

FORMULÁRIO DE INSCRIÇÃO, APRESENTAÇÃO DE RESUMO E TRABALHO COMPLETO

Universidade:	Universidad Nacional de Cordoba
Faculdade/Centro/Instituto:	Facultad de Odontología
Autor/es:	Interlandi V*, Fontanetti P, Delgado A, Ponce R, Gallará R, Centeno V.
Título do trabalho:	LA EXPOSICIÓN CRÓNICA A FLUORURO EN EL AGUA DE BEBIDA DE RATAS GESTANTES ALTERA LA MODELACIÓN ÓSEA MANDIBULAR DURANTE LA ETAPA PRE-ERUPTIVA
Núcleo Disciplinario / Comitê Acadêmico / Outros temas:	Química/ Aguas
Email:	victoriainterlandi@hotmail.com
Palavras claves (Máximo 3):	FLUOROSIS- ERUPCIÓN DENTAL- GESTACIÓN
Tem interesse em fazer apresentação oral do seu trabalho? (X)SIM ()NAO	
*Esta preferência está sujeita a alteração em função da disponibilidade.	

Introdução

El agua de bebida representa la principal fuente de consumo humano de fluoruro (F⁻)¹. El pasaje del F⁻ al feto en desarrollo durante el periodo de gestación es controvertido. Se conoce que el F⁻ produce diferentes efectos físico-químicos y biológicos sobre las células del tejido óseo². Sin embargo, es poca la información relacionada a los efectos producidos por la exposición crónica a F⁻ durante el periodo fetal y postnatal temprano sobre las propiedades del hueso mandibular y la erupción dental.

Objetivos

Analizar el efecto de la exposición materna a fluoruro de sodio (NaF) sobre la modelación temprana de la mandíbula de crías y su relación con el grado de erupción dentaria.

Material e Métodos

Se emplearon crías de 3, 10 y 15 días de edad provenientes de dos grupos de madres: 1) Controles (0,3 mg/L NaF) y 2) Tratadas (50 mg/L NaF). El tratamiento se realizó durante 30 días previos al apareamiento, el periodo de gestación y lactancia. Se determinó la cantidad de fluoruro (F⁻) en el contenido gástrico y en las mandíbulas de las crías empleando un electrodo de ion selectivo. Secciones de las mandíbulas fueron procesadas histológicamente para obtener cortes en sentido buco-lingual a la altura del primer molar los que se colorearon con H&E. Sobre microfotografías digitalizadas se analizaron los siguientes parámetros histomorfométricos con el software Image Pro Plus: a los 3 y 10 días de edad se evaluó el volumen óseo [BV/TV (%)] del hueso supracoronal de la canastilla y el número de osteoclastos [N.Oc/mm²]. En los cortes de 10 y 15 días se determinó [BV/TV (%)] trabecular, número de trabéculas [Tb.N (1/mm)] y grado de erupción dentaria [TE (um)]. Los resultados fueron analizados con el test t de Student considerando diferencias significativas a p<0,05.

Resultados e Discussão

El F⁻ en el contenido gástrico fue mayor en las crías de 15 días provenientes de madres tratadas respecto a las del grupo control; lo mismo se observó en el contenido de F⁻ de las mandíbulas. El [BV/TV (%)] de la canastilla fue mayor en las crías de madres tratadas a los 3 y 10 días de edad (51.59 ± 2.13 vs 35.98 ± 1.04, 3 días; 48.11 ± 2.88 vs. 39.09 ± 1.12, 10 días; p<0,05), eso se correlacionó con un menor [N.Oc/mm²] (0.1476 ± 0.02 vs 0.2424 ± 0.02. p<0.005). Por otro lado el [BV/TV (%)] trabecular mostró un aumento en el grupo tratado respecto a su control a las dos edades estudiadas (37.69 ± 1.40 vs 31.78 ± 1.26, 10 días; 34.91 ± 0.71 vs 28.81 ± 1.26, 15 días; p<0.002); no se observaron cambios en el [Tb.N (1/mm)]. El TE (um), fue menor en las crías del grupo tratado en comparación a las del grupo control (p<0.05)(Fig. 1).

