de la fluorosis dental: mecanismos bioquímicos y celulares]. Rev Fac Odontol Univ Antioq 2017; 28(2): 408-421. DOI: 10.17533/udea.rfo.v28n2a10 URL: <http://dx.doi.org/10.17533/udea.rfo.v28n2a10>

- 1 This project was financed with resources from the Vice Presidency of Research of Universidad El Bosque (PCI 2010-93, PCI-2011-242) and COLCIENCIAS (442-2012).
- 2 DMD, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. Master's Degree in Basic Biomedical Sciences, Universidad El Bosque. Associate Professor. UNICA - Unidad de Investigación en Caries. Universidad El Bosque.
- 3 DMD, Pontificia Universidad Javeriana. Pediatric Dentist, Universidad El Bosque. PhD in Health Sciences, University of Copenhagen. Professor, UNICA - Unidad de Investigación en Caries.
- 4 DMD, Universidad Nacional de Colombia. Master's Degree in Pharmacology and PhD in Sciences-Chemistry, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. Professor, School of Dentistry, Universidad Nacional de Colombia.
- 5 Microbiologist, Universidad de los Andes. Master's Degree in Biochemistry and PhD in Sciences-Chemistry, Universidad Nacional de Colombia. Associate Professor. UNICA - Unidad de Investigación en Caries. Universidad El Bosque, Bogotá, Colombia.

SUBMITTED: JUNE 9/2016 - ACCEPTED: AUGUST 16/2016

- 1 Este trabajo fue financiado con recursos de la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad El Bosque (PCI 2010-93, PCI-2011-242) y COLCIENCIAS (442-2012).
- 2 Odontóloga, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. Magíster en Ciencias Básicas Biomédicas, Universidad El Bosque. Instructora Asociada. UNICA - Unidad de Investigación en Caries. Universidad El Bosque.
- 3 Odontóloga, Pontificia Universidad Javeriana. Odontóloga Pediatra, Universidad El Bosque. PhD en Ciencias de la Salud, Universidad de Copenhague. Profesora Titular, UNICA - Unidad de Investigación en Caries.
- 4 Odontólogo, Universidad Nacional de Colombia. Magíster en Farmacología y PhD en Ciencias-Química, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. Profesor Titular Catedrático, Facultad de Odontología Universidad Nacional de Colombia.
- 5 Microbiólogo, Universidad de los Andes. Magíster en Bioquímica y PhD en Ciencias-Química, Universidad Nacional de Colombia. Profesor Asociado. UNICA - Unidad de Investigación en Caries. Universidad El Bosque, Bogotá, Colombia.

RECIBIDO: JUNIO 9/2016 - ACEPTADO: AGOSTO 16/2016

INTRODUCTION

The use of fluorides has proven to have a positive effect on the prevention of tooth decay and has been considered one of the most important public health measures of the 20th century.^{1, 2} Its administration (which can be topical or systemic) aims to maintain a constant concentration of the fluoride ion (F⁻) in the oral cavity to facilitate the incorporation of these crystals on the surface of the erupted enamel—decreasing demineralization rate and increasing remineralization rate—.³ However, currently it is known that the excessive ingestion of F⁻ has deleterious effects on enamel development, generating a hypomineralized porous phenotype with reduced hardness.⁴ In addition to the aesthetic and functional consequences, an *in-vitro* study conducted at Unidad de Investigación en Caries (UNICA) in extracted teeth with moderate fluorosis from Colombian patients, suggests that the porosity of the enamel with fluorosis makes it more susceptible to demineralization.⁵

Unlike the etiologic factor of dental fluorosis—which is fully identified as the chronic exposure to high concentrations of F⁻ between the ages of 0 and 5 years—,⁶ little is known about the cellular and molecular mechanisms affected by F⁻ and leading to the development of fluorosis. In Colombia, there are epidemiological reports⁷ that identify the sources of intake of F⁻ possibly responsible for the high prevalence,^{8, 9} but the pathogenesis of the defect has not been properly investigated.

We know that the chronic and sustained presence of the F⁻ ion in plasma increases the likelihood of adhering to tissues in the mineralization process,¹⁰ but there is the misperception that the hypomineralization observed in dental fluorosis is the only consequence of the excessive addition of F⁻ in enamel. In this literature review, we assume that the hypomineralized phenotype of fluorosis is the outcome of a series of possible effects of the F⁻ ion on cell physiology and the proteins responsible

INTRODUCCIÓN

El uso de fluoruros ha demostrado tener un efecto positivo sobre la prevención de caries dental y se ha catalogado como una de las medidas de salud pública más relevantes del siglo XX.^{1, 2} Su administración (que puede ser tópica o sistémica) tiene el objetivo último de mantener una concentración constante de iones fluoruro (F⁻) en la cavidad oral para favorecer la incorporación de estos a los cristales de la superficie del esmalte erupcionado —disminuyendo la tasa de desmineralización y aumentando la tasa de remineralización—.³ Sin embargo, actualmente se conoce que la ingestión excesiva de F⁻ tiene efectos deletéreos sobre el esmalte en desarrollo, generando un fenotipo hipomineralizado, poroso y de menor dureza.⁴ Además de las consecuencias estéticas y funcionales, un estudio *in vitro* realizado en la Unidad de Investigación en Caries (UNICA), sobre dientes extraídos con fluorosis moderada provenientes de pacientes colombianos, sugiere que la porosidad del esmalte con fluorosis lo hace más susceptible a la desmineralización.⁵

A diferencia del factor etiológico de la fluorosis dental—que está plenamente identificado como la exposición crónica a altas concentraciones de F⁻ entre los 0 y 5 años—,⁶ se conoce poco sobre los mecanismos celulares y moleculares afectados por el F⁻ que llevan al desarrollo de fluorosis. En el caso de Colombia, contamos con reportes epidemiológicos⁷ y de identificación de las fuentes de ingesta de F⁻ posiblemente responsables de la alta prevalencia,^{8, 9} pero no se ha investigado sobre la patogénesis del defecto.

Sabemos que la presencia crónica y sostenida del ion F⁻ en el plasma aumenta la probabilidad de su incorporación a los tejidos en proceso de mineralización,¹⁰ pero existe la percepción errónea de que la hipomineralización observada en la fluorosis dental es consecuencia única de la incorporación excesiva de F⁻ en el esmalte. En esta revisión de la literatura, comprenderemos que el fenotipo hipomineralizado de la fluorosis es el desenlace de una serie de efectos que el ion F⁻ puede tener sobre la fisiología celular y las proteínas responsables

for guiding the mineralization of enamel (biomineralization). First, we will make a brief introduction to the normal process of enamel biomineralization, and then we will study the available evidence on the effects of F^- during key moments of the process.

