



Universidad  
Nacional  
de Córdoba



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA**

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**ESCUELA DE POSGRADO**

**“INFLUENCIA DE ESTÍMULOS PRENATALES ADVERSOS SOBRE  
EVENTOS RELACIONADOS CON EL MODELADO ÓSEO EN RATA:  
ERUPCIÓN DENTARIA Y OSIFICACIÓN ENDOCONDRALE.  
POSIBLE ROL PROTECTOR DE MELATONINA”**

TESISTA:

**OD. PABLO ALEJANDRO FONTANETTI**

DIRECTOR:

**PROF. DRA. NELIA T. VERMOUTH**

**CÓRDOBA, 2014**



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-  
NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).





**Universidad Nacional de Córdoba**

**Facultad de Odontología**

**Escuela de Posgrado**

Trabajo de tesis para optar al título de Doctor en  
Odontología

**Influencia de estímulos prenatales adversos sobre  
eventos relacionados con el modelado óseo en rata:  
Erupción dentaria y Osificación endocondral.  
Posible rol protector de Melatonina.**

**Tesista: Od. Fontanetti, Pablo Alejandro**

**Directora: Prof. Emérita Dra. Vermouth, Nelia T.**

**Codirectora: Prof. Dra. Mandalunis, Patricia M.**

**- 2014**

## **Comisión de Tesis:**

Prof. Dr. Aldo Eynard

Prof. Dra. Ana Finkelberg

Prof. Dra. Rosita Lucero

## **Jurado:**

Prof. Dr. Aldo Eynard

Prof. Dra. Ana Finkelberg

Prof. Emérita Dra. Ángela Ubios

*A mis Padres.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a mi directora y a mi codirectora de Tesis, Nelia Vermouth y Patricia Mandalunis, porque si bien era su función la de guiarme, enseñarme y prepararme en esta carrera, bien podrían no haberlo hecho con la pasión y el amor que me demostraron siempre, siendo mi apoyo especialmente cuando yo más flaqueaba.

A Nelia en especial, por su paciencia y su cariño desde que ingresé como ayudante a su cátedra y por su dedicación constante en formarme como docente, como investigador y como mejor persona. Hoy puedo ver el camino recorrido desde las primeras correcciones de abstracts presentados a congresos, hasta las correcciones de los artículos científicos y de este trabajo. Y puedo ver cómo en ese camino he crecido, he madurado y he avanzado. No podría haberlo hecho sin su ayuda, su saber, su rigurosidad, su espíritu crítico y sobretodo, su ejemplo.

A Patricia en especial, por su generosidad, por abrirme las puertas de su cátedra y su laboratorio y por entrenarme en la paciencia y rigurosidad del método científico y especialmente de las mediciones histomorfométricas. Su confianza en mí me ayudó a superar obstáculos y a creer en mis capacidades. Sus correcciones y exigencias no sólo perfeccionaron este trabajo sino que me demostraron su cariño y su dedicación para conmigo.

A la Dra. Nori Tolosa, por brindarme generosamente su laboratorio para poder realizar gran parte este trabajo. Gracias por confiar en mí y apoyarme en este largo camino que hoy concluye.

A las histotecnólogas Mariela Lacave, Ivana Sánchez y Carolina Acuña por esmerarse con tanta dedicación y esfuerzo para que los cortes y las coloraciones salieran cada vez mejor.

A María Silvia Cadile, Gerardo Theiler, Adriana Cismondi y Carla Cisternas, mis compañeros y amigos de Cátedra, por apoyarme, guiarme y aconsejarme siempre, cada uno a su manera. Gracias por generar un ambiente de trabajo tan lindo lo cual alivió sustancialmente este trabajo de tesis.

A Rubén Ponce, Raquel Gallará, Viviana Centeno, Eugenia Piñas, Andrea Delgado y Alejandra Bojanich, mis compañeros y amigos de laboratorio por acompañarme y aconsejarme siempre con alegría y entusiasmo.

A Natalia Escudero, porque siempre estuvo ahí con toda su experiencia, y en especial con una sonrisa para ayudarme con las mediciones y corregir mis errores. Después de todos estos años puedo decir con orgullo que hasta el día de hoy somos amigos.

A todos los docentes, ayudantes y no docentes la cátedra de Histología y Embriología de la Facultad de Odontología de la UBA, por recibirme con tanto cariño cada vez que fui. No sé si hubiera sido lo mismo sin la contención y el apoyo de ellos.

A todas las docentes y becarias de la Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNC por acompañarme, aconsejarme e interesarse siempre por mi trabajo.

A Luis Chroare, por su infinita paciencia en el procesamiento de las imágenes. Gracias por tu perfeccionismo y tu dedicación que han contribuido sustancialmente a la calidad de las publicaciones y de este trabajo.

A Daniel Bagué, por cuidar con tanta dedicación los animales de laboratorio y por tratar de que el bioterio mejore día a día.

A Carolina Caballero, mi profesora de Biología del secundario y hoy amiga, por sembrar en mí la inquietud de la búsqueda del conocimiento y la curiosidad por la ciencia.

A mi amigo Santiago, por su amistad incondicional y por las incontables horas frente a la computadora mejorando las imágenes y las presentaciones en Power Point durante todos estos años.

Gracias a la Facultad de Odontología de la UNC por contarme entre sus docentes y por acompañarme y confiar siempre en mí. Gracias también a la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la UNC por haberme otorgado una beca que me permitió dedicarme plenamente a este proyecto.

Finalmente y de manera muy especial, gracias a mis padres y mi familia por la paciencia que me tuvieron durante estos años y por su apoyo incondicional. Gracias por incentivar me a ir siempre hacia adelante sin miedo. Sin ustedes, no hubiera sido posible llegar hasta aquí.

## ÍNDICE

<u>ABREVIATURAS</u> .....	1
<u>RESUMEN</u> .....	3
<u>ABSTRACT</u> .....	6
<u>I. INTRODUCCIÓN</u> .....	9
<u>Capítulo I: Ambiente Prenatal</u> .....	10
<u>Programación Materna</u> .....	10
<u>Estrés Prenatal</u> .....	12
<u>Capítulo II: Tejido Óseo</u> .....	15
<u>Células</u> .....	15
<u>Modelado y Remodelado óseo</u> .....	19
<u>Sistema RANK-RANKL-OPG</u> .....	20
<u>Osificación Endocondral o Indirecta</u> .....	21
<u>Capítulo III: Erupción Dentaria</u> .....	26
<u>Odontogénesis</u> .....	26
<u>Teorías de la Erupción Dentaria</u> .....	28
<u>Mecanismo de la Erupción Dentaria</u> .....	30
<u>Rol de los Osteoclastos en la Erupción Dentaria</u> .....	32
<u>Capítulo IV: Melatonina</u> .....	33
<u><b>OBJETIVOS GENERALES:</b></u> .....	38
<u><b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS:</b></u> .....	38
<u>II. MATERIALES Y MÉTODOS</u> .....	<b>39</b>
<u>II.1- Animales</u> .....	40
<u>II.2- Grupos Experimentales</u> .....	40
<u>II.3- Determinación de la ingesta diaria materna durante la preñez</u> .....	44
<u>II.4- Obtención y procesamiento de las muestras de crías nacidas de madres de los grupos experimentales</u> .....	44

<u>II.4.1- Procesamiento histológico de las muestras</u> .....	44
<u>II.4.2- Procesamiento para el estudio radiográfico de las muestras</u> .....	47
<u>II.4.3- Obtención de fotografías de los cortes para el análisis histomorfométrico</u> .....	47
<u>II.5- Mediciones en crías de 3 días de vida</u> .....	48
<u>II.5.1 Mandíbula o maxilar inferior</u> .....	48
<u>II.5.2 Tibias</u> .....	52
<u>II.6 - Mediciones en crías de 15 días de vida</u> .....	54
<u>II.6.1 Mandíbula o maxilar inferior</u> .....	54
<u>II.6.2 Tibias</u> .....	58
<u>II.7 - Mediciones en crías de 60 días de vida</u> .....	61
<u>II.7.1- Crecimiento mandibular</u> .....	61
<u>II.7- Análisis Estadístico</u> .....	62
<b><u>III. RESULTADOS</u></b> .....	63
<u>Ingesta de alimento de las madres durante la preñez</u> .....	64
<u>Peso Corporal de las Crías</u> .....	64
<u>III.A-1 Crías de 3 días de vida</u> .....	66
<u>Volumen Óseo</u> .....	66
<u>Número de osteoclastos por área</u> .....	68
<u>Número de núcleos por osteoclasto</u> .....	70
<u>Superficie trabecular TRAP+</u> .....	72
<u>Número de osteoclastos TRAP+ y Número de osteoclastos TRAP-</u> .....	74
<u>Espesor de cartílago hipertrofiado</u> .....	77
<u>Volumen óseo subcondral</u> .....	78
<u>III.A-2 Crías de 15 días de vida</u> .....	80
<u>Grado de Erupción Dentaria [TED (mm)]</u> .....	80
<u>Espesor de cartílago hipertrofiado</u> .....	82

<u>Volumen óseo subcondral</u> .....	85
<u>III.A-3 Crías de 60 días de vida</u> .....	88
<u>Crecimiento mandibular</u> .....	88
<u>III-B. LUZ CONSTANTE + MELATONINA PRENATAL</u> .....	91
<u>Volumen óseo supracoronal</u> .....	91
<u>Número de Osteoclastos por área</u> .....	93
<u>Número de osteoclastos TRAP+ y TRAP-</u> .....	95
<u>Grado de Erupción dentaria a los 15 días</u> .....	97
<b><u>IV. DISCUSIÓN</u></b> .....	99
<b><u>CONCLUSIONES</u></b> .....	108
<b><u>REFERENCIAS</u></b> .....	110
<b><u>ANEXO I</u></b> .....	128
<u>Técnicas de Coloración</u> .....	128
<b><u>ANEXO II</u></b> .....	130
<u>Publicación de resultados de la presente Tesis Doctoral</u> .....	130



## **ABREVIATURAS**

11 $\beta$ -HSD: 11beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa

ACTH: hormona adrenocorticotropa

CSF-1: factor estimulante de colonias-1

CSF-GM: factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos

EGF: factor de crecimiento epidérmico

EV: estrés variado

GCs: glucocorticoides

H&E: hematoxilina-eosina

HPA: eje hipotálamo-pituitario-adrenal

IGF-1: factor de crecimiento insulínico

IL-1: interleuquina-1

IL-6: interleuquina-6

LAC: límite amelocementario

LDH: lactato deshidrogenasa

LL: luz constante

MCP-1: factor quimiotáctico de monocitos-1

MDH: malato deshidrogenasa

Mel: melatonina

MMPs : metaloproteinasas de matriz

NE: norepinefrina

NSQ: núcleo supraquiasmático

Ob: osteoblasto

Oc: osteoclasto

OPG: osteoprotegerina

PTH: parathormona

PTHrP: péptido relacionado a parathormona

RANK: receptor del activador del factor nuclear kappa- $\beta$

RANKL: ligando del receptor activador del factor nuclear kappa  $\beta$

REG: retículo endoplásmico granular

TGF: factor de crecimiento tumoral

TNF-  $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral-  $\alpha$

TRAP: fosfatasa ácida tartrato resistente

### **ABREVIATURAS ESPECÍFICAS EN HISTOMORFOMETRÍA ÓSEA (Parfitt y col., 1987)**

BV/TV (%): Volumen óseo.

HpZ.Th (mm): Espesor de cartílago hipertrofiado.

N.Nc/Oc: Número de núcleos por osteoclasto.

N.Oc TRAP-/mm<sup>2</sup>: Número de osteoclastos TRAP- por mm<sup>2</sup>.

N.Oc TRAP+/mm<sup>2</sup>: Número de osteoclastos TRAP+ por mm<sup>2</sup>.

N.Oc/mm<sup>2</sup>: Número de osteoclastos por mm<sup>2</sup>.

TED (mm): Grado de erupción dentaria en mm.

TRAP (+)/BS (%): Superficie trabecular TRAP+

## RESUMEN

En mamíferos, el comportamiento de órganos y tejidos presenta gran plasticidad prenatal, lo cual permite que diversos estímulos y/o condiciones ambientales que actúan sobre la madre y el feto durante el período de preñez, puedan fijar ciertas respuestas estructurales y funcionales de las crías durante su gestación, de modo tal de prepararlas óptimamente para las condiciones de vida postnatal. Este proceso es conocido como programación materna.

Hay evidencias de que el sistema circadiano fetal es sincronizado por señales transferidas por la madre durante la gestación. Este hecho determina un sistema circadiano susceptible a condiciones ambientales adversas que pudiera experimentar la madre durante la gestación y/o lactancia.

Los eventos ambientales prenatales adversos juegan un rol determinante en la patogénesis de diferentes enfermedades durante la vida adulta. Diferentes tipos de estrés durante períodos específicos de la gestación pueden resultar en cambios transitorios o permanentes a corto y/o largo plazo en el crecimiento y desarrollo de las crías.

El proceso de erupción dentaria es un evento finamente regulado y programado espacial y temporalmente, mediante el cual un elemento dentario se traslada desde su posición intraósea hasta aparecer finalmente en la cavidad bucal, en un lugar preciso de la arcada y en un período de tiempo determinado. Una etapa celular crítica en la erupción dentaria es la formación de los osteoclastos necesarios para reabsorber 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.

Es conocido que el hueso mandibular tiene un origen ectomesenquimático mientras que los huesos largos se originan del mesodermo lateral. Además, ambos tipos de hueso difieren en la composición de su matriz orgánica, en enzimas de degradación, en factores de crecimiento que utilizan para madurar y remodelarse y en la respuesta a diversos estímulos.

Aunque es aceptado que un ambiente prenatal adverso posee una compleja influencia sobre las crías, los efectos del estrés prenatal crónico sobre ciertos aspectos del modelado y remodelado óseo que tienen lugar durante la erupción dentaria y la osificación endocondral, no han sido estudiados.

Además, hay evidencias de que la melatonina exógena aplicada a ratas preñadas sometidas a luz constante es capaz de prevenir los efectos negativos del tratamiento estresante, observados sobre parámetros enzimáticos y conductuales. Sin embargo, hasta el momento no existen evidencias acerca del rol preventivo de melatonina sobre los efectos provocados por el estrés crónico prenatal sobre el proceso eruptivo.

Por lo expuesto, el objetivo del presente trabajo fue aportar evidencias acerca del efecto de dos modelos experimentales de estrés prenatal, luz constante (LL) y estrés variado (EV), sobre la erupción dentaria, la osificación endocondral y el crecimiento mandibular como así también evaluar el posible rol protector de melatonina sobre los efectos provocados por la luz constante.