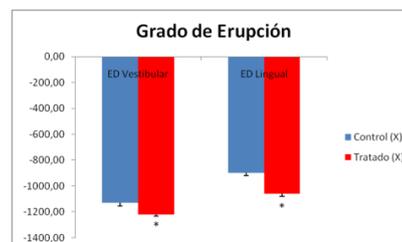


Fig. 1- Grado de erupción del primer molar mandibular en crías de 15 días de edad nacidas de madres expuestas a NaF en el agua de bebida durante la gestación y lactancia.

Conclusões

La ingesta crónica de agua con elevados niveles de F⁻ durante el periodo de gestación y lactancia produce un efecto disruptivo en los procesos de formación/resorción ósea que ocurren durante el desarrollo temprano del hueso mandibular provocando un retraso en la erupción dental. Además éste estudio confirma el pasaje materno-fetal de F⁻ a través de la leche materna.

Agradecimentos

Este trabajo fue subsidiado por SECYT-UNC.

¹ Nielsen FH. *Gastroenterology* (2009) 137: S55-60.

² Chachra D., Turner CH., Dunipace A., et al. *Calcif Tissue Int.* (1999);

FORMULARIO DE INSCRIPCIÓN, APRESENTACIÓN DE RESUMO E TRABAJO COMPLETO

Universidad:	Universidad Nacional de Cordoba
Faculdade/Centro/Instituto:	Facultad de Odontología
Autor/es:	Interlandi V*, Fontanetti P, Delgado A, Ponce R, Gallará R, Centeno V.
Título do trabalho:	LA EXPOSICIÓN CRÓNICA A FLUORURO EN EL AGUA DE BEBIDA DE RATAS GESTANTES ALTERA LA MODELACIÓN ÓSEA MANDIBULAR DURANTE LA ETAPA PRE-ERUPTIVA
Núcleo Disciplinario / Comitê Acadêmico / Outros temas:	Química/ Aguas
Email:	victoriainterlandi@hotmail.com
Palabras claves (Máximo 3):	FLUOROSIS- ERUPCIÓN DENTAL- GESTACIÓN
Tem interessem em fazer apresentação oral do seu trabalho? (X)SIM ()NÃO	
*Esta preferência está sujeita a alteração em função da disponibilidade.	

Introdução

El fluoruro (F^-) tiene propiedades de gran interés por su acción remineralizante y antibacteriana relacionadas, en el campo de la odontología, con la prevención de la caries dental. Si bien la principal fuente de consumo humano de F^- es el agua de bebida, también puede ser incorporado a través de alimentos y suplementos fluorados (Nielsen y col., 2009, Chattopadhyay A, 2011). Cuando su concentración en agua de bebida supera 1ppm (1mg/l) aparece un cuadro clínico denominado **fluorosis** caracterizada por la alteración en la formación de los tejidos dentales y óseos (Nielsen F., 2009); sin embargo, el/los mecanismos subyacentes al efecto desencadenado por el F^- en estos tejidos no están completamente dilucidados. El pasaje del F^- al feto en desarrollo durante el periodo de gestación es controvertido. Algunos estudios postularon que el F^- es incapaz de atravesar la barrera placentaria (Messer y col., 1974), mientras que otros demostraron aumento de la fluoremia en los neonatos de un grupo de embarazadas jóvenes ingiriendo agua con diferentes dosis de fluoruro de sodio (NaF) (Brambilla y col., 1994). El embarazo y la lactancia son periodos de alta vulnerabilidad para el metabolismo óseo materno y del feto en desarrollo. Es poca la información relacionada a los efectos producidos por la exposición crónica a F^- durante el periodo fetal y postnatal temprano sobre las propiedades del hueso mandibular y la erupción dental. En trabajos previos de nuestro laboratorio, demostramos que la ingesta de NaF durante la lactancia afecta parámetros de crecimiento mandibular de crías de 21 días de edad postnatal, como el área, la cual aumenta en comparación con el grupo control (Interlandi y col., 2014). Por otro lado, otros estudios demostraron que estímulos prenatales adversos tales como el estrés materno durante la gestación son capaces de afectar la erupción dentaria del primer molar mandibular (Fontanetti y col., 2013). La erupción dentaria es un proceso finamente regulado y programado espacial y temporalmente que comienza durante la gestación