Amelogenesis and enamel biomineralization

Enamel is a nano-compound bioceramics¹¹ with 95% inorganic material, 4% water, and 1% organic matter.^{12, 13} Four elements are required for the formation of enamel: cell, ions, proteins, and a compartment where the mineralization reaction takes place (extracellular matrix).¹² The entire process of enamel formation is called *amelogenesis*, while the mineralization process as such, which takes place between ions and proteins secreted by cells, is called *biomineralization*. The enamel-forming cells are called *ameloblasts*, and during the process they go through a series of changes that are summarized in the following stages: differentiation, secretion, maturation, and transition.¹⁴ During the phase of secretion of ameloblasts, they carry ions from the plasma into the interior of the cell: the type of ion that enters will depend, among other factors, on its availability in the plasma at the moment.¹⁵ This is why the mineral of enamel (which is similar to the pure mineral hydroxyapatite) usually contains a variety of ions, such as HPO_4^{2-} , CO_3^{2-} , Na^+ y F^- .¹⁶

In addition to transporting and secreting ions, ameloblasts synthesize and secrete a large amount of proteins, which are the major component of enamel in formation (> 90%).¹⁷ Among the secreted proteins are first those of the extracellular matrix (amelogenin, ameloblastin, and enamelin) and secondly the proteases: metalloproteinase matrix 20 (MMP-20) and kallikrein 4 (KLK-4). The enamelin and the ameloblastin function as nucleators, attracting ions to their protein structure to favor the organized deposit of crystals of calcium phosphate salts.¹⁸

de guiar la mineralización del esmalte (biomineralización). Primero, realizaremos una breve introducción al proceso normal de biomineralización del esmalte, y posteriormente estudiaremos la evidencia disponible sobre los efectos del F^- en momentos claves del proceso.

Amelogénesis y biomineralización del esmalte

El esmalte es una biocerámica nanocompuesta,¹¹ con un 95% de material inorgánico, 4% de agua y 1% de materia orgánica.^{12, 13} Para la formación del esmalte son necesarios cuatro elementos: células, iones, proteínas y un compartimento en el que se lleva a cabo la reacción de mineralización (matriz extracelular).¹² El proceso de formación del esmalte se denomina en conjunto *amelogénesis*, mientras que el proceso de mineralización como tal, que se da entre iones y proteínas secretadas por las células, se denomina *biomineralización*. Las células formadoras de esmalte se denominan *ameloblastos*, y durante el proceso atraviesan una serie de cambios resumidos en las siguientes etapas: diferenciación, secreción, maduración y transición.¹⁴ En la etapa de secreción de los ameloblastos, estos transportan iones desde el plasma hacia el interior de la célula: el tipo de ion que ingrese dependerá, entre otros factores, de su disponibilidad en ese momento en el plasma.¹⁵ Es por este motivo que el mineral del esmalte (que es semejante al mineral puro *hidroxiapatita*) contiene usualmente una variedad de iones en su estructura, como HPO_4^{2-} , CO_3^{2-} , Na^+ y F^- .¹⁶

Además de transportar y secretar iones, los ameloblastos sintetizan y secretan una gran cantidad de proteínas, que son el componente mayoritario del esmalte en formación (> 90%).¹⁷ Dentro de las proteínas secretadas están, en primer lugar, las de la matriz extracelular (amelogenina, ameloblastina y enamelin) y en segundo lugar las proteasas: metalloproteinasa de matriz 20 (MMP-20) y calicreína 4 (KLK-4). La enamelin y la ameloblastina funcionan como nucleadores, atrayendo iones a su estructura proteica para favorecer el depósito organizado de las sales de fosfato de calcio en forma de cristales.¹⁸

On the other hand, the amelogenin takes a higher supramolecular organization (20 nm nanospheres) and works as a “scaffold” that guides the growth of crystals for the formation of prisms.¹⁹ The role of ameloblastin is less clear, but it has been found to have functions in the adhesion and control of ameloblasts differentiation.²⁰ The MMP-20 gradually and selectively degrades the protein support during the secretion and maturation stages, to allow the widening of the enamel crystals which previously grew in length.²¹ At the start of the maturation stage, cells stop producing MMP-20 and begin to produce KLK-4, a protease that completes the process of degradation of enamel protein material.²² The KLK-4 cuts the remains of structural proteins into small peptides that can be processed in the cell.²³ At the end of this orderly process of the maturation stage, the protein component will be less than 1%¹¹ and the resulting enamel will have minimum porosity and a translucent shiny look with a smooth feel.

Based on the evidence about the normal mechanisms of enamel formation (summarized above), several studies on the induction of fluorosis have been conducted to understand which steps of the process are affected by fluoride, as described below.

What concentrations of fluoride are used in *in vivo* and *in vitro* experiments for the induction of dental fluorosis?

Despite the existence of standardized models (described below), there is no consensus as to the concentration of F⁻ biologically relevant to induce dental fluorosis in *in vivo* and *in vitro* studies. On the one hand, a line of evidence in the studies uses micromolar (μM) concentrations of F⁻ and considers that concentrations of 2-12 $\mu\text{mol/L}$ are biologically relevant.²⁴⁻²⁷ Another line of evidence argues that, under normal conditions, there are basal levels of F⁻ in the fluid of enamel

Por otro lado, la amelogenina asume una organización supramolecular superior (nanoesferas de 20 nm) y funciona como un “andamio” que direcciona el crecimiento de los cristales para la formación de prismas.¹⁹ El papel de la ameloblastina es menos claro, pero se ha encontrado que tiene funciones en la adhesión y el control de la diferenciación de los ameloblastos.²⁰ La MMP-20 degrada paulatinamente y de forma selectiva el soporte proteico durante las etapas de secreción y maduración, para permitir el ensanchamiento de los cristales de esmalte que previamente crecieron en longitud.²¹ En el inicio de la etapa de maduración, las células dejan de producir MMP-20 y comienzan a producir KLK-4, la proteasa que finaliza el proceso de degradación del material proteico del esmalte.²² La KLK-4 corta los restos de las proteínas estructurales en péptidos pequeños que pueden procesarse en la célula.²³ Al final de este proceso ordenado de la etapa de maduración, el componente proteico será menor al 1%¹¹ y el esmalte resultante tendrá una porosidad mínima y una apariencia clínica translúcida, brillante y lisa al tacto.

De la mano de la evidencia sobre los mecanismos normales de formación del esmalte (resumida anteriormente), se han desarrollado estudios de inducción de fluorosis para comprender qué etapas del proceso se ven afectadas por el fluoruro, como se describirá a continuación.

¿Qué concentraciones de fluoruro se utilizan en experimentos *in vivo* e *in vitro* para la inducción de fluorosis dental?