Para ello se conformaron cinco grupos de ratas preñadas: Grupo EV sometido a estrés crónico variado desde el día 10 al 20 de preñez, Grupo LL mantenido en luz constante durante el mismo período gestacional, Grupo LL+Mel sometido al mismo esquema de estrés por luz constante crónica pero con administración subcutánea de Melatonina del día 17 al 21 de preñez, Grupo LL+SF sometido a luz constante crónica con inyección de solución fisiológica por vía subcutánea desde el día 17 al 21 de preñez y Grupo Control mantenido sin ningún tratamiento prenatal. A los 3, 15 ó 60 días de vida postnatal, se realizó la eutanasia de las crías. Previo al sacrificio se registró el peso corporal de las crías nacidas de cada grupo experimental. Luego, se escindieron sus mandíbulas y tibias para estudios histológicos, histoquímicos, histomorfométricos y radiográficos.

En el presente trabajo demostramos una asociación entre un ambiente prenatal adverso y ciertos aspectos del modelado y remodelado óseo en mandíbula y en la osificación endocondral de la tibia. La exposición materna a un ambiente prenatal desfavorable inducido por un modelo de **estrés variado o de luz constante** desde el día 10 al 20 de gestación, desencadenó en crías de 3 días de edad, un incremento del volumen óseo y una reducción del número de osteoclastos como de sus núcleos, en el

hueso supracoronal de la canastilla ósea del **primer molar inferior**. Este hallazgo se correspondió, a los 15 días de edad, con una disminución del **grado de erupción** dentaria, sugiriendo una disminución del proceso de resorción ósea. Además, a los 60 días de edad, el grado de **crecimiento mandibular** disminuyó significativamente en crías nacidas de madres sometidas a estrés por luz constante crónica respecto a crías controles.

Asimismo, en **tibias** de crías nacidas de madres estresadas se halló una alteración del proceso de osificación endocondral. Precisamente, a los 3 días de edad, se encontró una disminución significativa del volumen óseo subcondral en crías de los grupos tratados. A los 15 días, el análisis de la distribución del volumen óseo subcondral entre la esponjosa primaria y secundaria arrojó diferencias significativas, siendo mayor el volumen de la esponjosa primaria mientras que lo opuesto se observó a nivel de la esponjosa secundaria, respecto al control.

Por otra parte, es destacable el efecto del tratamiento materno de LL + Melatonina. La administración de la hormona entre los días 17 y 21 de gestación a madres preñadas estresadas, revirtió los efectos adversos provocados por la luz constante sobre el proceso eruptivo del primer molar inferior en todos los parámetros analizados en este estudio.

Nuestros resultados indicarían que los estímulos estresantes crónicos aplicados a ratas durante la preñez afectan la biología ósea, alterando en las crías la erupción dentaria, la osificación endocondral de las tibias y el crecimiento mandibular. Asimismo, estos hallazgos corroboran y enfatizan la posible acción protectora de la melatonina aplicada a las madres por su efecto preventivo del estrés crónico. Finalmente, nuestros resultados confirman la importancia de un contexto gestacional normal para una óptima programación materna de las crías.

## **ABSTRACT**

In mammals, physiological behavior of tissues and organs evidences prenatal plasticity. This determines that different stimuli and/or environmental factors acting on the mother and fetus during the period of pregnancy can establish certain functional and structural responses in pups during gestation in order to best prepare them for postnatal life environment. This process is known as prenatal maternal programming.

There is evidence that fetal circadian system is synchronized by signals transferred by the mother during gestation. Consequently, fetal circadian system is sensitive to adverse environmental conditions that the mother could experience during gestation or lactation.

Adverse prenatal environmental events play a determinant role in the pathogenesis of diverse diseases during adult life. Different kind of stress during specific periods of gestation can result in transient or permanent short- and long- term alterations in the pups growth and development.

Tooth eruption is a multifactorial tightly regulated process which starts prenatally and is a programmed and localized event. It involves the movement of a tooth from its position inside the osseous crypt into the oral cavity, where it appears in a specific position, at an appointed time. The maturation of osteoclasts and the regulation of resorption of the bone overlying the developing tooth, are critical events during the intraosseous phase of tooth eruption. Many studies demonstrated that in different pathologies in which there is a fail in osteoclast formation or function, tooth eruption is subsequently delayed or in some cases completely inhibited.

On the other hand, it is known that mandibular bone has an ectomesenchymatic origin while long bones originate from the lateral mesoderm. In addition, both types of bone differ in their matrix composition, enzymes degradation, growth factors to mature and remodel and the responses to different stimuli.

Even though it is recognized that a prenatal adverse environment has a complex influence on the pups, the effects of prenatal stress on bone modeling and remodeling during tooth eruption and endochondral ossification, are poorly known. Furthermore, there

is evidence that exogenous melatonin administered to pregnant mothers submitted to constant light can prevent negative effects of stressing treatment on enzymatic and behavioral parameters. However, there is no evidence regarding the preventing role of melatonin on the alterations induced by chronic prenatal stress on tooth eruption process.

The purpose of the present work was to provide evidence about the effect of two experimental models of chronic prenatal stress, constant light (LL) and varied stress (EV), on tooth eruption, endochondral ossification and mandibular growth as well also evaluate the possible protector role of melatonin on the effects caused by LL on tooth eruption.

To that purpose, five groups of pregnant rats were conformed: Group EV submitted to varied stress from day 10<sup>th</sup> to 20<sup>th</sup> of pregnancy, Group LL maintained in constant light during the same gestational period, Group LL+Mel submitted to the same constant light stress treatment and subcutaneously injected with melatonin from day 17<sup>th</sup> to 21<sup>st</sup> of pregnancy, Group LL+SF submitted to the stress model of LL, subcutaneously injected with physiological solution from day 17<sup>th</sup> to 21<sup>st</sup> of pregnancy and Control Group without treatment. Pups were euthanized at 3, 15 or 60 days old and their mandibles and tibiae were resected for histological, histochemical, histomorphometric and radiographic analyses.

In the present work we demonstrate an association between prenatal adverse environment and certain aspects of bone modeling in mandible and endochondral ossification in tibia. Maternal exposure to an unfavorable prenatal environment induced by a model of **varied stress or constant light** from day 10<sup>th</sup> to 20<sup>th</sup> of gestation, resulted in a significant increment of bone volume and a reduction of the number of osteoclasts and their nuclei in supracoronal bone of **first mandibular molar** of 3-day-old pups. This finding correlated with a significant decrease of **tooth eruption degree** at 15-day-old, which suggests a decline of bone resorption process. Furthermore, at 60-day-old, **mandibular growth** significantly decreased in pups born to mothers submitted to chronic constant light.

In addition, tibiae of pups born to stressed mothers showed an alteration in the process of endochondral ossification. Specifically, at 3-day-old, a significant decreased of subcondral bone volume was found in pups born to treated groups while at 15-day-old, subchondral bone volume distribution between primary and secondary spongiosa was

significantly different. Primary spongiosa bone volume was significantly superior while the opposite was found at the level of secondary spongiosa in prenatally stressed pups compared to the controls.

On the other hand, a remarkable finding is the effect of maternal LL treatment plus melatonin. The administration of this hormone between days 17<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> of gestation to stressed pregnant mothers reverted the adverse effect induced by constant light on the first mandibular molar eruption process in all parameters evaluated.

Collectively, these results suggest that chronic stressing stimuli applied to rats during pregnancy disturb bone biology and alter in the pups, tooth eruption, tibiae endochondral ossification and mandibular growth. In addition, these findings emphasize the possible protective effect of maternal melatonin administration against the adverse effects of chronic stress. Finally, our results confirm the importance of a healthy gestational environment for a optimal/ best maternal programming of the pups.



# ***I. INTRODUCCIÓN***

## **Capítulo I: Ambiente Prenatal**

### **Programación Materna**

Si bien es aceptado que el desarrollo prenatal en mamíferos transcurre bajo la instrucción y directriz de los genes del individuo, ha sido extensamente demostrado que el mismo es susceptible de sufrir influencias ambientales externas que recibe la madre y que determinan o incluso modifican, el curso del desarrollo. La teoría evolutiva acerca de que un mismo genotipo es capaz de producir distintos fenotipos según diferentes condiciones ambientales a los que el individuo está sometido desde su vida prenatal (plasticidad fenotípica) es ampliamente reconocida y su significancia es relevante en términos de supervivencia biológica (Gluckman y col., 2005). En la mayoría de los casos, el organismo en desarrollo responde a señales ambientales recibidas por la madre produciendo un fenotipo determinado y adaptativo (Boyce y col., 2005).

Varios autores demostraron la vinculación entre ciertos parámetros en crías sometidas a un ambiente fetal adverso, tales como menor tamaño y peso al nacer y un mayor riesgo de enfermedades en la adultez (Hales and Barker, 2001). Entre ellas se mencionan la enfermedad coronaria, resistencia a la insulina e hipertensión arterial (Barker et al, 1986; Hales y col., 1992; Osmond y col., 1993; Kensara y col., 2005; Vaag y col., 2012). Esta asociación ha sido denominada el “origen fetal de la enfermedad adulta” (Gluckman y col., 2005) dado que sugiere que ciertos eventos negativos sufridos por las crías durante el desarrollo prenatal alteran de manera irreversible ciertos aspectos del equilibrio homeostático que pueden manifestarse como una enfermedad o alteración, durante el desarrollo postnatal o en la vida adulta. El origen fetal de la salud o la enfermedad está íntimamente relacionado con los fundamentos de la plasticidad del desarrollo. Propone que las respuestas fetales o perinatales a diferentes señales enviadas por la madre acerca de su salud o del ambiente en que vive, se traducen en las crías en cambios en el metabolismo, secreción hormonal y sensibilidad selectiva a ciertas hormonas, todo lo cual puede modificar el crecimiento y desarrollo de algunos órganos conduciendo así a alteraciones persistentes en la fisiología y homeostasis metabólica (Gluckman y col., 2004).

Llegado a este punto, cabe destacar que algunos individuos son más susceptibles a experiencias negativas durante la preñez dado sus características biológicas, temperamentales y/o comportamentales mientras que otros son relativamente resilientes frente a las mismas (Pluess and Belsky, 2011). Este punto reviste particular relevancia en nuestro trabajo dado que hemos observado respuestas diferentes de madres preñadas frente a los efectos adversos del modelo de estrés crónico.

Es conocido además, que hay períodos críticos para la diferenciación y maduración de células y tejidos durante la organogénesis a lo largo de la gestación y la vida postnatal temprana (McMillen y col., 2005). Es por ello que es clave el momento de la gestación en que la madre sufre los estímulos estresantes.

En concordancia con esto, se sabe que los mamíferos están sincronizados con el fotoperíodo ambiental, el cual sincroniza a su vez el reloj circadiano principal situado en el núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo (Reppert y col., 1985). Este núcleo integra señales ambientales, generando ritmos circadianos sincronizados a las variaciones diarias. Este complejo proceso integra e interrelaciona tres sistemas fisiológicos: nervioso, inmune y endocrino, conduciendo la información ambiental del entorno por medio de neurotransmisores, citoquinas y hormonas (Maccari y col., 2003; Viltart y col., 2007). Esta información es transmitida por la madre al feto durante el desarrollo temprano generando así una óptima programación de la plasticidad de sus crías para la vida postnatal.

El ciclo diario de luz-oscuridad actúa como señal sincronizadora de los ritmos circadianos. Durante la gestación, los estímulos fóticos ambientales no alcanzan a los fetos. Sin embargo, crías de ratas expuestas desde el nacimiento a condiciones constantes de iluminación (por Ej. oscuridad constante) presentan ritmos circadianos sincronizados. Este hallazgo sugirió una sincronización fotoperiódica indirecta, a través de la información aportada por la madre, denominada sincronización o programación materna. Reppert y Schwartz (1983) confirmaron que durante el desarrollo existe un fenómeno de sincronización materna que permite a los fetos coordinar su marcapasos circadiano con el ciclo diario de luz-oscuridad prevalente, bastante antes de que lo puedan hacer por sí mismos (Vermouth y col., 1995). De este modo, los fetos no necesitan acceder de modo directo al fotoperíodo ya que esta información le es transferida por la madre. La sincronización del NSQ fetal involucra una comunicación unidireccional de señales circadianas entre la

madre y el feto (Reppert, 1995). En rata, la lesión del NSQ materno al día 7 de gestación, interrumpe los ritmos diarios de utilización de glucosa en el NSQ de los fetos (Reppert y Schwartz, 1986). Davis y Gorski (1988) obtuvieron resultados similares en hámster al medir ritmos de actividad locomotora individual a partir del destete en crías de madres con lesión del NSQ durante la gestación. En resumen, la lesión del NSQ de la madre no destruye la capacidad de oscilar del reloj circadiano fetal sino que impide la coordinación de los relojes de las crías dentro de una camada. Los ritmos endógenos desincronizados entre sí persisten en cada uno de los descendientes.

La melatonina, principal hormona secretada por la glándula pineal, presenta un ritmo característico en la circulación materna y es transferida al feto a través de la placenta y la leche materna (Klein, 1972; Reppert, 1982). En este contexto han sido probados diversos modelos experimentales en rata. Estudios previos de este laboratorio demostraron que la desnervación simpática de la glándula pineal materna en el día 10 de gestación interrumpe el ritmo circadiano de malato deshidrogenasa testicular en crías de ratas de 25 días de edad y el ritmo de comportamiento de bebida (Bellavía y col., 1996; Cisternas y col., 2010). Asimismo, la administración de melatonina entre los días 14 a 21 de gestación a madres desnervadas o pinealectomizadas restableció dichos ritmos (Bellavía y col., 2006).

### **Estrés Prenatal**

Si el ambiente prenatal se torna adverso tal como ocurre por ejemplo, por una función placentaria deficiente, infecciones maternas, desnutrición o cuando la madre se ve sometida a una situación de estrés durante la preñez, el riesgo de alteraciones postnatales en las crías es mayor. De esta forma, durante la vida fetal, la exposición materna a estrés crónico puede actuar como un factor disruptivo para el óptimo desarrollo de las crías, y generar alteraciones en el corto y largo plazo en la organización temporal de los procesos neuroendocrinos, bioquímicos, fisiológicos y comportamentales.