y que continúa posteriormente durante la vida postnatal. Una etapa celular crítica en la erupción dentaria es la formación de los osteoclastos necesarios para resorber el hueso supracoronal de la canastilla ósea y formar un canal de erupción. Diversos estudios demostraron que en diferentes estados en los cuales hay una falla en la formación o la función de los osteoclastos está disminuida, la erupción dentaria está retardada o en algunos casos, completamente inhibida (Wise y col., 2002). No hay datos concluyentes acerca del efecto del F^- sobre los osteoclastos y la osteoclastogénesis ni tampoco se ha descrito el posible efecto del exceso de F^- sobre el proceso eruptivo.

Objetivos

El objetivo del presente trabajo fue analizar el efecto de la exposición materna a elevadas concentraciones de fluoruro de sodio (NaF) en el agua de bebida sobre la modelación temprana de la mandíbula de crías que acompañan el proceso de erupción dentaria.

Material e Métodos

Animales de experimentación y tratamiento con fluoruro en el agua de bebida: Se utilizaron ratas hembra Wistar mantenidas bajo un ciclo de luz-oscuridad (12: 12h), a 22 ± 2 °C y con disponibilidad permanente de agua y comida (dieta comercial). Las ratas hembras adultas (n=8) fueron divididas al azar en dos grupos experimentales que bebieron agua con diferentes concentraciones de NaF: a) Controles (0,3 mg/l) y b) Tratadas con F^- (50 mg/l). El tratamiento se realizó durante 1 mes y cumplido ese tiempo, las hembras fueron ubicadas con un macho para ser apareadas. Las hembras preñadas continuaron recibiendo el agua fluorada correspondiente a cada tratamiento hasta el momento del destete. Las crías de ambos grupos de madres se pesaron y sacrificaron por dislocación cervical a los 3, 10 y 15 días de vida postnatal. Las madres fueron anestesiadas con isoflurano y posteriormente sacrificadas por dislocación cervical. Se tomaron muestras de sangre por punción cardíaca, de orina por punción vesical, y se

extrajeron las mandíbulas completas de cada animal. El protocolo experimental fue aprobado por el Comité Institucional para el cuidado y uso de animales de laboratorio de la Secretaría de Ciencia y Técnica (Facultad de Ciencias Médicas y Odontología, UNC) Res CICUAL 3/12/2015.

0Determinación de la Concentración de la fluoruria: la concentración de fluoruro (F^- mg/l) se determinó mediante un electrodo de ión selectivo (Oakton). En orina se realizó en forma directa y en plasma indirectamente, luego de realizar una destilación isotérmica según Rigalli y col. La concentración de F^- en los tejidos mineralizados se realizó post-calcinación de las muestras a $600^\circ C$ durante 8 h posterior disolución de las cenizas en ácido fosfórico concentrado y destilación isotérmica durante 24 h.

Procesamiento histológico y coloración con Hematoxilina/Eosina (H/E) para análisis de histomorfometría estática: post eutanasia se extrajeron las mandíbulas completas de cada animal para su procesamiento histológico. El tejido fue sumergido en formol-PBS al 10% durante 48h y posteriormente descalcificado en solución de EDTA 10% durante 35 días. Después de la deshidratación, los tejidos se incluyeron en parafina y se obtuvieron cortes seriados en sentido bucolingual de $6\mu m$ de espesor que se colorearon con H&E. Se tomaron tomaron fotografías a diferentes aumentos de los preparados utilizando un microscopio (Leica M205A) con cámara fotográfica adaptada. Sobre las microfotografías digitalizadas se analizaron los siguientes parámetros histomorfométricos mediante el software Image Pro Plus 6.1: volumen óseo [BV/TV (%)], número de trabéculas [Tb.N (1/mm)], espesor trabecular [Tb. Th (μm)] y separación trabecular [Tb. Sp (μm)]. En cortes de crías de 3 y 10 días de edad, en la zona supracoronal de la canastilla ósea del primer molar mandibular, se evaluó (Fig. 1A): **volumen óseo [BV/TV(%)]** y **número de osteoclastos por área (N.Oc/mm²)**. En cortes de crías de 15 días de edad se midió (Fig. 1B): **grado de erupción dentaria [TE (μm)]** del primer molar mandibular. Para cada una de las variables estudiadas se calculó el valor medio y el error estándar.