A pesar de la existencia de modelos estandarizados (descritos más adelante), no existe consenso en cuanto a la concentración de F⁻ biológicamente relevante para la inducción de fluorosis dental tanto en estudios *in vivo* como *in vitro*. Por un lado, una línea de evidencia utiliza en sus estudios concentraciones de F⁻ del orden micromolar (μM) y considera biológicamente relevantes las concentraciones de 2-12 $\mu\text{mol/L}$.²⁴⁻²⁷ Otra línea de evidencia argumenta que, en condiciones normales, existen niveles basales de F⁻ en el fluido del esmalte

which proportionally increase in the presence of concentrations of F^- in plasma and expose the ameloblasts to milimolar concentrations (mM) of F^- .²⁸ The difficulties for a consensus and the directly proportional relationship between the dose of F^- and cellular responses make it necessary to examine the effects reported for F^- along with the concentration used in the experiments.

***In vivo* and *in vitro* models standardized for the study of dental fluorosis**

Two *in vitro* models have been established: the first one consists of a line of immortalized cells similar to ameloblasts, resulting from the enamel organ of the first molar in newborn *Swiss-Webster* mice. This line was achieved by transfection of cells in the epithelium of the enamel organ with the oncogene SV40 virus and has been named LS8.²⁹ The second model consists of standardized primary cultures of epithelial cells of the enamel organ of human fetuses of 21 weeks of age.³⁰ The latter model represents the ideal *in vitro* model for the study of fluorosis, as it comes from human cells and expresses more bookmarks than the mouse line; however, sampling has ethical implications and technical difficulties that make the LS8 cell model the more convenient and the most widely used.

As to *in vivo* models, some mammals have been used, including rats,³¹ mice,³² hamsters,³³ rabbits³⁴ and higher species, such as pigs³⁵ and sheep.³⁶ The rat model has proven to be the most appropriate for the study of dental fluorosis,³¹ since the incisors of rodents erupt continuously, and a single tooth can show the different stages of enamel development; in addition, there is evidence that the levels of F^- plasma required for the appearance of fluorotic defects in enamel are very similar in humans and other animals.^{25, 31, 37, 38}

que se elevan proporcionalmente al aumento de la concentración de F^- en plasma y exponen a los ameloblastos a concentraciones milimolares (mM) de F^- .²⁸ Las dificultades en el consenso y la relación directamente proporcional entre la dosis de F^- y las respuestas celulares hacen necesario que los efectos reportados para el F^- se examinen siempre acompañados de la concentración utilizada en los experimentos.

Modelos *in vivo* e *in vitro* estandarizados para el estudio de la fluorosis dental

Se han establecido dos modelos *in vitro*: el primero consiste en una línea de células inmortalizadas, similares a ameloblastos, derivadas del órgano del esmalte del primer molar de ratones *Swiss-Webster* recién nacidos. Esta línea se obtuvo con la transfección de células del epitelio del órgano del esmalte con el oncogen del virus SV40 y se denomina LS8.²⁹ El segundo modelo consiste en cultivos primarios estandarizados de células del epitelio del órgano del esmalte de fetos humanos de 21 semanas.³⁰ Este último representa el modelo *in vitro* ideal para el estudio de fluorosis, por provenir de células humanas y expresar mayor número de marcadores que la línea de ratón; sin embargo, la obtención de las muestras tiene implicaciones éticas y dificultades técnicas que hacen que el modelo de células LS8 sea el más conveniente y de mayor uso.

En cuanto a los modelos *in vivo*, se han empleado mamíferos como ratas,³¹ ratones,³² hamsters,³³ conejos³⁴ y especies mayores, como cerdos³⁵ y ovejas.³⁶ El modelo de rata ha demostrado ser el más apropiado para el estudio de la fluorosis dental,³¹ dado que los incisivos de los roedores erupcionan de forma continua, y en un solo diente se pueden apreciar las diferentes etapas del desarrollo del esmalte; además, existe evidencia de que en humanos y otros animales, los niveles de F^- en plasma requeridos para la aparición de defectos fluoróticos en esmalte son muy similares.^{25, 31, 37, 38}

At the molecular level, dental fluorosis is a consequence of the delay in the removal of proteins from the extracellular matrix, mainly during enamel maturation.

The induction of fluorosis in animal and cell models has enabled to determine the extent to which the F^- circulating in plasma in excessive concentrations during amelogenesis has deleterious effects on the different stages, including the secretion stage.³⁹ It has been reported that at this stage fluoride induces alterations in the vesicular transport of ameloblasts⁴⁰ and in the intracellular degradation of proteins of the matrix by the lysosomal system.^{41, 42} However, experimental studies on fluorosis have focused specifically on the stage of enamel maturation (which includes the orderly sequence of crystal growth, proteolytic digestion by different enzymes, and absorption of protein residues), as it has proven to be the most sensitive to the negative effects of F^- . This is based on *in vivo* studies performed in rats, which have demonstrated that the consumption of high amounts of F^- delays the elimination of proteins (especially amelogenins).^{24, 25} A reduced capacity of amelogenin elimination triggered by F^- prevents the thickening of enamel crystals and leads to incomplete mineralization.⁴³

In the same stage of maturation, in which the ameloblasts regulate pH by secreting bicarbonate and using ionic transporters to absorb protons from the matrix,⁴⁴ the large number of protons (H^+) released as a result of the high rate of precipitation of enamel crystals produce fluctuations of pH (from neutral to acid),⁴⁵ and the presence of high concentrations of F^- in an acidic environment has deleterious effects, as will be discussed later in this review. While the effect of F^- on maturation is critical, its adverse effect on the other stages is not negligible and could be cumulative, considering that the severity of the fluorosis is linked to a sustained and prolonged exposure.⁴³

A nivel molecular, la fluorosis dental es consecuencia del retraso en la remoción de las proteínas de la matriz extracelular, principalmente durante la fase de maduración del esmalte.

La inducción de fluorosis en modelos celulares y animales ha permitido determinar en qué medida el F^- que circula en el plasma en concentraciones excesivas durante la amelogénesis tiene efectos deletéreos sobre las diferentes etapas, incluyendo la etapa de secreción.³⁹ En esta etapa se ha reportado que el fluoruro induce alteraciones en el transporte vesicular de los ameloblastos⁴⁰ y en la degradación intracelular de proteínas de la matriz por parte del sistema lisosomal.^{41, 42} Sin embargo, los estudios experimentales de fluorosis se han enfocado específicamente en la etapa de maduración del esmalte (cuando suceden la secuencia ordenada de crecimiento cristalino, la digestión proteolítica por enzimas diferentes y la absorción de los residuos proteicos), pues ha demostrado ser la más sensible a los efectos negativos del F^- . Esto se fundamenta en estudios *in vivo* realizados en ratas, en la cuales se demostró que el consumo de altas cantidades de F^- retrasa la eliminación de las proteínas (especialmente de amelogeninas).^{24, 25} La capacidad disminuida para la eliminación de amelogeninas desencadenada por el F^- impide el engrosamiento de los cristales de esmalte y lleva a que la mineralización se dé de forma incompleta.⁴³