Gran parte de la información acerca de los efectos en seres humanos nacidos de madres sometidas a episodios crónicos de estrés han sido obtenidos de estudios observacionales retrospectivos. Esas situaciones estresantes pueden aparecer a partir de desastres naturales como terremotos o inundaciones, guerras, atentados

terroristas o por situaciones personales de tensión laboral o familiar. Estos estudios han asociado principalmente el estrés materno gestacional con un menor desarrollo intelectual (Brouwers y col., 2001) o con desordenes en la conducta como déficit de atención, ansiedad y depresión (Weinstock, 2001; Koenig y col., 2002; Maccari y col., 2003). Durante el bombardeo de Serbia en 1999, la población entera, incluida las mujeres embarazadas, estuvieron expuestas a un alto nivel de estrés. Los efectos físicos y psicológicos en los hijos de las madres estresadas fueron investigados por Zarkovic y col. (2003). Los autores hallaron bajo peso al nacer, disminución en el crecimiento en largo de los huesos y el diámetro cefálico como así también complicaciones obstétricas (nacimientos prematuros y preeclampsia). Si bien estos estudios observacionales en seres humanos permiten vislumbrar los efectos que una situación concreta y real de estrés prenatal puede causar sobre la descendencia, existen limitaciones en cuanto a ciertos factores influyentes tales como la comprensión profunda de los mecanismos asociados, período del embarazo más susceptible y magnitud de la sensibilidad personal al estímulo estresante. Además, en humanos es difícil dilucidar si los hijos sufren las consecuencias negativas a causa de la acción estresante prenatal o bien porque la madre continúa sometida a un ambiente adverso durante la crianza del hijo (Dancause y col., 2011).

Algunas de estas limitaciones son superadas mediante el uso de modelos animales experimentales. Éstos tienen la ventaja de que permiten controlar el inicio, la duración y la intensidad de la exposición al estrés y evaluar la interacción de la madre con sus crías en un ambiente totalmente controlado. Los modelos animales de estrés incluyen diversos protocolos de tratamiento, que varían no sólo en el tipo de estresores utilizados, sino en su forma de aplicación, duración, hora del día y período de preñez durante el cual se aplican. Por ejemplo, un modelo utilizado por D'Mello y Liu (2006) consistió en aplicar a las madres inmovilización diaria durante la primera, segunda o tercera semana de gestación. Este tipo de estresor, durante la gestación tardía, redujo el peso corporal de madres y fetos (Mairesse y col., 2007). Otros autores emplearon inmovilización acompañada con luz brillante entre los días 14 y 21 de gestación (Ward y Weisz, 1984). En otros trabajos, los animales fueron suspendidos por la cola (Alonso y col., 1991), apiñados en jaulas (Dahlof y col., 1978), o sometidos a shocks eléctricos (Takahashi y Kalin, 1991). También, se han utilizado modelos de estrés crónico prenatal variado e impredecible que consisten

en la aplicación de diferentes estresores tales como ruido, pinzamiento de cola, privación de alimento y/o bebida, agitación, inmovilización, choques eléctricos, etc, aplicados de diferentes maneras y en distintos períodos de la preñez (Katz y col., 1981; Fride y Weinstock, 1984; Pfister y Muir, 1992; Cabrera y col., 1999; Richardson y col., 2006; Bock y col., 2011). Otro modelo de estrés prenatal consiste en la aplicación de luz constante crónica durante la gestación (Vernikos-Danellis y col., 1970; Chiarenza y col., 1989; Ponce y col., 2001; Semenchenko y col., 2004, Alterman y col., 2012). Está comprobado en roedores, que la luz constante utilizada como un estímulo estresante crónico, desincroniza los ritmos de las neuronas del marcapasos principal, sin comprometer su habilidad rítmica individual (Otha y col., 2005). Además, se observó que la luz constante durante la gestación anula el ritmo de  $\alpha$ -amilasa en glándulas salivales como así también de lactato deshidrogenasa (LDH) y malato deshidrogenasa (MDH) en testículo de crías de 28 días de edad, posiblemente por desincronizar los osciladores de neuronas individuales que componen el marcapasos materno, lo cual alteraría la transferencia de la señal sincronizadora a las crías (Ponce y col., 2001).

En ratas, el estrés prenatal está asociado con la secreción de altas concentraciones de glucocorticoides (GCs) maternos por estimulación del eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA) (Maccari y col., 2003; Kapoor y col., 2006). El incremento en la cantidad de GCs maternos circulantes influyen marcadamente la programación materna (Seckl y col., 2004). Las concentraciones basales de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) y corticosterona en plasma de ratas nacidas de madres expuestas a estrés durante la gestación son elevadas (Weinstock y col., 1998; McCormick y col., 1995; Ward y col., 2000). La placenta forma una barrera bioquímica y estructural ante muchos de estos compuestos maternos. Bajo circunstancias normales, el pasaje de GCs de la madre al feto es bajo debido a la función de la enzima 11beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa ( $11\beta$ -HSD) de placenta que convierte la corticosterona en formas inactivas como la cortisona y la 11-cetocorticosterona (Burton y Waddell, 1999; Painter y col., 2012). Sin embargo, en situaciones de estrés materno y ante la elevada concentración plasmática de GCs, la actividad de la enzima se ve saturada lo cual resulta en un incremento en la concentración de GCs que traspasan la placenta y llegan al feto.

En resumen, el ambiente prenatal juega un rol preponderante en la programación de las crías por parte de la madre a través de mecanismos neuroinmunoendocrinos. Esto afectará de manera positiva o negativa la plasticidad de las crías generando respuestas adaptativas al entorno postnatal, del cual recibieron previamente la información a través de la madre.

## **Capítulo II: Tejido Óseo**

El tejido óseo de los mamíferos posee orígenes diferentes: mesodermo paraxil, mesodermo lateral y ectomesénquima. El esqueleto axial se origina en el mesodermo paraxil, el esqueleto apendicular se origina en el mesodermo lateral, mientras que los huesos de la cara se originan en el ectomesénquima derivado de las crestas neurales (Carlson 2007, Shearman 2009).

### **Células**

Los **osteoblastos (Obs)** derivan de células multipotenciales de origen mesenquimático. Es la célula encargada de la formación de la matriz extracelular del tejido óseo. Es por lo tanto una célula típicamente secretora a cargo de la formación del osteoide. El osteoide es la matriz ósea sin calcificar, y luego de su secreción el Ob se encarga de contribuir a su mineralización.

Al microscopio óptico, los Obs maduros son células grandes de forma cuboidea, de 20-30  $\mu\text{m}$  de diámetro mayor, con un núcleo ovalado desplazado a uno de sus extremos y citoplasma basófilo por su abundante retículo endoplásmico granular (REG). Con el microscopio electrónico muestran un notable REG, propio de las células que desarrollan una intensa síntesis proteica (Prieto y col., 2005). Los osteoblastos se disponen en monocapa sobre la superficie ósea y poseen uniones celulares con Obs adyacentes y con los osteocitos del interior del tejido contribuyendo a una óptima comunicación celular.

Los Obs son células secretoras metabólicamente activas que expresan proteínas como la osteocalcina, osteopontina, osteonectina y otros proteoglicanos y factores señalizadores solubles (Geneser, 2000). La expresión de estos productos por parte de los Obs ocurre durante la embriogénesis ósea y durante su remodelación y reparación.

Aunque los Obs estén polarizados hacia el hueso, la liberación de las proteínas de la matriz osteoide no se limita a su polo basal, sino que muchos de ellos van quedando envueltos en tal matriz, convirtiéndose en osteocitos incluidos en las lagunas que se forman en ella. Además de ese destino, los Obs pueden derivar a células de superficie, revestimiento o "*lining cells*". Tanto osteocitos como las células de revestimiento poseen receptores para parathormona (PTH) y expresan ARNm de actina- $\beta$ , factores de transcripción c-fos y c-jun, colágeno y proteínas no colágenas, así como el ARNm del factor de crecimiento insulínico (IGF-1) (Prieto y col., 1999).

Además de formar y calcificar el osteoide, los Obs poseen la función de estimular la osteoclastogénesis mediante la expresión y/o secreción de varios factores fundamentales tales como el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (CSF-GM) y el ligando del receptor activador del factor nuclear kappa  $\beta$  (RANKL) y otros como la interleuquina-1 (IL-1) e interleuquina-6 (IL-6) (Eynard y col., 2008; Gómez de Ferraris y Campos Muñoz, 2009).

Las **células de revestimiento** son las células originadas a partir de Obs que se hallan recubriendo al tejido óseo en las zonas de reposo, es decir aquellas zonas que no están siendo remodeladas. Cuando comienza un ciclo de remodelación son las que intervienen en el primer paso del proceso denominado "activación". Poseen un citoplasma bastante escaso y también escasas organelas. Mantienen uniones nexa entre células vecinas y también con los osteocitos, interviniendo en su mantenimiento y nutrición y además reciben los estímulos producto de la mecano-transducción (Bonewald 2002).

El **osteocito** es una célula madura diferenciada de linaje osteoblástico que no se divide ni secreta matriz, aunque su metabolismo es crucial para la viabilidad del hueso y para el mantenimiento de la homeostasis. Poseen forma estrellada con numerosas prolongaciones. Los osteocitos ocupan una pequeña laguna o cavidad dentro de la matriz que se denomina laguna osteocítica. Éstas están interconectadas entre sí a través de una red de canalículos formando lo que se conoce como sistema lacuno-canalicular que garantiza la vitalidad del hueso. En estos canalículos se localizan las proyecciones citoplasmáticas que permiten a los osteocitos interactuar entre sí y transmitir señales a los Obs y células de



revestimiento óseo como así también recibir señales de ellas (Anitua, 2000). Precisamente, un papel fisiológico primordial del osteocito es la de actuar como mecano transductor ya que es capaz de detectar estímulos mecánicos producidos por las cargas que soportan en su superficie y luego traducirlas y transmitir las a través de la síntesis de diferentes moléculas a las células de superficie, estimulando la formación o la resorción ósea durante el remodelado y modelado óseo (Bonewald, 2002).

El **osteoclasto (Oc)** es la célula con la responsabilidad primaria en la resorción ósea y aunque muchas preguntas permanecen sin respuesta, el desarrollo de modelos “*in vivo*” e “*in vitro*” como así también avances importantes en biología molecular y celular han proporcionado una nueva información de la biología del osteoclasto en condiciones normales y patológicas.

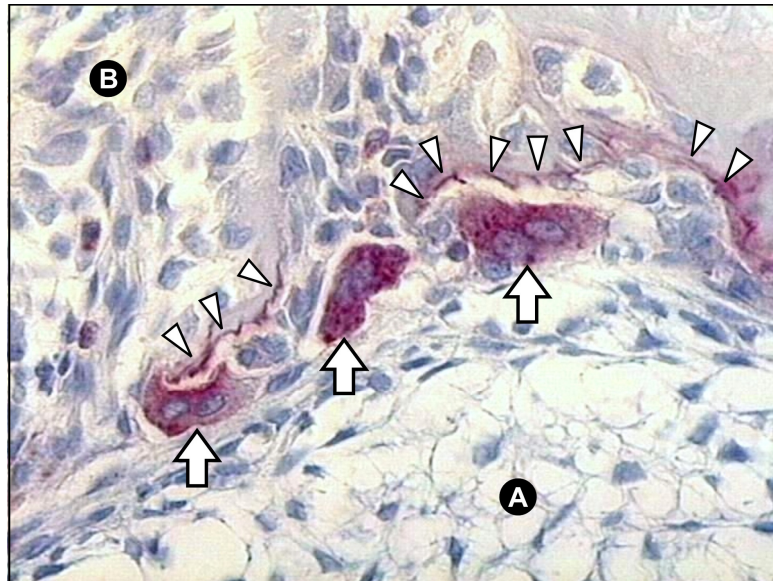
Los osteoclastos proceden de células progenitoras hematopoyéticas precursoras de monocitos y macrófagos. Estas células alcanzan el hueso desde la médula incluida en su seno, o desde la circulación. Las células precursoras de osteoclastos (pre-osteoclastos) y los osteoclastos expresan en su superficie el receptor (RANK) del activador del factor nuclear kappa- $\beta$  (RANKL) producido por los Obs, vía por la que, junto con citoquinas como las interleuquinas 1, 6 y 11, el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ), el interferon y el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), se diferencian y se activan (Takahashi y col., 1998).

Morfológicamente, son células multinucleadas, con citoplasma acidófilo de hasta 100  $\mu\text{m}$  de diámetro con una media de 8 a 12 núcleos, ricas en lisosomas y mitocondrias y, como los osteoblastos, son células polarizadas (Fig. I-1). El citoplasma del osteoclasto maduro y funcional es bastante heterogéneo pues presenta múltiples vacuolas producto de la actividad fagocítica de la célula y el tráfico transcelular de vesículas. Poseen aparato de Golgi y REG relativamente escasos tomando en cuenta el tamaño del osteoclasto maduro, de lo que se puede inferir que no sintetiza gran cantidad de proteínas de exportación una vez activo. La formación de un osteoclasto activo y funcional se produce por un estímulo local o sistémico que activa la remodelación ósea (Parfitt 2006). Previo al proceso de resorción, el osteoclasto recientemente diferenciado se acerca a la superficie ósea, se adhiere, adquiere las características de una célula polarizada y comienza la resorción ósea (Novack 2011). La adhesión del osteoclasto a la superficie ósea a

resorber se produce a partir de unas moléculas de la familia de las adhesinas llamadas integrinas dentro de las que se encuentra el receptor de la vitronectina (Nesbitt y col., 1993). Para la resorción ósea el osteoclasto se vale de proteasas del tipo anhidrasa carbónica, hidrolasas lisosomales de pH ácido, metaloproteinasas de matriz (MMPs) y catepsinas.

Recientemente se ha descrito que el Oc no tiene como única función la resorción ósea sino que participa además en la diferenciación de precursores de Obs y en el movimiento de “*stem cells*” hemopoyéticas desde la médula ósea hacia el torrente sanguíneo; participa en la respuesta inmune, segrega citoquinas que pueden afectar su propia función o la de otras células en el transcurso de la respuesta inflamatoria y en procesos neoplásicos que afectan al tejido óseo (Boyce 2007, Boyce 2009).

La detección de la fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP) es útil como marcador de estirpe osteoclástica (Fig. I-1). En la vía de diferenciación del Oc, a partir de pre-osteoclastos, todo el linaje posterior es TRAP positivo, incluso hasta en los últimos estadios de la apoptosis del Oc en la que ya ha cesado en su función.



**Fig I-1:** Microfotografía del hueso supracoronal de la canastilla ósea del primer molar mandibular de rata a los 3 días de edad. Coloración con la técnica histoquímica para detección de fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP). Se observan 3 osteoclastos multinucleados TRAP+ en actividad (flechas blancas). Nótese además y la marcación TRAP+ en las superficies de las trabéculas en reabsorción (cabezas de flechas). A: Reticulo Estrellado. B: Hueso Supracoronal. Coloración TRAP. Magnificación 400X.