Análisis estadístico: Los resultados se expresaron como media \pm EE. Los parámetros de BV/TV(%), Tb.N (1/mm), Tb. Th (μm) y Tb. Sp (μm) se analizaron mediante ANOVA y test de Bonferroni. Las diferencias se consideraron significativas a $p < 0,05$. Para el análisis estadístico de N.Oc/mm² y TE (μm) se utilizó el test "t" de Student. La diferencias se consideraron significativas a $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

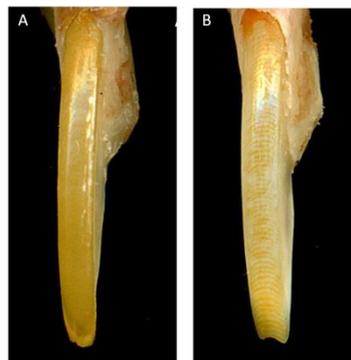


Figura. 1: Imágenes de incisivos inferiores de ratas madres controles (A) y tratadas (B) con 50 mg/L de NaF en el agua de bebida durante la etapa de pre-gestación, gestación y lactancia. Las imágenes obtenidas con escáner de alta resolución son representativas de 8 animales por grupo experimental.

En estas imágenes (Fig. 1), obtenidas con un escáner de alta resolución, se muestra el patrón fluorótico clásico en el incisivo superior de madres tratadas con 50 mg/L NaF (B) respecto a sus controles (A). Las hembras del grupo control presentaron un esmalte normal con la coloración típica de estos elementos dentales, mientras que las del grupo expuesto crónicamente a elevadas concentraciones de NaF en el agua de bebida mostraron el patrón característico de esmalte fluorótico con una sucesión de bandas pigmentadas y no pigmentadas que reflejan la alteración en la mineralización del esmalte.

El contenido gástrico de F^- en crías lactantes de 15 días de edad provenientes de madres expuestas a NaF en el agua de bebida, fue mayor respecto al observado en las crías del grupo control ($p < 0,05$) (Fig. 2), este resultado nos permite inferir que el ión ingresa al organismo a través de la leche materna durante el período de lactancia. Por otro lado, la determinación de la cantidad de F^- depositado en las mandíbulas de crías de 10 y 15 días de edad provenientes del grupo tratado, mostró un aumento que no fue significativo estadísticamente respecto a su control, sugiriendo que la dosis de F^- y/o el tiempo de exposición no produjeron un depósito mayor en el grupo proveniente de madres tratadas.

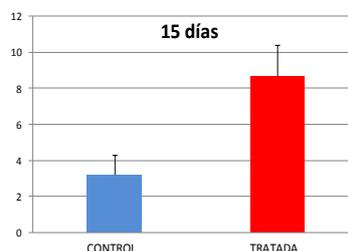


Figura 2: F^- en contenido gástrico de crías controles (0,3mg NaF/L) y tratadas (50 mg NaF/L) de 15 días de edad. Los valores representan la media \pm ES.

El porcentaje de volumen óseo de la canastilla a las dos edades estudiadas (3 y 10 días) fue mayor en las crías de madres expuestas a elevadas concentraciones de NaF durante la gestación y lactancia en comparación con el grupo control (51.59 ± 2.13 vs. 35.98 ± 1.04 ; 3 días; 48.11 ± 2.88 vs. 39.09 ± 1.12 , 10 días $p < 0,05$) (Fig. 3A). En concordancia con este resultado, el número de osteoclastos por mm² en el hueso supracoronal de la canastilla fue menor en las crías del grupo tratado con F^- en comparación con sus respectivos controles (0.047 ± 0.02 vs. 0.242 ± 0.02 ; $p < 0,01$)

(Fig. 3B y 3D). Estos resultados se correlacionan con la disminución en el grado de erupción del primer molar mandibular de crías de madres tratadas, determinado a los 15 días de edad, tanto por lingual (-1061.84 ± 17.01 vs. -899.06 ± 21.43 ; $p < 0.01$) como por vestibular ($-1219,75 \pm 14,93$ vs. $-1131,87 \pm 23,03$; $p < 0.05$) (Fig. 3C).