En la misma etapa de maduración, en la que los ameloblastos regulan el pH con la secreción de bicarbonato y el uso de transportadores iónicos para absorber protones de la matriz,⁴⁴ la gran cantidad de protones (H^+) liberados como consecuencia de la alta tasa de precipitación de cristales de esmalte genera fluctuaciones de pH (de neutro a ácido),⁴⁵ y la presencia de altas concentraciones de F^- en un ambiente ácido tiene efectos deletéreos, como presentaremos más adelante en esta revisión. Aunque el efecto del F^- sobre la maduración es crítico, su efecto nocivo sobre las demás etapas tampoco es despreciable y podría ser acumulativo, si tenemos en cuenta que la severidad de la fluorosis responde a una exposición sostenida y prolongada.⁴³

Effects of fluoride on the physiology of ameloblasts

It has been reported that a concentration of 10 μM of F^- produces a decrease in the expression of MMP-20,^{46,47} concentrations of 10 to 20 μM of F^- produce an increase in apoptosis, and concentrations above 1 mM produce alterations in cell proliferation.⁴⁷ In addition, concentrations of 120 μM of F^- reduce the expression of messengers of amelogenin, ameloblastin, enamel, and MMP-20, as well as factors of vascularization, such as the endothelial growth factor (VEGF), monocyte chemoattractant proteins (MCP-1) and the interferon inducible protein (IP-10).⁴⁸

The pH regulation is fundamental for crystal growth: the precipitation of ions during enamel maturation releases a large amount of protons (H^+), followed by reaction $[10\text{Ca}^{2+} + 6\text{HPO}_4^{2-} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 + 8\text{H}^+]$, and the pH of the extracellular matrix goes from neutral to slightly acidic.⁴⁵ These pH changes are reflected in the alteration of the morphology of these cells, which show rough ends in the presence of an acid pH and smooth ends in the presence of a neutral pH. During the normal development of enamel there is an alternation of these morphologies; however, *in vitro* studies have shown that the modulation between smooth and rough morphology become slow, with predominance of the rough one.⁴⁷ therefore, as a result of the presence of fluoride, the pH of the extracellular matrix remains acid for a long time.

The exposure of LS8 cells to concentrations of 250-2000 μM of F^- has provided interesting observations: the increase in the concentration of protons (H^+), in the presence of a high concentration of ions F^- , leads to the formation of hydrofluoric acid (HF), which is absorbed by the cells and causes severe changes in cellular metabolism.⁴⁹ These findings suggest an interesting hypothesis: an excess in cytoplasmic F^- in ameloblast induces stress in the endoplasmic reticulum and activates a defense called “unfolded protein response” (UPR),

Efectos del fluoruro sobre la fisiología de los ameloblastos

Se ha registrado que a una concentración de 10 μM de F^- ocurre una disminución en la expresión de MMP-20,^{46,47} a concentraciones de entre 10 y 20 μM F^- se da un aumento de la apoptosis, y a concentraciones mayores a 1 mM se presenta una alteración de la proliferación celular.⁴⁷ Además, concentraciones de 120 μM de F^- reducen la expresión de mensajeros de amelogenina, ameloblastina, enamelina y MMP-20, así como factores de vascularización como el factor de crecimiento endotelial (VEGF), las proteínas quimio-atrayentes de monocitos (MCP-1) y la proteína inducible por interferón (IP-10).⁴⁸

La regulación del pH es fundamental para el crecimiento cristalino: la precipitación de los iones durante la maduración del esmalte libera gran cantidad de protones (H^+), después de lo cual sigue la reacción $[10\text{Ca}^{2+} + 6\text{HPO}_4^{2-} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 + 8\text{H}^+]$, y el pH de la matriz extracelular pasa de neutro a levemente ácido.⁴⁵ Estos cambios de pH se ven reflejados en la alteración de la morfología de estas células, que se observan de extremos rugosos ante un pH ácido y de extremos lisos ante un pH neutro. En el desarrollo normal del esmalte se presenta una alternancia de estas morfologías; sin embargo, en estudios *in vitro* se ha observado que la modulación entre la morfología lisa y rugosa se retarda, con predominio de la rugosa.⁴⁷ Por lo tanto, como consecuencia de la presencia de fluoruro, el pH de la matriz extracelular permanece ácido por un tiempo prolongado.

De la exposición de células LS8 a concentraciones de 250-2000 μM de F^- se han desprendido observaciones interesantes: el aumento en la concentración de protones (H^+), en presencia de una alta concentración de iones F^- , conduce a la formación del ácido fluorhídrico (HF), que es absorbido por las células y causa cambios severos en el metabolismo celular.⁴⁹ Estos hallazgos sugieren una hipótesis interesante: el exceso de F^- citoplasmático en el ameloblasto induce estrés en el retículo endoplásmico y la activación de un mecanismo de defensa llamado “respuesta a proteínas mal plegadas” (UPR, unfolded protein response),

which decreases the synthesis and secretion of KLK-4, essential for the elimination of the protein matrix of amelogenin and the final maturation of enamel prisms.⁵⁰⁻⁵²

When F⁻ passes through the cytoplasmic membrane toward the mineralization front, another chain of effects, demonstrated by recent *in vitro* studies describing the massive arrival of F⁻ in the mineralization front, produces a hypermineralized layer of enamel which could act as a physical barrier that would prevent the diffusion of ions and proteins to the subsurface of the mineralization front.⁵³ This molecular event could hinder the entry of “raw material” necessary for full mineralization of crystals and thus contribute to the hypomineralization of fluorotic enamel.

Effects of fluoride on the activity of proteases of the extracellular matrix

It is widely known that F⁻ inhibits the activity of proteases of the extracellular matrix of enamel. Since the number of studies is limited, the results have failed to demonstrate a direct inhibition of the enzyme activity,⁵⁴⁻⁵⁶ and therefore F⁻ has been discarded as an inhibitor of proteases in the pathogenesis of fluorosis.

Effects of fluoride on the kinetics of biomineralization

The incorporation of F⁻ in enamel crystals during their formation increases the binding strength of amelogenin to the crystal⁵⁷ and reduces its hydrolysis.⁵⁸ This evidence has been gathered in trials with recombinant amelogenin bound to synthetic hydroxyapatite with F⁻ concentrations like those found in human teeth with fluorosis. The binding of proteins to crystals with high content of F⁻ can possibly trigger changes in their

que tiene como consecuencia la disminución de la síntesis y secreción de KLK-4, indispensable para la eliminación de la matriz proteica de amelogenina y la maduración final de los prismas del esmalte.⁵⁰⁻⁵²

Cuando el F⁻ atraviesa la membrana citoplasmática hacia el frente de mineralización, se registra otra cadena de efectos, demostrada por estudios *in vitro* recientes, que describen que la llegada masiva de F⁻ al frente de mineralización genera una capa hipermineralizada de esmalte que se podría comportar como una barrera física que impediría la difusión de iones y proteínas a la subsuperficie del frente de mineralización.⁵³ Este evento molecular podría dificultar el ingreso de la “materia prima” necesaria para la mineralización completa de los cristales y, de esta manera, contribuir a la hipomineralización del esmalte fluorótico.