## Modelado y Remodelado óseo

Las primeras descripciones de Frost (2001) acerca de cómo el hueso se recambia (*bone turnover*), han permitido a investigadores y clínicos clarificar un importante concepto de la biología ósea y comprender de manera más profunda, numerosos procesos y enfermedades óseas tales como osteoporosis, cicatrización ósea, enfermedades óseas genéticas y metabólicas y crecimiento y desarrollo esquelético.

El hueso puede sufrir modificaciones por medio por medio de dos mecanismos relacionados pero claramente diferentes denominados “modelado” (*bone modeling*) y remodelado (*bone remodeling*) óseo. El modelado óseo se caracteriza porque existe, o bien un proceso predominante de formación ósea o por el contrario, un proceso de resorción ósea, o bien se producen ambos procesos pero de manera desacoplada. Esto transcurre durante un período de tiempo determinado y en sitios precisos de la superficie ósea. El resultado del modelado óseo es un cambio en la forma del hueso y/o una traslocación de estructuras óseas. Los procesos de modelado óseo son prevalentes durante el crecimiento esquelético, donde los huesos se mueven en relación con los demás y a su vez cambian de forma y tamaño. El proceso de erupción dentaria puede ser considerado un ejemplo de modelado óseo dado que en la zona supracoronal de la canastilla ósea de los gérmenes dentarios debe producirse resorción ósea para formar la vía o canal de erupción. A su vez, en la zona basal de la canastilla, tiene lugar un proceso de formación ósea. Sin embargo, estos dos procesos son independientes y están desacoplados uno del otro. Por ejemplo, si uno de los procesos como la formación ósea basal, se bloquea por un impacto temporario del diente en erupción, la resorción ósea continúa en la zona supracoronal y la vía de erupción se forma normalmente (Cahill, 1969).

El remodelado óseo, en cambio, es un proceso cíclico que surge como respuesta a la necesidad continua de reparación y renovación ósea del esqueleto a lo largo de toda la vida. El remodelado óseo consta de cuatro fases: reposo, activación, resorción y formación. Un hecho importante y distintivo del remodelado óseo es el acoplamiento que existe entre los procesos de resorción y formación. De esta forma se produce un equilibrio dinámico debido a la sumatoria de microprocesos múltiples y localizados en los cuales no hay ni pérdida ni ganancia de hueso, ni tampoco traslocación o movimiento de estructuras óseas. Este proceso colabora en la renovación constante y continua del hueso.

## **Sistema RANK-RANKL-OPG**

La biología del osteoclasto atravesó una verdadera revolución a finales de los años '90, no solo por el descubrimiento de un conjunto de moléculas críticas para la regulación de la osteoclastogénesis, sino también por la elucidación de cómo interactuaban entre sí durante el proceso de formación osteoclástica. En particular, RANKL, un miembro de la familia de los ligandos de TNF fue descrito como una proteína de membrana presente en osteoblastos y células del estroma (Anderson y col., 1997; Wong y col., 1997). Posteriormente, se identificaron tres isoformas de RANKL, dos de las cuales son proteínas transmembrana mientras que la tercera – RANKL3- es una forma soluble (Ikeda y col., 2001, Yasuda, 2013). El receptor para RANKL está presente en los pre-osteoclastos y es el RANK, identificado por primera vez por Anderson y col. (1997). La interacción célula-célula entre Obs con RANKL y pre-osteoclastos portadores del receptor RANK, induce la formación y activación de los osteoclastos (Yasuda y col., 1999). A su vez, el factor estimulante de colonias-1 (CSF-1) es necesario para estimular la expresión génica de RANK (Arai y col., 1999) y para el crecimiento y la diferenciación de los pre-osteoclastos (Tanaka y col., 1993).

La señalización desencadenada a partir de la unión entre RANK-RANKL resulta en el reclutamiento de varios miembros de la familia de los factores asociados a los receptores de TNF (TRAFs) dentro de los pre-osteoclastos. De éstos, TRAF6 parece jugar un rol clave dado que activa la cascada de señales para NF $\kappa$ B y c-fos (Boyle y col., 2003). Ratones knockout para el gen de c-fos o de NF $\kappa$ B no poseen osteoclastos (Grigoriadis y col., 1994; Iotsova y col., 1997) y la erupción dentaria está inhibida. Asimismo, TRAF6 se une a la tirosina kinasa Src la cual es la molécula efectora en la activación osteoclástica dado que es necesaria para el ordenamiento del citoesqueleto del osteoclasto durante la formación del borde rugoso (Boyce y col., 1992) y además previene su apoptosis (Xing y col., 2001). La fusión de los pre-osteoclastos para formar osteoclastos requiere también de una proteína transmembrana específica de células dendríticas (DC-STAMP) (Zhang y col., 2014).

En este complejo sistema regulatorio de la osteoclastogénesis, participa también otra molécula llamada osteoprotegerina (OPG), una glicoproteína secretoria

miembro de la familia de receptores TNF (Tsuda y col., 1997). OPG es producida por una variedad de células y bloquea la diferenciación de osteoclastos a partir de sus precursores mononucleares, pues compite por los receptores RANKL impidiendo la unión RANK-RANKL (Simonet y col., 1997) y en consecuencia bloquea la cascada de señalización necesaria para la osteoclastogénesis (Fig. I-2).

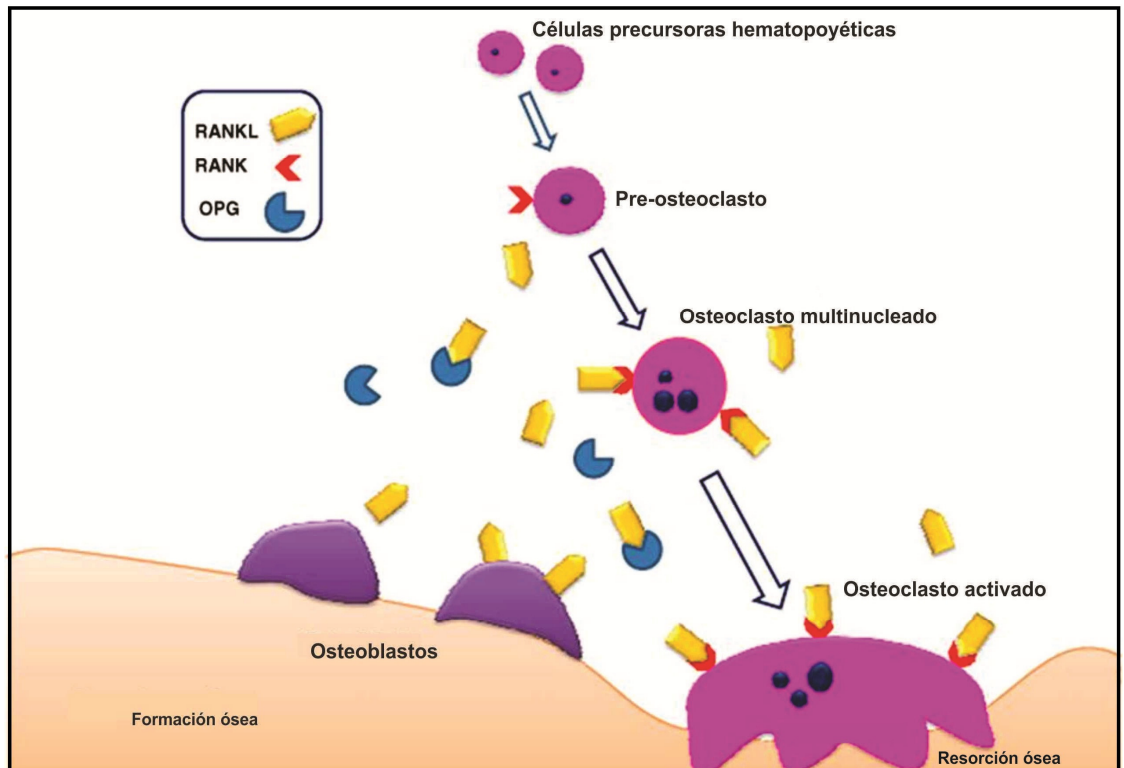


Fig I-2: Esquema representativo de la participación del sistema RANK-RANKL-OPG durante el proceso de osteoclastogénesis.

### Osificación Endocondral o Indirecta

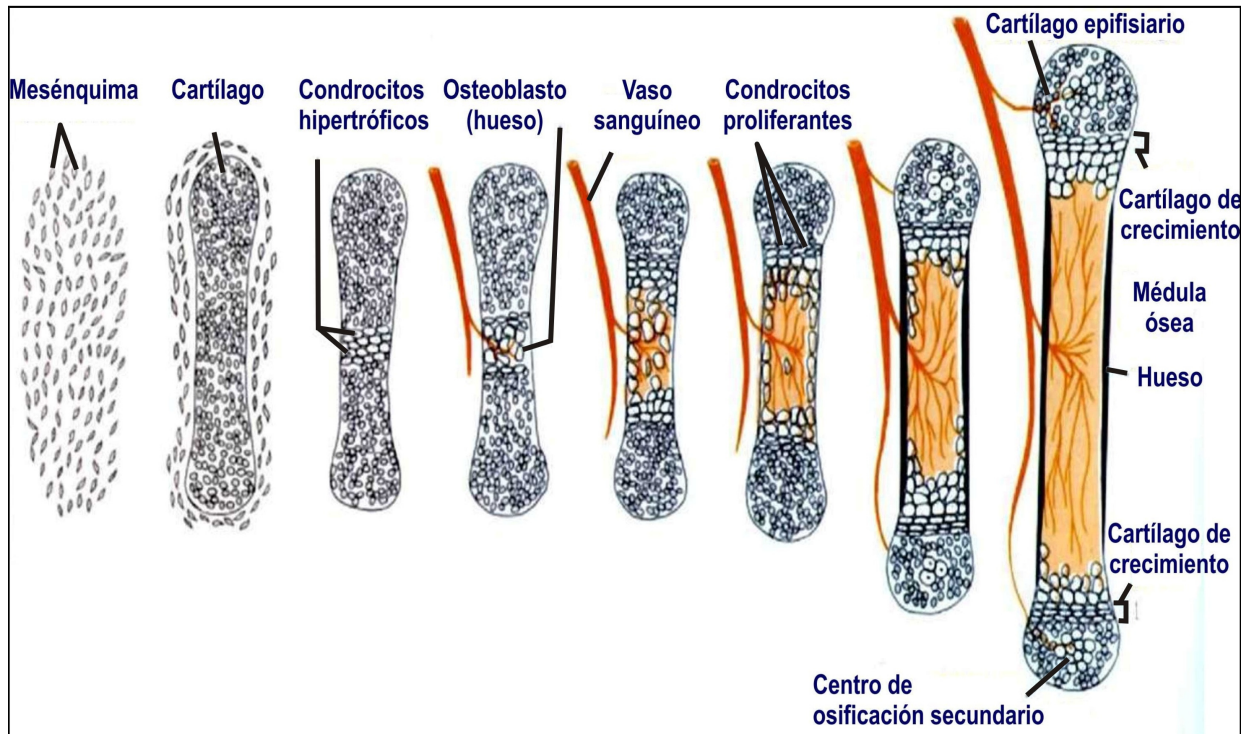
La osificación endocondral o indirecta se basa en la formación de huesos a través de un modelo de cartílago hialino previo. El tejido óseo deriva embriológicamente del mesoderma (Fig. I-3).

En el lugar donde se formará el hueso mediante osificación endocondral se agrupan células mesenquimáticas tomando la forma que tendrá el futuro hueso. Estas células inducidas por diferentes factores de crecimiento se diferenciarán a **condroblastos**. Los condroblastos sintetizan matriz cartilaginosa (cartílago hialino) y los condroblastos que quedan incluidos en la matriz se llamarán **condrocitos**. Alrededor de dicho cartílago se desarrolla el **pericondrio** formado por tejido

conectivo. El modelo cartilaginoso crece por división celular de los condrocitos, que secretan matriz cartilaginosa. De esta manera el cartílago crece intersticialmente (desde adentro, por división y síntesis de matriz de los condrocitos). Dicho modelo cartilaginoso también crece por aposición de matriz sintetizada por los condroblastos desde el pericondrio. Durante el proceso de osificación dicho pericondrio cambiará su comportamiento y comenzará a comportarse como periostio. Las células mesenquimáticas se diferencian a células osteoprogenitoras y éstas a Obs, las que comienzan a sintetizar matriz osteoide. Ésta luego se calcifica, formando tejido óseo y constituyéndose en un manguito o collar óseo alrededor de la futura diáfisis. A este nivel se inicia el 1er. centro de osificación (Fig. I-3).

Los **condrocitos** a nivel del manguito óseo se hipertrofian. Si bien se siguen estudiando los eventos que llevan a la hipertrofia de los condrocitos, una de las teorías es que dejan de recibir nutrientes y acumulan glucógeno. Los condrocitos hipertróficos dejan de sintetizar colágeno y proteoglicanos y comienzan a sintetizar fosfatasa alcalina, enzima esencial para la mineralización y terminan su vida útil (posiblemente por apoptosis). La muerte de los condrocitos hipertróficos lleva a la conformación de lagunas rodeadas por matriz cartilaginosa la que luego se calcifica (esta calcificación estaría relacionada con la síntesis de fosfatasa alcalina por los condrocitos hipertróficos).

Invasión de brotes periósticos: Antes de la apoptosis los **condrocitos hipertróficos** secretan, entre otros, factor de crecimiento endotelial (VEGF) que induce a la formación de vasos sanguíneos desde el periostio. Estos vasos invaden la cavidad dejada por los condrocitos, acarreado células hematopoyéticas y células osteoprogenitoras. Las células hematopoyéticas formarán la médula ósea, los **osteoblastos** diferenciados de las células osteoprogenitoras, utilizarán la matriz cartilaginosa calcificada como andamiaje “scaffold” y comenzarán a sintetizar osteoide sobre dichas trabéculas. A medida que el centro de osificación se alarga hacia los extremos del hueso, los **Ocs** destruyen las trabéculas recién formadas. Luego, los Ocs resorberán gran parte de las trabéculas, formándose así la cavidad medular en el centro, que será ocupada por médula ósea roja.