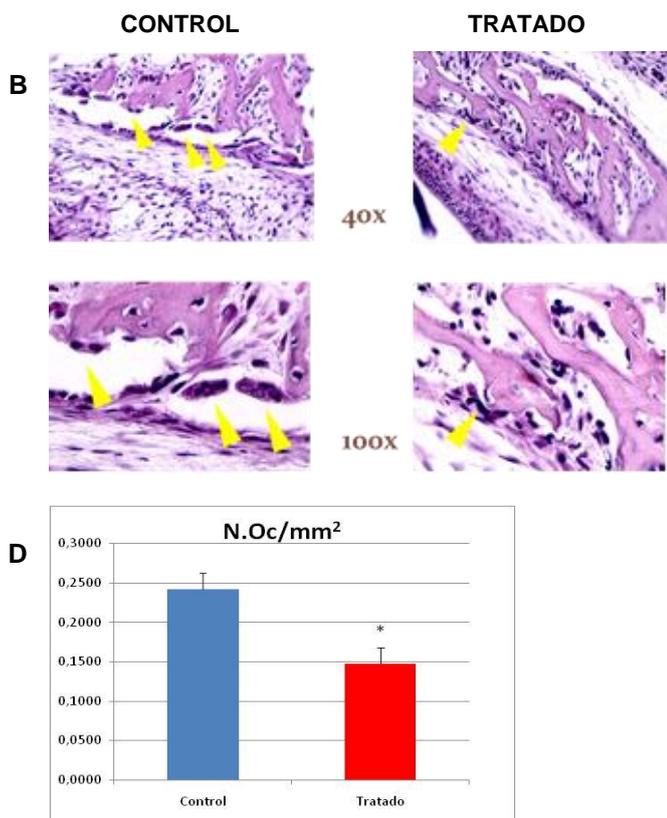
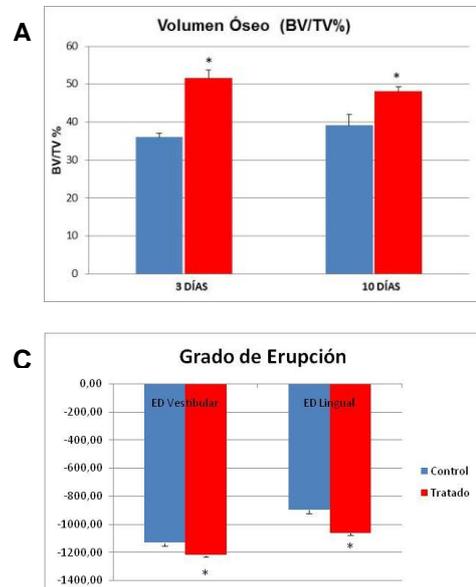


Figura 3: A: Volumen óseo (% de BV/TV) supracoronal del primer molar mandibular de ratas controladas y tratadas con 50 mg/L de NaF de 3 y 10 días de edad. B y D: Número de osteoclastos de la misma región mandibular (N.Oc/mm²) de ratas controladas y tratadas con 50 mg/L de NaF de 10 días de edad. C: Grado de erupción dentaria en mm medido en mandíbulas de ratas controladas y tratadas de 15 días de edad. * $p < 0.05$ Test "t" de Student.

El porcentaje de volumen óseo trabecular de crías expuestas a NaF a través de sus madres, fue mayor que el observado en los controles (Fig. 4) en ambas edades estudiadas [38.96 ± 1.39 vs 31.78 ± 1.26 , 10 días ($p < 0.01$); 34.67 ± 0.70 vs 28.00 ± 1.26 , 15 días ($p < 0.01$)]. No se observaron cambios en el número de trabéculas por el tratamiento.