Efectos del fluoruro sobre la actividad de las proteasas de la matriz extracelular

Se conoce que el F⁻ es un inhibidor de la actividad de las proteasas de la matriz extracelular del esmalte. Aunque el número de estudios es limitado, los resultados no han podido demostrar una inhibición directa de la actividad enzimática,⁵⁴⁻⁵⁶ por lo que hasta ahora se descarta al F⁻ como inhibidor de proteasas dentro de la patogénesis de la fluorosis.

Efectos del fluoruro sobre la cinética de la biomineralización

La incorporación de F⁻ a los cristales de esmalte durante su formación aumenta la fuerza de unión de la amelogenina al cristal⁵⁷ y disminuye su tasa de hidrólisis.⁵⁸ Esta evidencia se ha recogido en ensayos con amelogenina recombinante unida a hidroxiapatita sintética con concentraciones de F⁻ similares a las encontradas en dientes humanos con fluorosis. Es posible que la unión de las proteínas a cristales con alto contenido de F⁻ desencadene cambios en su conformación, “ocultando”

conformation, thus “hiding” some cleavage sites and decreasing access to the proteases,⁵⁷ reducing the speed of removal of matrix proteins and preventing the thickening and maturation of the crystal. These studies provide sufficient evidence to suggest that dental fluorosis is a consequence of the delay in the removal of proteins during the stage of maturation of enamel. In addition, proteins may possibly be retained in erupted enamel.

Based on this logic, some studies have been conducted on the retention of amelogenin in erupted enamel with fluorosis.^{58,59} The low protein content of erupted enamel (< 1% in healthy enamel) and the difficulties to extract proteins trapped in the mineral matrix have limited the studies aimed at extracting, identifying, and quantifying the protein material of enamel.

In order to expand the study of dental fluorosis in Colombia, at the Unidad de Investigación en Caries (UNICA) we standardized a method to extract and identify enamel proteins through liquid chromatography along with mass spectrometry. The method was applied to a sample of teeth from Colombian patients.⁶⁰ Using this method, we compared the proteins identified in erupted enamel of healthy teeth and teeth with fluorosis. Our analysis showed amelogenin, ameloblastin, and enamelin—the latter more frequently in fluorotic enamel, suggesting a possible role of this protein in the events that trigger fluorosis—. In addition, through the relative quantification of identified peptides of amelogenin, we found no differences in protein content between healthy enamel and enamel with fluorosis.¹¹ The available reports on this subject are contradictory,^{58, 59, 61} and to date we cannot speak of retention of proteins in fluorotic enamel but of an alteration in speed for their removal, which slows down the maturation process of enamel crystal.⁴³

Figure 1 summarizes the available evidence on the cellular and biochemical mechanisms reported to date, possibly related to the pathogenesis of dental fluorosis.

algunos sitios de corte y disminuyendo el acceso de las proteasas,⁵⁷ disminuyendo la velocidad de remoción de las proteínas de la matriz e impidiendo el engrosamiento y la maduración del cristal. Estos estudios proporcionan evidencia suficiente para sugerir que la fluorosis dental es consecuencia del retraso en la remoción de proteínas durante la etapa de maduración del esmalte. Además, sería posible que las proteínas se retengan en el esmalte erupcionado.

Siguiendo la lógica anterior, se han realizado estudios sobre la retención de amelogenina en el esmalte erupcionado con fluorosis.^{58, 59} El bajo contenido proteico del esmalte erupcionado (<1% en el esmalte sano), y las dificultades para la extracción de proteínas atrapadas en la matriz mineral, han limitado los estudios orientados a extraer, identificar y cuantificar el material proteico del esmalte.

Con el fin de ampliar el estudio de la fluorosis dental en Colombia, en la Unidad de Investigación en Caries (UNICA) estandarizamos un método para la extracción e identificación de proteínas del esmalte a través de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, el cual se aplicó a una muestra de dientes de pacientes colombianos.⁶⁰ Usando este método, comparamos las proteínas identificadas en el esmalte erupcionado de dientes sanos y con fluorosis. Con nuestro análisis encontramos amelogenina, ameloblastina y enamelin; esta última con mayor frecuencia en el esmalte fluorótico, lo cual sugiere un posible papel de esta proteína en los eventos que desencadenan la fluorosis. Además, mediante la cuantificación relativa de los péptidos identificados de amelogenina, no encontramos diferencias en el contenido proteico entre el esmalte sano y con fluorosis.¹¹ Los reportes existentes sobre este tema son contradictorios,^{58, 59, 61} y a la fecha no podemos hablar de una retención de proteínas en el esmalte fluorótico, sino de una alteración en la velocidad de remoción de las mismas, que retrasa el proceso de maduración del cristal de esmalte.⁴³

En la figura 1 se resume la evidencia disponible sobre los mecanismos bioquímicos y celulares reportados a la fecha, posiblemente relacionados con la patogénesis de la fluorosis dental.

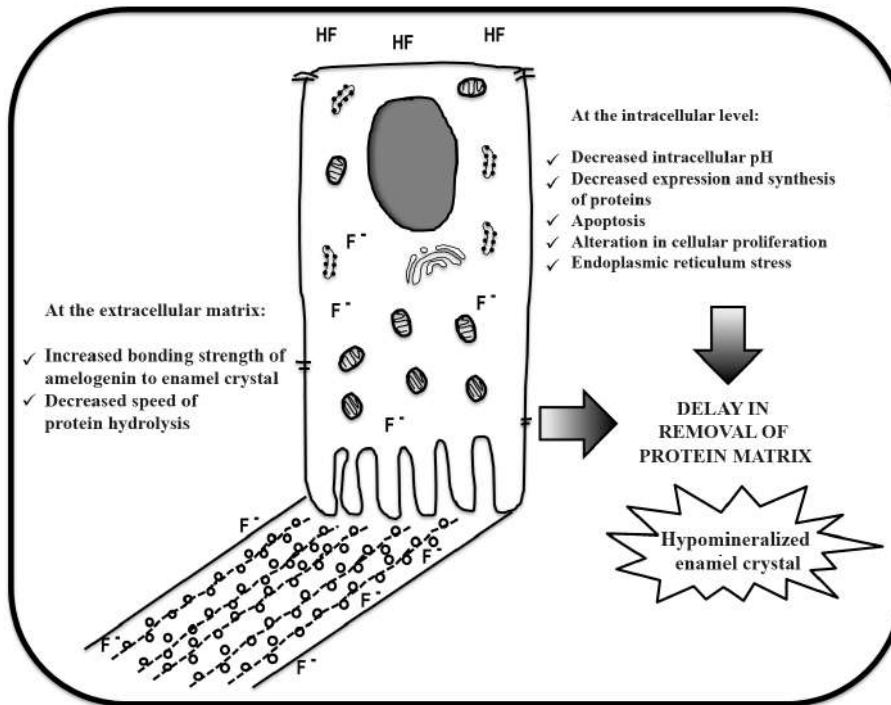


Figure 1. Possible biochemical and cellular mechanisms involved in the pathogenesis of dental fluorosis, both at the intracellular level and the extracellular matrix