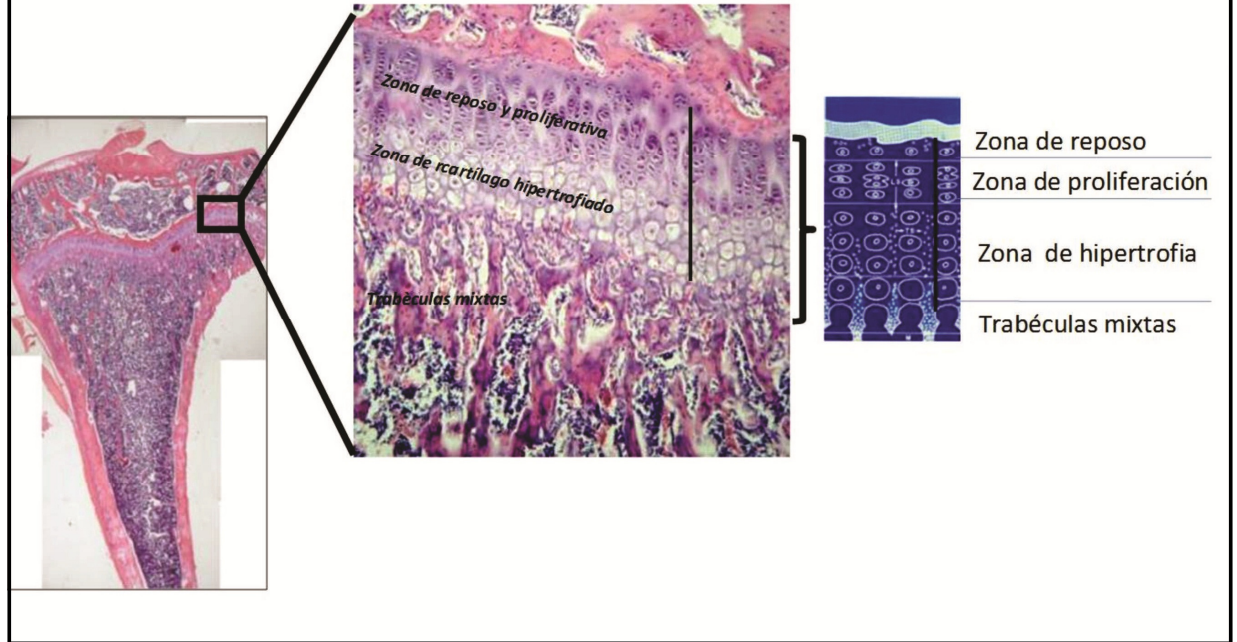


**Fig. I-3:** Esquema representativo del crecimiento longitudinal de los huesos largos de origen mesenquimático. Imagen modificada de <http://www.anatomiahumana.ucv.cl/kine1/top2.html>. Laboratorio de Antropología Física y Anatomía Humana - Laboratorio de Técnicas Anatómicas. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. 2013.

Centros de osificación secundarios: Los vasos sanguíneos penetran la epífisis y se forman los centros de osificación secundarios. La formación es similar a la del centro de osificación primario, sólo que en las epífisis se conservará más tejido óseo trabecular en el interior. En los estadios tempranos del desarrollo se conserva cartílago hialino entre la diáfisis y epífisis que se conoce como placa epifisaria, disco epifisario, cartílago de crecimiento o cartílago metafisario y permitirá el crecimiento longitudinal de los huesos largos (Fig. I-3). El cartílago hialino que cubre la epífisis se convertirá en cartílago articular.



## Cartílago de Crecimiento



**Fig I-4:** A la izquierda: corte histológico longitudinal de tibia de rata coloreado con H&E. En el centro: A mayor aumento se observan detalles del cartilago metafisiario y el hueso subcondral. A la derecha se muestra un esquema de las diferentes zonas del cartilago metafisiario.

Algunos de los factores que regulan el crecimiento longitudinal de los huesos son sistémicos y otros, paracrinós. Dentro de los sistémicos podemos mencionar a: Hormona de crecimiento hipofisiaria: estimula a nivel hepático la síntesis de IGF-1, principal molécula que induce el crecimiento en el período postnatal. La acción de esta hormona está modulada en forma sistémica a través de la regulación de la síntesis de IGF-1 hepática, aunque también se sintetiza IGF-1 a nivel local; existen receptores en las células del cartílago y también proteínas transportadoras para estas IGF en el cartílago de crecimiento (Neelson y col., 2005).

Hormonas tiroideas: son fundamentales en la maduración ósea. Inducen la síntesis de IGF-1 en los condrocitos regulando la acción de la hormona de crecimiento a nivel del cartílago (Ballock y Reddi, 1994). Además estimulan el paso de los condrocitos pequeños hacia la zona proliferante e inducen la diferenciación de condrocitos hipertróficos (Ahmed y col., 2007).



Glucocorticoides: Sus efectos son producidos en forma indirecta por vía sistémica y también a nivel local, por efecto directo del corticoide sobre la expresión de los receptores de la hormona de crecimiento y de IGF-1. Estas hormonas retardan el crecimiento óseo al inhibir la proliferación de los condrocitos y los Obs disminuyendo el tamaño óseo (Chen y Feldman 1979; Wong y col., 1990; Klaus y col., 2000)

Entre los factores paracrinicos podemos mencionar los siguientes:

Proteína indian hedgehog: se expresa en los condrocitos pre-hipertróficos y estimula la proliferación de los condrocitos, retrasando su paso a hipertróficos (Bitgood y McMahon, 1995).

PTHrP: El péptido relacionado a parathormona estimula la proliferación de los condrocitos. Su ausencia produce un cartílago de crecimiento desorganizado (Bastepe y col., 2004).

Factores de crecimiento fibroblástico: Estos factores constituyen una gran familia compuesta, hasta donde se conoce actualmente, por 22 miembros que interactúan con alrededor de cuatro tipos de receptores en todo el organismo y son importantes en la diferenciación de todos los tejidos; son los principales reguladores del crecimiento embrionario. El factor FGF-18 (Fibroblast Growth Factor) es el más importante en la zona del cartílago de crecimiento; los receptores tipo 1, 2 y 3 se expresan en el cartílago de crecimiento: el receptor tipo 1, en los pre hipertróficos, hipertróficos y en pericondrio; el tipo 2, en pericondrio, periostio y esponjosa primaria (Minina y col., 2002) y el tipo 3 se encuentra principalmente en los condrocitos proliferantes.

Proteínas morfogenéticas óseas: La familia de las BMP (*Bone Morphogenetic Proteins*), se compone de 15 miembros, que son parte de la súper familia de las TGF beta y tienen numerosas y diversas funciones, dependiendo del nivel donde actúan. La BMP 2, 3, 4, 5, 7 se expresan en pericondrio, la BMP 2 y 6 en condrocitos hipertróficos y la BMP 7 en condrocitos proliferantes. Todas la BMP incrementan la proliferación. La BMP 2 además retrasa la diferenciación terminal de condrocitos hipertróficos (van der Eerden y col., 2003).

## **Capítulo III: Erupción Dentaria**

### **Odontogénesis.**

La estructura embriológica que da origen a las piezas dentarias se denomina germen dentario (Ten Cate, 1995). La formación del germen dentario como así también el proceso de erupción dentaria, comienzan durante la vida intrauterina (Christensen y col., 1993). La odontogénesis implica, entre otros procesos, una interacción ectodermo-mesenquimática.

El epitelio embrionario del germen dentario es de origen ectodérmico y el tejido mesénquimático que se encuentra por debajo tiene origen en células de las crestas neurales. Estas células se desprenden del ectodermo neural durante la formación del tubo neural y participan en la formación de diferentes estructuras craneofaciales incluyendo las piezas dentarias.

En el ectodermo, ciertas áreas de células basales comienzan a proliferar con mayor velocidad que las células adyacentes. Esto conduce a la formación de una banda epitelial que sigue el contorno de los futuros arcos dentarios y se denomina lámina dentaria. En los sectores de la lámina dentaria donde se formarán los elementos dentarios, las células proliferan más rápidamente y forman una invaginación que invade y comprime el ectomesénquima subyacente. Esa invaginación en forma de brote, conjuntamente con la condensación ectomesenquimática que lo rodea, representa el estadio de brote del germen dentario. La porción epitelial del germen forma lo que se conoce como órgano del esmalte que tiene como principales funciones formar el esmalte dentario, inducir la formación de dentina y determinar la forma de la corona anatómica del diente.

La porción ectomesenquimática del germen dará origen a la papila dental que formará luego la dentina y la pulpa, y al saco dentario o folículo dental que formará los tejidos de sostén del diente (periodonto de inserción): cemento, ligamento periodontal y hueso alveolar (Osborn y col., 1988). La continua proliferación de células del órgano del esmalte no es uniforme, por lo que el brote toma aspecto de un casquete, que es el segundo estadio de desarrollo del germen dentario. El órgano del esmalte está constituido en este momento por un epitelio dental externo y uno interno. En la porción central del germen se encuentra el retículo estrellado,

tejido embrionario formado por células poligonales y gran cantidad de sustancia extracelular. Dado que la porción marginal del casquete epitelial continúa creciendo, el germen adopta una forma de campana. En el estadio de campana, se diferencia el estrato intermedio que se localizará entre el epitelio dental interno y el retículo estrellado. En este estadio las células del epitelio dental interno se diferencian en ameloblastos (células secretoras de esmalte) inducidas por células de la papila dental. En el retículo estrellado aumenta el fluido intercelular por lo que las células, que están unidas por desmosomas, adoptan una forma claramente estrellada. Durante la formación del esmalte, el retículo estrellado aporta los nutrientes necesarios. Además, las células del retículo estrellado participan en la producción de señales moleculares para la erupción dentaria (Gorski y col., 1992). Las células de la papila dental comienzan a diferenciarse en odontoblastos, previo a la formación del esmalte por parte de los ameloblastos. Los odontoblastos posteriormente comienzan a secretar una matriz colágena (una variedad de sustancia osteoide), sobre la cual se depositan sales de fosfato de calcio y se forma la dentina. En el estadio de campana, luego de que se formó la primera capa de dentina, denominada dentina del manto, las células del epitelio dental interno se diferencian en ameloblastos y comienzan a sintetizar esmalte. De esta forma, los odontoblastos secretan dentina desplazándose hacia el centro de la pulpa (movimiento centrípeto) y los ameloblastos se desplazan hacia la periferia (movimiento centrífugo) (Ten Cate, 1998). En el día 3 de vida postnatal de la rata, el germen dentario se encuentra en un estadio de campana avanzado.

Los elementos dentarios se desarrollan dentro de los huesos maxilares, rodeados por la canastilla ósea la cual se forma conjuntamente con el desarrollo del diente. El desarrollo de los elementos dentarios y la erupción son procesos que comienzan en el período prenatal del individuo, conjuntamente con el desarrollo de los huesos maxilares (Ten Cate, 1998). El crecimiento normal de los maxilares junto al complejo craneofacial está bajo control genético y puede ser afectado por factores ambientales. Debido a esto, alteraciones o enfermedades que afecten el desarrollo mandibular pueden perturbar negativamente el proceso eruptivo. Los mecanismos reguladores responsables de una morfogénesis normal de la cara y cráneo incluyen hormonas, nutrientes, fuerzas biomecánicas y factores locales de crecimiento (Pucciarelli, 1980; Pisano y col., 1986).

La erupción dentaria es un proceso complejo y multifactorial que comienza prenatalmente y que comprende el movimiento de un diente desde su sitio intraóseo de desarrollo hasta alcanzar su posición funcional en la cavidad bucal (Massler y Schour, 1941). Es un evento altamente regulado espacial y temporalmente, mediante el cual un elemento dentario recorre un trayecto desde su posición dentro de los maxilares rodeados de una canastilla ósea hasta aparecer en la cavidad bucal y alcanzar su posición funcional, en un lugar preciso de la arcada y en un período de tiempo determinado. El proceso eruptivo puede ser dividido en cinco etapas: movimientos pre-eruptivos, erupción intraósea, perforación mucosa, erupción pre-oclusal y erupción post-oclusal. Durante la formación de la corona, existen pequeños movimientos giratorios pre-eruptivos dentro de los maxilares. Luego de que se completa la formación coronal y que la raíz comienza a formarse, un movimiento eruptivo en las tres dimensiones del espacio, conduce al diente hasta llevarlo a su posición funcional. La primera parte de estos movimientos de traslación están comprendidos dentro de la fase intraósea. Por lo tanto, dado que hasta ese momento el diente se encuentra rodeado de la canastilla ósea, es necesario que se forme una vía o canal de erupción para que el diente pueda perforar la mucosa y aparecer en la cavidad bucal. La formación de esta vía eruptiva se produce a través de un proceso de resorción ósea regulado localmente. La fase intraósea concluye con la perforación mucosa y allí el proceso eruptivo comienza a acelerarse. Luego, cuando el diente alcanza el plano oclusal, este rápido movimiento comienza a detenerse. Los movimientos que tienen lugar luego de alcanzar el plano oclusal incluyen la consolidación del soporte periodontal para el diente y el cierre del ápice radicular. Es importante destacar que en roedores los incisivos presentan un patrón de crecimiento y erupción continua y a una misma tasa de velocidad durante toda su vida. Es por ello que para el estudio de la erupción dentaria en modelos animales, es conveniente trabajar con los molares dado que tienen un patrón limitado de erupción, similar al humano.

### **Teorías de la Erupción Dentaria**

A lo largo del tiempo se propusieron diversas teorías para explicar el mecanismo de la erupción dentaria. Para que una teoría sea aceptada como válida

desde el punto de vista biológico, debe considerar ciertas observaciones objetivas como por ejemplo que durante el proceso eruptivo los dientes se mueven en las tres dimensiones y no solo sobre su eje axial, que la velocidad de erupción varía a lo largo de todo el proceso y que al final de una erupción normal, el elemento dentario alcanza su posición funcional dentro de la arcada y esta localización es programada genéticamente. Sobre la base de estas consideraciones, algunas teorías tales como presión y/o crecimiento del tejido pulpar, tracción de fibroblastos periodontales y presión vascular (Herzberg y Schour, 1941; Bryer, 1957; Sutton y Graze, 1985), no son consideradas como las principales causas del proceso eruptivo (Marks y col., 1996; Wise y King, 2008). Por el contrario otras teorías como la elongación de la raíz dentaria, el remodelado óseo y posiblemente, la formación del ligamento periodontal aportan evidencias más convincentes para explicar la erupción dentaria en mamíferos. A continuación se explicarán estas teorías profundizando más en la de modelación ósea dado que es la más aceptada en la literatura actual:

*Elongación de la raíz dentaria:* Debido a que las raíces se forman durante el proceso de erupción, durante mucho tiempo se las consideró la fuerza responsable del movimiento eruptivo (Massler y Schour, 1941). Sin embargo, las raíces solas no podrían mover el diente en tres dimensiones y además, se ha demostrado que dientes sin raíces erupcionan normalmente (Witkop, 1975; Cahill and Marks, 1980). Las raíces per se no desencadenan ni guían el proceso eruptivo; no obstante podrían acelerarlo.