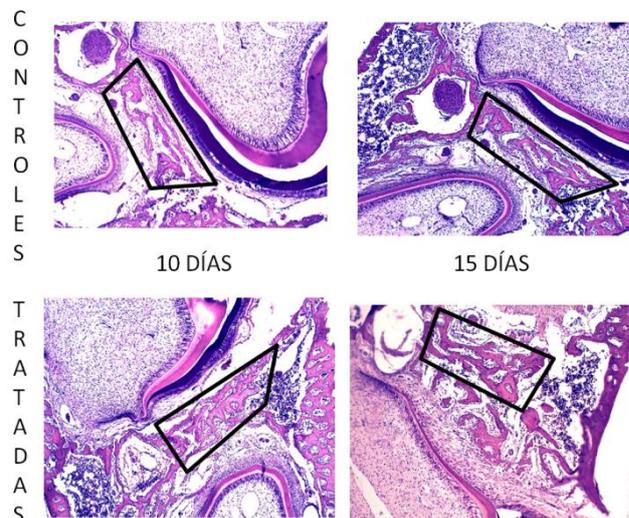


Figura 4 : Volumen óseo [BV/TV (%)] de hueso trabecular de mandíbula de crías de 10 y 15 días de edad.

conclusões

En este trabajo se evaluó la exposición materna a F⁻ sobre parámetros de modelado óseo asociados al proceso eruptivo de crías. Los resultados obtenidos nos permiten confirmar el pasaje de F⁻ desde las madres hacia las crías, lo que ocurriría principalmente durante el periodo de lactancia evidenciado por el contenido de F⁻ en el contenido gástrico de las crías 15 días provenientes de madres tratadas con NaF respecto a las del grupo control. La disminución en el número de osteoclastos por área en la zona supracoronal de la canastilla ósea de crías de 10 días de edad nacidas de madres tratadas, se correlacionó con el aumento de volumen óseo medido en la misma zona a los 3 y 10 días de edad. Estos datos permiten inferir que la actividad resortiva en la zona de formación del canal eruptivo se encuentra disminuida por el tratamiento con F⁻. Además, las crías de 10 días provenientes de madres expuestas a NaF mostraron aumento del volumen del hueso trabecular (por debajo de los esbozos radiculares) sin observarse cambios en el número de trabéculas. Consecuentemente, la disminución del grado de erupción dentaria medida a los 15 días de edad, podría interpretarse como el resultado de un retardo en la formación del canal eruptivo lo cual retrasaría la aparición del elemento dentario en la cavidad bucal. Estos hallazgos están en concordancia con los de otros autores que demostraron retardo o inhibición de la erupción dentaria en diferentes estados patológicos (Fontanetti y col., 2013), eventos asociados también a disminución de la formación y/o cantidad de osteoclastos en la zona supracoronal y aumento en

la formación de hueso trabecular de la mandíbula. En conclusión, el aumento de volumen óseo y el menor número de osteoclastos observado en crías de madres tratadas se interpreta como un efecto disruptivo producido por la exposición materna a NaF sobre el proceso de modelación ósea en las crías, que se traduce en una disminución del grado de erupción.

Agradecimientos

Este trabajo fue subsidiado por SECYT-UNC.

Brambilla E, Belluomo G, Buscaglia M, Strohmenger L. Arch Oral Biol. (1994) 39:991-4.
Chattopadhyay A., Podder S., Agarwal S., Bhattacharya S. Arch. Toxicol. (2011) 85:327-335.
Fontanetti PA, De Lucca RC, Mandalunis PM, Vermouth NT. Arch Oral Biol (2013)1643-51.
Interlandi, V; Fontanetti, P; Ponce, R.H; Bojanich, A; Tirao, G; Gallará, R. V; Centeno, V. (2014).
Messer H., Armstrong W., Singer L (1974). J Dent Res 53: 145-146.
Nielsen FH. Gastroenterology (2009) 137:S55-60.
Rigalli A., Pera L., Di Loreto, V., Brun L. (2009) Determinación de la concentración de flúor en muestras biológicas. Ed. UNR.
Wise GE, Frazier-Bowers S, D'Souza R Crit Rev Oral Biol Med (2002) 13: 323-34.