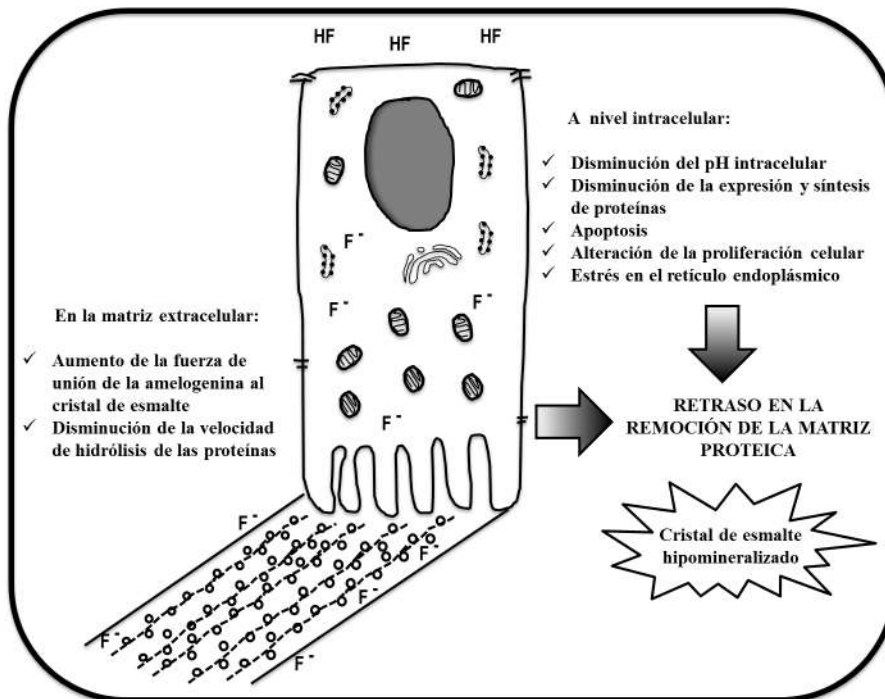


Figura 1. Posibles mecanismos bioquímicos y celulares involucrados en la patogénesis de la fluorosis dental, tanto a nivel intracelular como de la matriz extracelular

CONCLUSIONS AND EXPECTATIONS

The cellular and molecular mechanisms by which dental fluorosis occurs have not been fully explained. Nor is there consensus on the biologically relevant concentrations of F^- that produce dental fluorosis in humans. *In vitro* and *in vivo* models have shown that high steady concentrations of F^- have harmful effects on ameloblasts. These deleterious effects are proportional to the doses of F^- used and decreases the capacity of ameloblasts to synthesize and secrete proteins, especially at the maturation stage. The susceptibility of this stage in particular may be due to pH fluctuations experienced by ameloblasts due to a high concentration of protons released during the precipitation of crystals. While F^- has been thought to be a direct inhibitor of MMP-20 and KLK-4 proteases (as a possible cause of protein retention), the available evidence to date allows discarding this hypothesis. For now, it is widely known that F^- affects the kinetics of biomineralization, slows down the hydrolysis of proteins, and interrupts the process of elimination of the protein matrix, triggering the incomplete mineralization of enamel crystals and producing porous enamel—which is typical of dental fluorosis.

Further studies on the pathogenesis of dental fluorosis are expected to provide evidence to the analysis of biologically relevant concentrations of fluoride (e.g., fluoride in plasma of inhabitants from fluorosis-endemic areas) and thus align them to *in vivo* and *in vitro* studies. It is also important, under such concentrations, to carry out studies on other effects of F^- on the cellular physiology and the kinetics of biomineralization *in vitro* to fully elucidate the mechanisms that lead to this defect and to replicate studies that—in the presence of contradictory evidence—confirm whether the enamel with fluorosis shows retention of proteins.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Los mecanismos celulares y moleculares mediante los cuales se produce la fluorosis dental no se han dilucidado por completo. Tampoco existe consenso sobre las concentraciones biológicamente relevantes de F^- que generan fluorosis dental en seres humanos. En modelos *in vitro* e *in vivo* se ha observado que, cuando el F^- se encuentra en altas concentraciones y de forma sostenida, tiene efectos nocivos sobre los ameloblastos. Estos efectos deletéreos son proporcionales a las dosis de F^- empleadas y tienen como consecuencia la disminución de la capacidad del ameloblasto para la síntesis y la secreción de proteínas, especialmente en la etapa de maduración. La susceptibilidad de esta etapa en especial puede deberse a las fluctuaciones de pH que experimentan los ameloblastos debido a la alta concentración de protones liberados durante la precipitación de cristales. Aunque se ha pensado en el F^- como inhibidor directo de las proteasas MMP-20 y KLK-4 (como posible causa de la retención de proteínas), la evidencia disponible a la fecha descarta esa hipótesis. Por ahora, se conoce que el F^- afecta la cinética de la biomineralización, disminuye la velocidad de la hidrólisis de las proteínas e interrumpe el proceso de eliminación de la matriz proteica, desencadenando la mineralización incompleta de los cristales de esmalte y dando origen al esmalte poroso característico de la fluorosis dental.

Se espera que futuras investigaciones, orientadas al estudio de la patogénesis de la fluorosis dental, aporten evidencia al estudio de las concentraciones de fluoruro biológicamente relevantes (por ejemplo, fluoruro en plasma de habitantes de zonas endémicas de fluorosis), para así homologarlas a estudios *in vivo* e *in vitro*. Es importante, además, bajo dichas concentraciones, realizar estudios sobre otros efectos del F^- sobre la fisiología celular y la cinética de la biomineralización *in vitro* que permitan dilucidar por completo los mecanismos que conllevan al defecto y replicar estudios que —ante la evidencia contradictoria— confirmen si efectivamente hay o no retención de proteínas en el esmalte con fluorosis.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Dr. Margarita Úsuga Vacca for her critical review of the manuscript.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare not having conflicts of interest.