*Ligamento Periodontal:* En roedores, la continua formación y renovación del ligamento periodontal, (tejido de soporte del diente que se inserta en el cemento y en el hueso alveolar) está íntimamente relacionada con la erupción continua de los incisivos (Berkovitz, 1971). Sin embargo, para los elementos de erupción limitada, el ligamento periodontal no asegura la erupción. En casos de osteopetrosis (Marks, 1989), el ligamento periodontal está presente y sin embargo el diente no erupciona. Por el contrario, en la displasia dentinaria tipo I, los dientes no presentan raíces y por tanto, tampoco ligamento periodontal, y sin embargo erupcionan normalmente (Cahill and Marks, 1980).

Modelado Óseo: La formación de hueso en la zona apical de la canastilla ósea que rodea los gérmenes dentarios fue propuesta como uno de los mecanismos óseos de la erupción dentaria. Sin embargo, a pesar de que hay formación ósea en esa zona de la canastilla, este proceso por sí mismo no es suficiente para que se produzca la erupción. Un ejemplo es el caso de la osteopetrosis, enfermedad ósea congénita caracterizada por una reducción o inhibición (dependiendo del tipo de osteopetrosis) de la resorción ósea con tasa aproximadamente normal de formación ósea. En todos los casos de osteopetrosis, los dientes no erupcionan y, si lo hacen, lo hacen de manera ectópica y parcialmente (Marks, 1973). Esto condujo a pensar que el proceso fundamental para que el proceso eruptivo ocurra con éxito estaría íntimamente relacionado con la resorción ósea que se lleva a cabo en el hueso supracoronario de la canastilla que permite la formación de la vía o canal eruptivo (Marks, 1989). Cahill (1969) logró disociar el movimiento del diente de la formación del canal eruptivo. En perros, colocó alambres transmandibulares por encima de premolares antes del comienzo de la erupción. La vía de erupción se formó en el hueso supracoronario por encima de los premolares impactados y cuando se retiraron los alambres, los premolares erupcionaron rápidamente. Así, se demostró que la formación del canal eruptivo es un evento localizado y programado que no requiere de la presión del diente en erupción. Grier y Wise (1998), administraron pamidronato a ratas lactantes y demostraron un retardo en la fecha de erupción dentaria de los molares e incisivos mandibulares.

Por lo tanto, la erupción del elemento dentario depende de la resorción en la zona supracoronario de la canastilla ósea que conlleva a la formación del canal eruptivo.

## **Mecanismo de la Erupción Dentaria**

### Rol del Folículo Dental / Saco dentario

El folículo dental también denominado saco dentario es un tejido de origen ectomesenquimático que rodea el órgano del esmalte de cada diente y es esencial para el proceso eruptivo. Además, da origen a los tejidos de soporte del diente (periodonto de inserción). Cahill y Marks (1980) mostraron en perros, que la remoción quirúrgica del folículo dental de premolares previo al inicio de la erupción, resultaba en una inhibición de la misma. Por el contrario, si se mantenía el folículo

dental intacto pero se extraían los premolares y en su lugar se colocaban dientes artificiales, éstos erupcionaban normalmente (Marks y Cahill, 1984).

### Eventos Celulares y Moleculares

Al inicio de la erupción dentaria se produce un influjo de células mononucleares en la porción supracoronal del saco dentario lo cual se acompaña consecuentemente de un aumento en el número de osteoclastos (Marks y col., 1983). En el primer molar mandibular de rata, el flujo de células mononucleares alcanza su pico en el día 3 de vida postnatal, lo cual coincide con el momento de mayor número de osteoclastos en hueso supracoronal. Si bien la fecha de erupción del primer molar de rata es entre los días 17 y 18, estos eventos celulares deben ocurrir tempranamente para dar tiempo a la formación del canal eruptivo. Una de las funciones del folículo dental consiste en actuar como tejido blanco para atraer las células mononucleares (pre-osteoclastos) y servir como medio para que estas células se fusionen para formar osteoclastos. Dado que el folículo dental está interpuesto entre la canastilla ósea y el diente, su ubicación es ideal para regular los eventos celulares de la erupción dentaria.

El control fino de la erupción dentaria es regulado por numerosos factores que son secretados en su mayoría por las células del folículo dental en momentos definidos, es decir, la regulación molecular del proceso eruptivo es un evento localizado más que sistémico (Wise y col., 2002). El factor de crecimiento epidérmico (EGF) fue una de las primeras moléculas asociadas a la erupción. Cohen (1962) observó que la inyección de EGF a roedores aceleraba la erupción del incisivo. Más tarde, Tam (1985) demostró que la erupción de este diente también se ve acelerada por el factor de crecimiento transformante- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ). Ambas moléculas utilizan los mismos receptores, por lo tanto no llama la atención que tengan el mismo efecto sobre el proceso eruptivo. Más aun, la ausencia de una de ellas es compensada por la acción de la otra, lo que demuestra el estricto control para asegurar la erupción de los elementos dentarios en el tiempo correspondiente (Mann y col., 1993). Otras moléculas importantes en el proceso eruptivo se descubrieron a partir de roedores osteopetróticos. La erupción dentaria en estos roedores está completamente inhibida y además carecen de CSF-1 (Felix y col., 1990). La inyección de CSF-1 restaura la resorción ósea e induce la erupción dentaria (Iizuka y col., 1992). Cabe destacar que la inyección de CSF-1 debe

aplicarse a la cría muy temprano, antes del día 3, para la erupción del primer molar mandibular, dado que ese es el momento crítico donde se produce el pico de precursores mononucleares en el folículo para la formación de osteoclastos maduros (Cielinski y col., 1994). Estudios más recientes demostraron que la erupción dentaria está regulada también por varios factores de transcripción genética como c-fos (Grigoriadis y col., 1994) y NFκB1 y NFκB2 (Franzoso y col., 1997; Iotsova y col., 1997) y además por otras moléculas como PTHrP (Philbrick y col., 1998), IL-1a y su receptor tipo I (IL-1R) (Huang y Wise, 2000). Los roedores deficientes de alguno de estos factores presentan un fenotipo de inhibición de la erupción dentaria. Estos genes eruptivos y sus moléculas se localizan principalmente en el folículo dental y en parte en el retículo estrellado. (Wise y Lin, 1995; Wise, 1998). Cahill y col. (1988) hipotetizaron que el órgano del esmalte poseería un “reloj biológico” que regularía el “timing” del proceso eruptivo. La cronología de la localización de las diferentes moléculas eruptivas tiene una correlación directa con el tiempo en que se producen los eventos celulares de la erupción. Transcurrido el día 3, hay un marcado descenso en el número de células como así también en la expresión de estas moléculas.

### **Rol de los Osteoclastos en la Erupción Dentaria**

El proceso eruptivo requiere de pre-osteoclastos y osteoclastos que formen la vía de erupción. El influjo de los preosteoclastos hacia el folículo dental es iniciado principalmente por el CSF-1 y el factor quimiotáctico de monocitos-1 (MCP-1) (Wang y col., 1988; Yoshimura y col., 1991). La expresión génica de CSF-1 es estimulada por la IL1-a, el PTHrP y además el mismo CSF-1 posee un efecto autocrino sobre su expresión (Wise y Lin, 1994). La expresión de MCP-1 es estimulada por IL1-a, el EGF y el factor de crecimiento tumoral-β1 (TGF-β1). Este sistema regulatorio en el cual existe más de una citoquina capaz de reclutar pre-osteoclastos al folículo dental, aumenta las posibilidades de que la erupción dentaria ocurra normalmente aun si falla la expresión de alguna de ellas (Shull y col., 1992). Recientemente se demostró que la proteína SFRP-1 (*Secreted frizzled-related protein-1*) se expresa en células del folículo dental e inhibe la osteoclastogénesis. Su expresión está



disminuida en los días 2 y 3 de vida de la rata, previo a que se produzca el pico de osteoclastogénesis en el folículo dental (Liu y col., 2013).

Una vez que los pre-osteoclastos han sido reclutados hacia el folículo dental, debe existir un medio favorable dentro del folículo que promueva la fusión de estas células. Este proceso es estimulado por la interacción de los factores RANK, RANKL y OPG (ver I.2) producidas y secretadas por células del folículo dental (Yao y col., 2004). La unión RANK-RANKL desencadena una cascada de señalización intracelular que aumenta la transcripción de los factores c-fos y NFκB, necesarios para formar osteoclastos maduros.

#### **Capítulo IV: Melatonina**

Está demostrado que la melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) participa en la regulación del sueño y de los ciclos estacionales. Su importancia radica en su capacidad para comunicar la información sobre los ciclos ambientales a los sistemas biológicos y de comportamiento (Davis, 1997). Si bien su síntesis no se restringe a la glándula pineal, durante mucho tiempo la contribución de los sitios extrapineales de melatonina se consideró incierta o insignificante, dado que una investigación de Cardinali y Pévet (1998) demostró que la pinealectomía provocaba la eliminación de niveles detectables de la hormona en la circulación. Investigaciones más recientes han demostrado que algunos tejidos extrapineales secretan melatonina tales como intestino, piel y retina (Brzozowski y col., 2005) y que además existen receptores de melatonina en numerosos tejidos, algunos de los cuales son considerados relojes periféricos (Mendez y col., 2012).

La secuencia enzimática para la síntesis de melatonina en pinealocitos fue identificada por primera vez por Axelrod (1974). Su precursor es el triptofano, aportado por la dieta y convertido a serotonina mediante la enzima 5-hidroxitriptofano. La serotonina es luego acetilada para formar la N-acetilserotonina por una N-acetiltransferasa, siendo ésta una enzima reguladora o limitante de la vía. Luego, la N-acetilserotonina es convertida a melatonina por una O-metiltransferasa.

La secreción de melatonina es fotoperíodo dependiente (Reiter, 1992; Ackermann y col., 2007) con el pico de secreción durante las horas de oscuridad. En los mamíferos, la información lumínica es captada por un fotopigmento,

melanopsina, ubicada en las células ganglionares de la retina. La síntesis de melatonina en la glándula pineal es mediada por la vía retino-hipotálamica. Ésta proyecta la información desde la retina al NSQ, considerado el reloj o marcapasos circadiano principal del organismo (Klein and Moore, 1979). Proyecciones del NSQ alcanzan el núcleo paraventricular (NPV) e inervan las neuronas del ganglio cervical superior. Las fibras posganglionares simpáticas terminan en los pinealocitos y regulan la síntesis de melatonina por liberación rítmica de norepinefrina (NE). La liberación de NE de estas terminales nerviosas se produce durante la noche (Moore, 1996). La NE actúa sobre receptores beta-adrenérgicos de los pinealocitos activando el proceso de síntesis de melatonina. Una vez sintetizada, la melatonina no es almacenada dentro de la glándula pineal sino que difunde a los capilares sanguíneos y al líquido cefalorraquídeo (Reiter, 1991). Alcanza a todos los tejidos del cuerpo dentro de un período de tiempo corto, siendo su vida media entre 2 y 20 minutos.

Como se dijo previamente en el capítulo I, una de las principales señales para la programación materna es el ritmo circadiano de secreción de melatonina materna. Esta hormona es transportada al feto a través de la placenta y durante la lactancia como componente de la leche materna, generando un ritmo de melatonina plasmática en fetos y neonatos (Yellon y Longo, 1988; Velásquez y col., 1992). En este contexto han sido examinados diversos modelos experimentales en mamíferos. Estudios previos de este laboratorio demostraron que la desnervación simpática de la glándula pineal materna en el día 10 de gestación interrumpe el ritmo circadiano de malato deshidrogenasa testicular en crías de ratas de 25 días de edad y el ritmo de comportamiento de bebida (Bellavía y col., 1996.; Cisternas y col., 2010). Asimismo, la administración de melatonina entre los días 14 a 21 de gestación a madres desnervadas o pinealectomizadas restableció dichos ritmos (Bellavía y col., 2006).

La melatonina, además de ser una de las señales intervinientes en la sincronización o programación materna y moduladora de los ritmos circadianos, posee funciones como antioxidante, antiapoptóticas, neuroprotectoras e intervendría en la reducción de la incidencia de ciertos tumores (Reiter, 2004; Blask y col., 2005; Shiu y col, 2007; Tengattini y col., 2008). Debido a sus propiedades cronobióticas o marcadora del tiempo, la melatonina ha sido utilizada en el tratamiento de desórdenes del ritmo de sueño/ vigilia y está implicada en la función inmune, en

funciones retinales, protección ósea y regulación de la secreción de bicarbonato en el tracto gastrointestinal (Tan y col., 2003). Estudios realizados en cultivo mostraron que la melatonina modula la expresión de sialoproteína ósea en líneas celulares de pre-osteoblastos y de osteosarcoma de rata. Por lo tanto, “*in vitro*” la melatonina sería capaz de estimular la diferenciación de Obs, la mineralización de la matriz osteoide y podría jugar un papel esencial en la regulación del crecimiento óseo (Roth y col., 1999).

En síntesis, puede expresarse que melatonina posee una amplia gama de efectos, con una influencia moduladora significativa sobre las funciones fisiológicas del cuerpo, ya sea por un mecanismo sincronizador a nivel central y periférico, por su acción como antioxidante, o por ambos mecanismos.

La trayectoria de nuestro laboratorio en el estudio acerca de los efectos del estrés prenatal sobre parámetros enzimáticos, conductuales y comportamentales en las crías, data de largo tiempo. Si bien es conocido que un ambiente prenatal adverso posee una influencia determinante sobre las crías, los efectos del estrés prenatal sobre ciertos aspectos del proceso de erupción dentaria, no han sido investigados. En el año 2000, Meek y col. observaron macroscópicamente un retardo en la erupción dentaria de ratones prenatalmente estresados. Sin embargo algunas preguntas relacionadas a dicho proceso aun no han sido respondidas ¿Cuáles serían los posibles eventos celulares asociados a dicho retardo?, ¿Cómo podría evaluarse de modo más confiable la disminución del grado de erupción dentaria? ¿Cuál sería el posible fundamento por el cual el estrés prenatal afecta el proceso eruptivo?

Hay evidencia que permite afirmar que una etapa celular crítica en la erupción dentaria es la formación de los osteoclastos necesarios para resorber el hueso alveolar y formar el canal de erupción. El pico de osteoclastos en la rata se produce en el día 3 de vida postnatal (Wise y col., 1989). Cuando los osteoclastos no se forman correctamente o bien su función está disminuida, la erupción dentaria está retardada o en algunos casos, completamente inhibida (Grier y Wise, 1998; Wise y col., 2002; Helfrich y col., 2005). Por esta razón y dada la relevancia que reviste este proceso en el campo de la Odontología, nos propusimos en primer lugar estudiar los osteoclastos y el hueso supracoronal de la canastilla ósea del primer molar inferior a los 3 días de edad y relacionar estos resultados con el grado de erupción dentaria a los 15 días de edad.

Por otro lado, dado que el hueso mandibular y los huesos largos tienen diferentes orígenes embriológicos nos preguntamos si el estrés prenatal podría afectar también el crecimiento de la tibia. Éste constituyó otro de los objetivos de esta tesis.

Para ello decidimos estudiar algunos aspectos de la osificación endocondral. Es conocido que la administración prenatal de dexametasona (Swolin-Eide, 2002) o el estrés variado aplicado a ratas preñadas (Dancause y col., 2012), disminuye el crecimiento de tibias en crías. Además, estudios donde se comparó los dos tipos de

hueso, demostraron que las células óseas precursoras de osteoclastos tienen diferente dinámica de osteoclastogénesis (de Souza Faloni y col., 2006). Asimismo, Mandalunis y col. (2009) hallaron que la insuficiencia renal y la diabetes alteran el volumen óseo de la tibia mientras que dicha alteración no se manifiesta en el hueso alveolar.

Otro interrogante que nos formulamos fue si el estrés crónico prenatal produciría alteraciones a largo plazo lo cual nos llevó a medir el grado de crecimiento mandibular en crías adultas. Existen antecedentes que prueban que la masa mandibular disminuye en ratones adultos sometidos a estrés (Seferos y col., 2010).

Finalmente, en nuestro laboratorio demostramos previamente que la administración de melatonina a ratas preñadas sometidas a luz constante es capaz de prevenir los efectos negativos del tratamiento estresante observados sobre el ritmo de actividad enzimática de LDH y MDH en ratas jóvenes y sobre el comportamiento sexual de las crías adultas (Cisternas y col., 2010). En función de estos antecedentes y de los resultados obtenidos en este trabajo nos propusimos el tercer objetivo de esta tesis, que consistió en determinar el posible rol protector de melatonina sobre los efectos adversos provocados por la luz constante crónica en la erupción del primer molar mandibular.

## **OBJETIVOS GENERALES:**

- Establecer la influencia prenatal de dos modelos de estrés crónico sobre ciertos aspectos del proceso de osificación de la rata y aportar nuevas evidencias del efecto preventivo de la hormona melatonina.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Estudiar eventos implicados en el proceso de la erupción dentaria y la osificación endocondral en ratas jóvenes de 3 y 15 días de edad, nacidas de madres preñadas sometidas a luz constante o a estrés crónico variado durante la gestación.
- Evaluar el grado de crecimiento mandibular en crías adultas de 60 días de edad nacidas de madres preñadas sometidas a dos modelos de estrés crónico. previamente mencionados.
- Establecer en crías jóvenes nacidas de madres preñadas sometidas a luz constante durante la gestación, la posible acción preventiva de la melatonina sobre el proceso de erupción dentaria.

## ***II. MATERIALES Y MÉTODOS***

## II.1- Animales

Se utilizaron 40 ratas hembras Wistar de 3 meses de vida cuyos pesos oscilaron entre 250 y 300g. A lo largo de las experiencias se siguieron las recomendaciones de la Guía para el Cuidado y Uso de animales de Laboratorio (publicación del NIH 85-23 Rev. 1985). Los animales fueron alojados en jaulas metálicas de 30 cm de altura x 40 cm de ancho y 40 cm de profundidad, mantenidos a temperatura controlada de  $23\pm 1$  °C, bajo un fotoperíodo de 12 horas de luz: 12 horas de oscuridad (7:00 h a 19:00 h) y con libre acceso a bebida y comida bajo una dieta estándar para rata-ratón (marca Gepsa Feeds que aporta glúcidos, lípidos, proteínas, calcio, fósforo y fibras). Las hembras, en el día del proestro, fueron colocadas en jaulas individuales y apareadas con machos. La detección de espermatozoides en el fluido vaginal fue utilizada como indicador del día 0 de preñez. Luego del parto se ajustó el exceso de crías de manera tal de mantener 8 crías por madre debido a que se ha demostrado que este procedimiento mejora la lactancia (Fishbeck y col., 1987).

El protocolo para el tratamiento de los animales fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Córdoba y se realizó según las recomendaciones de la Guía para el Cuidado y Uso de animales de Laboratorio (publicación del NIH 85-23 Rev. 1985) y de la Convención Europea para la protección de animales vertebrados usados para experimentación y otros fines científicos (Council of Europe N° 123, Strasbourg 1985). Se realizaron todos los esfuerzos posibles para minimizar tanto el sufrimiento como el número de animales utilizados.

## II.2- Grupos Experimentales

El tratamiento a las madres preñadas se realizó durante once días consecutivos desde el día 10 hasta el día 20 de preñez. A partir del día 10 de gestación fueron divididas en los siguientes grupos experimentales de 8 animales cada uno (Figuras II-1 y II-2):

- **Grupo EV (Grupo sometido a estrés crónico variado)**. Este grupo de animales fue expuesto a diferentes estresores una vez por día, durante el período de tratamiento. El régimen de estrés crónico variado y aleatorio que se utilizó fue una modificación atenuada del descrito por Katz et al. (1981) y consistió en la aplicación de los siguiente estresores:

1- Inmovilización forzada: las ratas preñadas fueron alojadas por 45 minutos en contenedores cilíndricos de 8x8x20 cm bajo luz y temperatura ambiente.



2- Nado forzado: las ratas preñadas fueron colocadas individualmente por 15 minutos en una cuba de vidrio de 40x21x60 cm, conteniendo agua a 24-26 °C.

3- Ruido: Las ratas preñadas fueron alojadas individualmente y expuestas a ruido de alarma (80 decibeles) durante 60 minutos.

4- Anestesia por inhalación con éter: En un recipiente de vidrio de 5 L de capacidad se colocó un algodón embebido con éter etílico. Las ratas preñadas se alojaron allí individualmente hasta desvanecimiento e inmediatamente retiradas.

5- Pinzamiento de cola: La cola de ratas preñadas fue recubierta con algodón para evitar injurias y luego fue presionada durante 1 minuto por una pinza metálica que aplica una fuerza de 500±50g.

Se aplicó un estresor por día, según se explicita en la Tabla II-1, una hora antes del cambio de fotoperíodo diario (18:00h). Los estresores utilizados se alternaron cada día durante el tratamiento de modo que se mantengan impredecibles para la madre y así evitar un posible acostumbamiento a un estresor determinado (Renard y col., 2005). Para la aplicación del protocolo de estrés, las ratas fueron transportadas a un cuarto distante del bioterio y alojadas individualmente en bandejas acrílicas de 30x15x10 cm. Luego de cada tratamiento estresante, los animales fueron retornados a sus jaulas originales en el bioterio

- **Grupo LL (Grupo sometido a luz constante crónica).** Durante el período de tratamiento, estos animales fueron expuestos de manera continua a un ciclo de 12h luz:12h luz. Se utilizaron lámparas eléctricas de luz blanca con una intensidad lumínica de 300 lux y a una distancia de la jaula de 80cm (Cisternas y col., 2010).

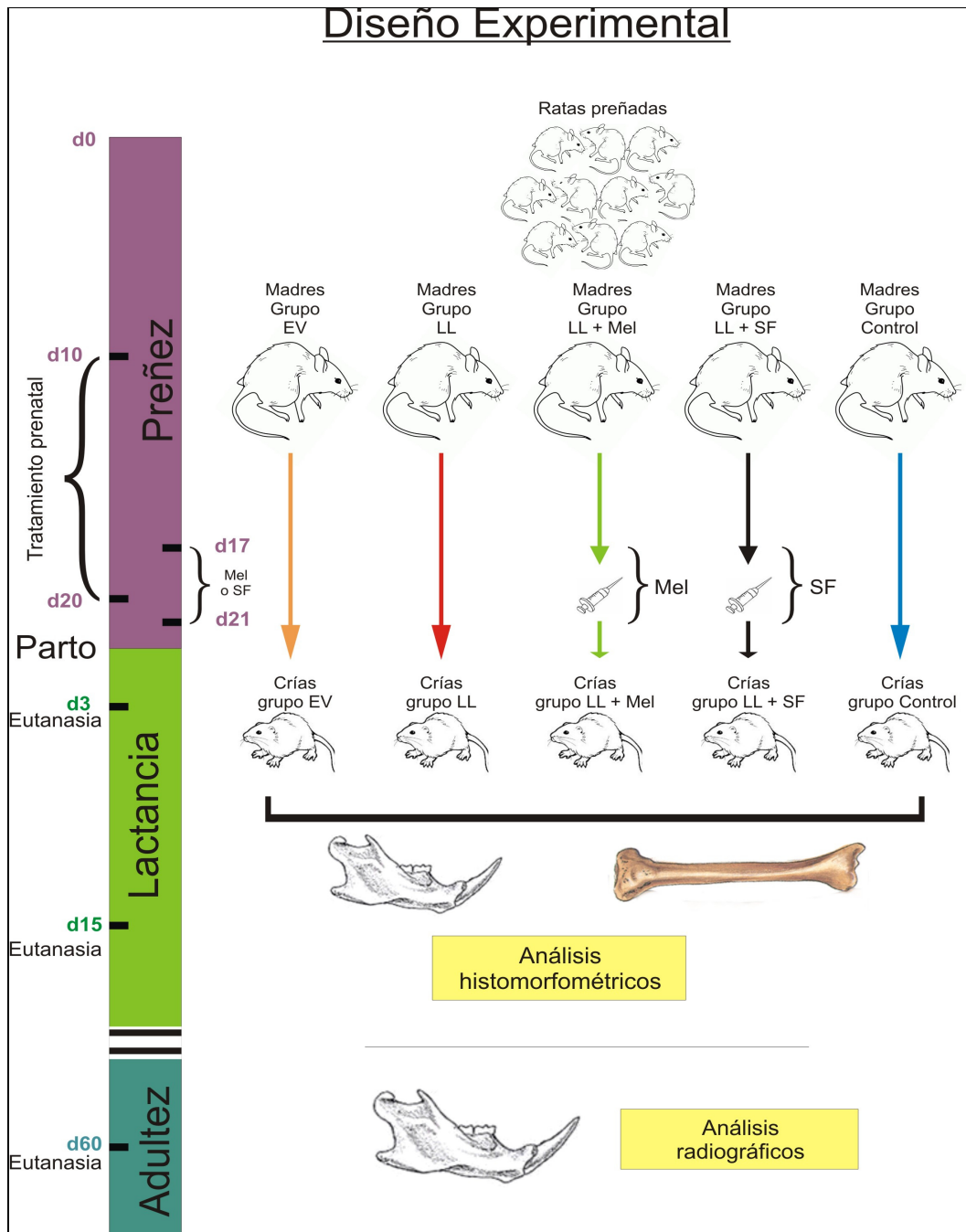
- **Grupo LL+Mel (Grupo sometido a luz constante crónica + administración de Melatonina).** Este grupo de madres fue sometido al mismo esquema de estrés por luz constante crónica y se le administró además melatonina por vía subcutánea en una dosis de 1mg/Kg peso corporal. La melatonina fue administrada a las 18h, al inicio de la noche subjetiva (dado que las madres están mantenidas en LL), desde el día 17 hasta el 21 de preñez dado que en condiciones fisiológicas los niveles de melatonina materno aumentan hacia el final de la preñez (Tamura y col., 2007). Este modelo fue previamente validado en estudios de nuestro laboratorio (Vermouth y col., 1995; Bellavía y col., 2006; Cisternas y col., 2010).

- **Grupo LL+SF (Grupo sometido a luz constante crónica + administración de solución fisiológica).** Este grupo fue sometido al modelo estresante bajo luz constante crónica y recibió inyección de solución fisiológica por vía subcutánea desde el día 17 al 21 de preñez.

- **Grupo Control.** Este grupo no recibió ningún tipo de tratamiento durante todo el experimento.

**Tabla II-1- Esquema experimental de Estrés Crónico Variado:**

Día 1: Inmovilización durante 45 minutos
Día 2: Ruido de alarma (80 dB) durante 1 hora
Día 3: Natación forzada individual durante 15 minutos
Día 4: Anestesia con éter hasta desvanecimiento (aproximadamente 1-3 minutos)
Día 5: Pinzamiento del tercio distal de la cola durante 1 minuto
Día 6: Inmovilización durante 45 minutos
Día 7: Natación forzada individual durante 15 minutos
Día 8: Ruido de alarma (80 dB) durante 1 hora
Día 9: Anestesia con éter hasta desvanecimiento (aproximadamente 1-3 minutos)
Día 10: Pinzamiento del tercio distal de la cola durante 1 minuto
Día 11: Natación forzada individual durante 15 minutos



**Figura II-1: Diseño experimental.** En el día 10 de gestación, las ratas preñadas fueron asignadas aleatoriamente a cada uno de los grupos. El tratamiento estresante se aplicó a las madres desde el día 10 al 20 de gestación. La Melatonina o la solución fisiológica fueron administradas por vía intraperitoneal del día 17 al 21 de preñez a las madres de los grupos correspondientes. Las crías fueron pesadas y se les realizó la eutanasia a los días 3, 15 ó 60 de vida. Según correspondió, sus mandíbulas y tibias fueron extraídas para estudios histomorfométricos y radiológicos.

### **II.3- Determinación de la ingesta diaria materna durante la preñez**

Las hembras preñadas de cada uno de los grupos experimentales fueron alojadas en jaulas individuales a partir del día 9 de preñez (un día previo al comienzo del tratamiento). Diariamente desde el día 9 al 20 de preñez y a la misma hora, se midió y colocó una cantidad determinada de alimento en cada una de las jaulas. Veinticuatro horas más tarde, se pesó el alimento remanente (no consumido) en el bolsillo de la jaula, como así también el alimento que había caído sobre un papel tipo cartulina ubicado en la base de la jaula con el fin de recoger el alimento derramado. En los casos en que los restos de alimento estuvieran mojados por la orina, se esperó a que se sequen y recién se los pesó. Posteriormente, estableciendo la diferencia entre la cantidad de alimento colocado y el remanente, se calculó la cantidad ingerida por día por cada una de las madres y se expresó en gramos.

### **II.4- Obtención y procesamiento de las muestras de crías nacidas de madres de los grupos experimentales**

A los días 3, 15 ó 60 de vida postnatal, se realizó la eutanasia de las crías mediante una sobredosis de pentobarbital sódico i.p. (150mg/kg de peso corporal). Previo a la eutanasia se registró el peso corporal de las crías nacidas de todos los grupos experimentales. Luego, se escindieron sus mandíbulas y tibias para estudios histológicos, histoquímicos, histomorfométricos y radiográficos (figura II-1).