CORRESPONDING AUTHOR

Gina Alejandra Castiblanco Rubio
Unidad de Investigación en Caries-UNICA
Vicerrectoría de Investigaciones
Universidad El Bosque
(+571) 648 9000 Ext 1279
gcastiblanco@unbosque.edu.co
Av. Cra. 9 # 131A-02 Casa XII
Bogotá, Colombia

AGRADECIMIENTOS

A la doctora Margarita Úsuga Vacca, por su revisión crítica del manuscrito.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

CORRESPONDENCIA

Gina Alejandra Castiblanco Rubio
Unidad de Investigación en Caries -UNICA
Vicerrectoría de Investigaciones
Universidad El Bosque
(+571) 648 9000 Ext 1279
gcastiblanco@unbosque.edu.co
Av. Cra. 9 # 131A-02 Casa XII
Bogotá, Colombia

REFERENCES / REFERENCIAS

1. Sampaio FC, Levy SM. Systemic fluoride. *Monogr Oral Sci* 2011; 22: 133-45. DOI: 10.1159/000325161 URL: <https://doi.org/10.1159/000325161>
2. Marinho VC, Higgins JP, Sheiham A, Logan S. One topical fluoride (toothpastes, or mouthrinses, or gels, or varnishes) versus another for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev* 2004; 1: CD002780. DOI: 10.1002/14651858.CD002780.pub2 URL: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD002780.pub2>
3. Robinson C, Shore RC, Brookes SJ, Strafford S, Wood SR, Kirkham J. The chemistry of enamel caries. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000; 11(4): 481-495.
4. Aoba T, Fejerskov O. Dental fluorosis: chemistry and biology. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13(2): 155-170.
5. Marín LM, Cury JA, Tenuta LMA, Castellanos JE, Martignon S. Higher fluorosis severity makes enamel less resistant to demineralization. *Caries Res* 2016; 50: 407-413.
6. Dean HT. Chronic endemic dental fluorosis (mottled enamel). *J Am Med Assoc* 1936; 107(16): 1269-1273. DOI: 10.1001/jama.1936.02770420007002 URL: <https://doi.org/10.1001/jama.1936.02770420007002>
7. Agudelo-Suárez AA, Martínez-Flórez LM, Madrid-Gutiérrez LM, Vivares-Builes AM, Rocha-Buelvas A. Panorama de la fluorosis dental en Colombia: una revisión exploratoria de la literatura. *Univ Odontol* 2013; 32(68): 133-145.
8. Franco AM, Martignon S, Saldarriaga A, González MC, Arbeláez MI, Ocampo A et al. Total fluoride intake in children aged 22-35 months in four Colombian cities. *Community Dent Oral Epidemiol* 2005; 33(1): 1-8.
9. Franco AM, Saldarriaga A, Martignon S, González MC, Villa AE. Fluoride intake and fractional urinary fluoride excretion of Colombian preschool children. *Community Dent Health* 2005; 22(4): 272-278.
10. Angmar-Mansson B, Ericsson Y, Ekberg O. Plasma fluoride and enamel fluorosis. *Calcif Tissue Res* 1976; 22: 77-84.
11. Boyde A. Microstructure of enamel. *Ciba Found Symp* 1997; 205: 18-27
12. Simmer JP, Fincham AG. Molecular mechanisms of dental enamel formation. *Crit Rev Oral Biol Med* 1995; 6(2): 84-108.

13. Deakins M, Volker J. Amount of organic matter in enamel from several types of human teeth. *J Dent Res* 1941; 20(2): 117-121.
14. Simmer JP, Hu JC. Dental enamel formation and its impact on clinical dentistry. *J Dent Educ* 2001; 65(9): 896-905.
15. Reith EJ, Boyde A. The enamel organ, a control gate for calcium influx into the enamel. *J Dent Res* 1979 Mar; 58(Spec Issue B): 980.
16. Young RA. Biological apatite vs hydroxyapatite at the atomic level. *Clin Orthop Relat Res* 1975; (113): 249-262.
17. Termine JD, Belcourt AB, Christner PJ, Conn KM, Nylen MU. Properties of dissociatively extracted fetal tooth matrix proteins. I. Principal molecular species in developing bovine enamel. *J Biol Chem* 1980; 255(20): 9760-9768.
18. Moradian-Oldak J. Protein-mediated enamel mineralization. *Front Biosci* 2012; 17: 1996-2023
19. Beniash E, Simmer JP, Margolis HC. The effect of recombinant mouse amelogenins on the formation and organization of hydroxyapatite crystals in vitro. *J Struct Biol* 2005; 149(2): 182-190.
20. Fukumoto S, Kiba T, Hall B, Iehara N, Nakamura T, Longenecker G et al. Ameloblastin is a cell adhesion molecule required for maintaining the differentiation state of ameloblasts. *J Cell Biol* 2004; 167(5): 973-983.
21. Caterina JJ, Skobe Z, Shi J, Ding Y, Simmer JP, Birkedal-Hansen H et al. Enamelysin (matrix metalloproteinase 20)-deficient mice display an amelogenesis imperfecta phenotype. *J Biol Chem* 2002; 277(51): 49598-49604.
22. Ryu O, Hu JC, Yamakoshi Y, Villemain JL, Cao X, Zhang C et al. Porcine kallikrein-4 activation, glycosylation, activity, and expression in prokaryotic and eukaryotic hosts. *Eur J Oral Sci* 2002; 110(5): 358-365.
23. Moradian-Oldak J, Leung W, Simmer JP, Zeichner-David M, Fincham AG. Identification of a novel proteinase (ameloprotease-I) responsible for the complete degradation of amelogenin during enamel maturation. *Biochem J* 1996; 318 (Pt 3): 1015-1021.
24. DenBesten PK, Crenshaw MA. The effects of chronic high fluoride levels on forming enamel in the rat. *Arch Oral Biol* 1984; 29: 675-679.
25. DenBesten PK. Effects of fluoride on protein secretion and removal during enamel development in the rat. *J Dent Res* 1986; 65: 1272-1277.
26. DenBesten PK, Crenshaw MA, Wilson MH. Changes in the fluoride-induced modulation of maturation stage ameloblasts of rats. *J Dent Res* 1985; 64: 1365-1370.
27. Yan Q, Zhang Y, Li W, Denbesten PK. Micromolar fluoride alters ameloblast lineage cells in vitro. *J Dent Res* 2007; 86: 336-340.
28. Riksen EA, Kalvik A, Brookes S, Hynne A, Snead ML, Lyngstadaas SP, Reseland JE. Fluoride reduces the expression of enamel proteins and cytokines in an ameloblast-derived cell line. *Arch Oral Biol* 2011; 56(4): 324-330.
29. Chen LS, Couwenhoven RI, Hsu D, Luo W, Snead ML. Maintenance of amelogenin gene expression by transformed epithelial cells of mouse enamel organ. *Arch Oral Biol* 1992; 37(10): 771-778.
30. DenBesten PK, Machule D, Zhang Y, Yan Q, Li W. Characterization of human primary enamel organ epithelial cells in vitro. *Arch Oral Biol* 2005; 50(8): 689-694.
31. Angmar-Månsson B, Whitford GM. Plasma fluoride levels and enamel fluorosis in the rat. *Caries Res* 1982; 16(4): 334-339.
32. Everett ET, McHenry MA, Reynolds N, Eggertsson H, Sullivan J, Kantmann C et al. Dental fluorosis: variability among different inbred mouse strains. *J Dent Res* 2002; 81(11): 794-798.
33. Bronckers AL, Jansen LL, Wöltgens JH. Long-term (8 days) effects of exposure to low concentrations of fluoride on enamel formation in hamster tooth-germs in organ culture in vitro. *Arch Oral Biol* 1984; 29(10): 811-819.
34. Susheela AK, Bhatnagar M. Fluoride toxicity: a biochemical and scanning electron microscopic study of enamel surface of rabbit teeth. *Arch Toxicol* 1993; 67(8): 573-579.
35. Andersen L, Richards A, Care AD, Andersen HM, Kragstrup J, Fejerskov O. Parathyroid glands, calcium, and vitamin D in experimental fluorosis in pigs. *Calcif Tissue Int* 1986; 38(4): 222-226.
36. Milhaud GE, Charles E, Loubière ML, Kolf-Claw M, Joubert C. Effects of fluoride on secretory and postsecretory phases of enamel formation in sheep molars. *Am J Vet Res* 1992; 53(7): 1241-1247.
37. Bronckers AL, Lyaruu DM, DenBesten PK. The impact of fluoride on ameloblasts and the mechanisms of enamel fluorosis. *J Dent Res* 2009; 88(10): 877-893.

38. Martínez-Mier EA, Soto-Rojas AE, Ureña-Cirett JL, Stookey GK, Dunipace AJ. Fluoride intake from foods, beverages and dentifrice by children in Mexico. *Community Dent Oral Epidemiol* 2003; 31(3): 221-230.
39. Kierdorf H, Kierdorf U. Disturbances of the secretory stage of amelogenesis in fluorosed deer teeth: a scanning electron-microscopic study. *Cell Tissue Res* 1997; 289: 125-135.
40. Matsuo S, Inai T, Kurisu K, Kiyomiya K, Kurebe M. Influence of fluoride on secretory pathway of the secretory ameloblast in rat incisor tooth germs exposed to sodium fluoride. *Arch Toxicol* 1996; 70: 420-429.
41. Bronckers AL, Lyaruu DM, Bervoets TJ, Woltgens JH. Fluoride enhances intracellular degradation of amelogenins during secretory phase of amelogenesis of hamster teeth in organ culture. *Connect Tissue Res* 2002; 43: 456-465.
42. Monsour P, Harbrow J, Warshawsky H. Effects of acute doses of sodium fluoride on the morphology and the detectable calcium associated with secretory ameloblasts in rat incisors. *J Histchem Cytochem* 1989; 37: 463-471
43. Denbesten P, Li W. Chronic fluoride toxicity: dental fluorosis. *Monogr Oral Sci* 2011; 22: 81-96.
44. Zheng L, Zhang Y, He P, Kim J, Schneider R, Bronckers AL et al. NBCe1 in mouse and human ameloblasts may be indirectly regulated by fluoride. *J Dent Res* 2011; 90: 782-787.
45. Sasaki S, Takagi T, Suzuki M. Cyclical changes in pH in bovine developing enamel as sequential bands. *Arch Oral Biol* 1991; 36: 227-231.
46. Zhang Y, Yan Q, Li W, DenBesten PK. Fluoride down-regulates the expression of matrix metalloproteinase-20 in human fetal tooth ameloblast-lineage cells in vitro. *Eur J Oral Sci* 2006; 114(Suppl 1): 105-110.
47. Zhang Y, Li W, Chi HS, Chen J, Denbesten PK. JNK/c-Jun signaling pathway mediates the fluoride-induced down-regulation of MMP-20 in vitro. *Matrix Biol* 2007; 26(8): 633-641.
48. Riksen EA, Kalvik A, Brookes S, Hynne A, Snead ML, Lyngstadaas SP et al. Fluoride reduces the expression of enamel proteins and cytokines in an ameloblast-derived cell line. *Arch Oral Biol* 2011; 56(4): 324-330.
49. Sierant ML, Bartlett JD. A Potential Mechanism for the Development of Dental Fluorosis. *Interface Oral Health Science* 2011 2012: 408-412.
50. Kubota K, Lee DH, Tsuchiya M, Young CS, Everett ET, Martinez-Mier EA et al. Fluoride induces endoplasmic reticulum stress in ameloblasts responsible for dental enamel formation. *J Biol Chem* 2005; 280(24): 23194-23202.
51. Sharma R, Tsuchiya M, Skobe Z, Tannous BA, Bartlett JD. The acid test of fluoride: how pH modulates toxicity. *PLoS One* 2010; 5(5): e10895.
52. DenBesten PK, Yan Y, Featherstone JD, Hilton JF, Smith CE, Li W. Effects of fluoride on rat dental enamel matrix proteinases. *Arch Oral Biol* 2002; 47(11): 763-770.
53. Lyaruu DM, Medina JF, Sarvide S, Bervoets TJ, Everts V, Denbesten P et al. Barrier Formation: A Potential Molecular Mechanism of Enamel Fluorosis *J Dent Res* 2014; 93: 96-102.
54. Gerlach RF, de Souza AP, Cury JA, Line SR. Fluoride effect on the activity of enamel matrix proteinases in vitro. *Eur J Oral Sci* 2000; 108(1): 48-53.
55. Tye CE, Antone JV, Bartlett JD. Fluoride does not inhibit enamel protease activity. *J Dent Res* 2011; 90: 489-494.
56. Tanimoto K, Le T, Zhu L, Chen J, Featherstone JD, Li W et al. Effects of fluoride on the interactions between amelogenin and apatite crystals. *J Dent Res* 2008; 87: 39-44.
57. DenBesten PK, Zhu L, Li W, Tanimoto K, Liu H, Witkowska HE. Fluoride incorporation into apatite crystals delays amelogenin hydrolysis. *Eur J Oral Sci* 2011; 119 Suppl 1: 3-7.
58. Wright JT, Chen SC, Hall KI, Yamauchi M, Bawden JW. Protein characterization of fluorosed human enamel. *J Dent Res* 1996; 75(12): 1936-1941.
59. Eastoe J, Fejerskov O. Composition of mature enamel proteins from fluorosed teeth. In: *Tooth Enamel IV*. Amsterdam: Elsevier 1984; 326-330.
60. Castiblanco GA, Rutishauser D, Ilag LL, Martignon S, Castellanos JE, Mejia W. Identification of proteins from human permanent erupted enamel. *Eur J Oral Sci* 2015 Dec; 123(6): 390-395
61. Castiblanco GA, Ilag LL, Castellanos JE, Martignon S, Mejía W. Protein characterization of sound and fluorosed enamel. *J Dent Res* 2014; 93(Spec Iss B): 671.