#### **II.4.1- Procesamiento histológico de las muestras**

##### **Fijación**

La fijación se realizó con una solución de formaldehído-PBS al 10% pH 7.4. El tiempo de fijación no excedió las 48h. La relación volumen muestras-volumen solución fue de 1:10.

##### **Descalcificación**

Se utilizó solución de EDTA (ácido etilendiaminotetracético, Anedra) pH 7.2 a temperatura ambiente. El pH se ajustó con solución de hidróxido de sodio 1M. A los 15 días se controló el grado de descalcificación. Se renovó la solución

descalcificadora y se dejaron las muestras 15 días más. La relación volumen muestras-volumen solución fue igual a la utilizada para la fijación.

### **Deshidratación**

Luego de la fijación la deshidratación se realizó con concentraciones crecientes de acetona.

### **Inclusión**

Luego de la deshidratación se aclararon las piezas con xilol (Biopack, Argentina) y se incluyeron en parafina a 57°-60° durante 4h.

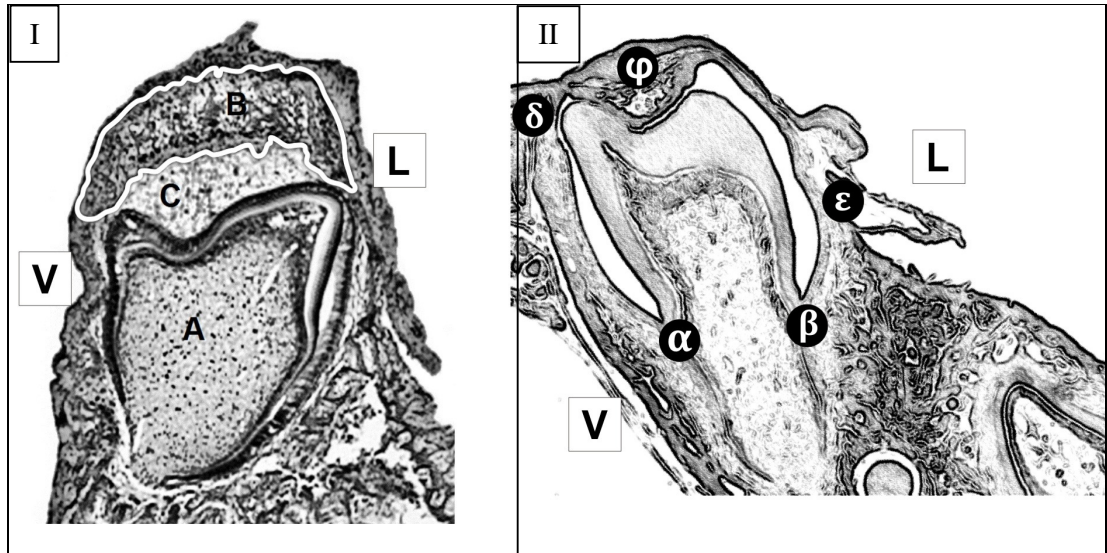
### **Corte con micrótopo**

Se realizaron cortes de aproximadamente 7 µm de espesor en un micrótopo de deslizamiento (Jung, Alemania) y controlados mediante observación directa bajo una lupa estereoscópica binocular (Nikon, Japan). Luego se realizó el montaje en portaobjetos estándares de vidrio. Los cortes y coloraciones se realizaron en la Cátedra de Histología y Embriología de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Buenos Aires.

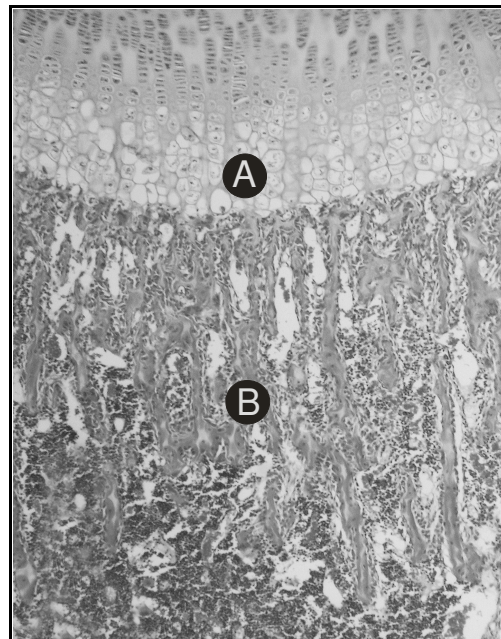
En las hemimandíbulas la orientación de los cortes fue en sentido bucolingual a nivel del primer molar inferior. Para poder establecer comparaciones entre los grupos, todos los cortes fueron hechos a la misma profundidad del primer molar. Con el fin de poder seleccionar el área más conveniente para la medición de los parámetros histomorfométricos se realizaron inicialmente cortes bucolinguales seriados de prueba que abarcaron en profundidad al primer molar de mesial a distal, tanto en maxilares de crías de 3 días como en los de 15 días de edad. Luego del análisis de todas las secciones obtenidas, se eligió un plano de corte a la altura mediocoronal en la cual se observaban los siguientes reparos anatómico histológicos que fueron utilizados como referencia del nivel de profundidad elegido para todos los casos:

- *En crías de 3 días:* primer molar con dos cúspides, ápice abierto, forma triangular, hueso supracoronal en forma de medialuna por encima del primer molar, y diente de crecimiento continuo de forma ovalada (Figura II-2a I).
- *En crías de 15 días:* primer molar con dos cúspides, clara visualización de los límites amelocementarios y de las tablas lingual y vestibular y sus respectivas crestas óseas, 2/3 de las raíces formadas y epitelio recubriendo el molar (Figura II-2a II).

En las tibias el plano de corte fue en sentido longitudinal a nivel de la epífisis proximal y en el cual se observaban claramente las zonas del cartílago de crecimiento y el tejido óseo subcondral (Figura II-2b).



**Fig II-2a I y II:** Plano de corte bucolingual del primer molar inferior en maxilares de crías de 3 días de edad (I) y de 15 días de edad (II). En todos los casos, los cortes seriados se realizaron a nivel mediocoronaral del molar. (I) A: germen del primer molar inferior. B: retículo estrellado. C: Hueso supracoronaral. (II) α: límite amelocementario vestibular. β: límite amelocementario lingual. δ: cresta ósea vestibular. ε: cresta ósea lingual. γ: epitelio bucal. Una vez obtenidos los cortes seriados de maxilar inferior y tibia, éstos fueron procesados para coloración con H&E o para detección de TRAP.



**Fig II-2b:** Plano de corte de tibia en sentido longitudinal a nivel de la epífisis proximal. Se observan las zonas del cartilago de crecimiento (A) y el tejido óseo subcondral (B)

#### **Coloración (Ver Anexo I)**

- **Hematoxilina-Eosina (H&E)**
- **Técnica para la detección de la Fosfatasa Ácida Tartrato Resistente (TRAP)**

#### **II.4.2- Procesamiento para el estudio radiográfico de las muestras**

Las hemimandíbulas de crías de 60 días de edad fueron escindidas y mantenidas en solución de formaldehído-PBS al 10% pH 7.4 hasta el momento de ser radiografiadas. Para la toma de las radiografías se utilizaron películas Kodak de grano extrafino. Las mandíbulas se colocaron encima de la película radiográfica sobre su cara lingual. La radiación fue aplicada a través de un aparato de rayos Futur X Denimed con un kilovoltaje de 75 kv y 14 mA, a una distancia foco-objeto de 10 cm y tiempo de exposición de 0.4 segundos. Las imágenes radiográficas fueron posteriormente escaneadas y digitalizadas para la medición del crecimiento mandibular. Las radiografías fueron realizadas en la Cátedra de Diagnóstico por Imágenes de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Córdoba.

#### **II.4.3- Obtención de fotografías de los cortes para el análisis histomorfométrico**

Tanto los cortes coloreados con H&E como los coloreados para la detección de TRAP fueron fotografiados con un fotomicroscopio Carl Zeiss Axioskop 2 (Carl Zeiss Mikroskopie, Jena, Alemania) a través de una cámara digital Canon Powershot 640 de 10.0 megapíxeles (Canon Inc., China). Las imágenes obtenidas fueron almacenadas en archivos de etiqueta (.tif/.tiff) o de compresión de imágenes (.jpg) de 3648 x 2736 píxeles. Además, se obtuvieron impresiones de las imágenes digitales en papel las cuales se usaron para la medición de algunos parámetros como se detallará oportunamente.

Para el estudio histomorfométrico los cortes fueron evaluados por observación a través de un microscopio óptico Zeiss Axioskop 2 (Carl Zeiss Mikroskopie, Jena, Alemania) o un microscopio Bausch & Lomb (Bausch & Lomb, Japan) y mediante el análisis de microfotografías digitalizadas de los cortes. Para las mediciones sobre las fotos digitalizadas se utilizó el programa Image Pro Plus

versión 4.1 (Media Cybernetics Inc; EE.UU., 2006) provisto para Microsoft Windows.

## **II.5- Mediciones en crías de 3 días de vida**

### **II.5.1 Mandíbula o maxilar inferior**

#### **Mediciones en cortes coloreados con la técnica de H&E**

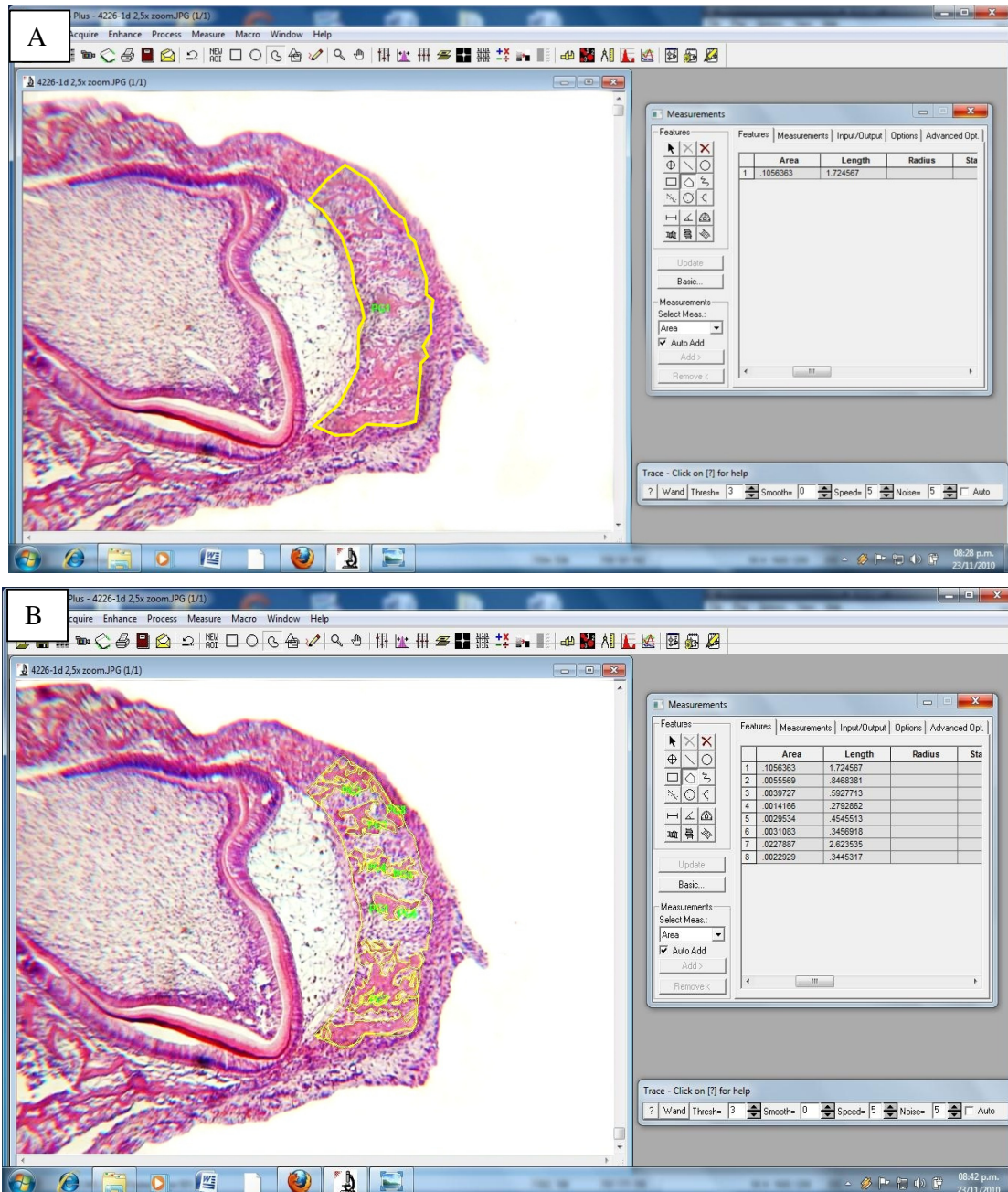
##### **a) Determinación del volumen óseo [BV/TV (%)] de la zona supracoronal de la canastilla ósea del germen del primer molar mandibular**

El BV/TV (%) se midió sobre microfotografías digitalizadas de cortes bucolinguales del primer molar inferior mediante el programa Image Pro Plus. Las fotografías se tomaron a aumentos de 25X y 40X que posteriormente fueron digitalizadas como se explicó anteriormente.

Para la determinación del volumen óseo se delimitó un área de hueso de la canastilla ubicado por encima del germen del primer molar en erupción. Durante la fase intraósea de la erupción dentaria, se formará en esa zona la vía eruptiva a través de un proceso de resorción ósea estrictamente regulado local y sistémicamente (Wise y col., 2002). Esta zona con forma de medialuna a la altura mediocoronal es el área de la canastilla en donde se midieron todos los parámetros histomorfométricos y será denominada en adelante **hueso supracoronal**. Dentro del área del hueso supracoronal, se delimitó y midió la superficie de trabéculas óseas. Dado que el hueso inmaduro es muy reticular, el reconocimiento de los límites y delimitación de las trabéculas fue controlado por la observación directa del preparado al microscopio, simultáneamente a la medición sobre la foto digitalizada. A fin de reconfirmar esos resultados, se realizaron las mediciones a dos aumentos: 25X y 40X. Las mediciones realizadas fueron exportadas a un procesador de datos mediante el cual se obtuvo el porcentaje de superficie trabecular en relación al área ósea considerada como total (Figura II-3 A, B y C).



## Medición del Volumen Óseo supracoronar



**Figura II-3.** Capturas de pantalla del programa Image Pro Plus 4.1. A la izquierda de cada captura de pantalla, se observa una microfotografía de un corte del primer molar inferior coloreado con H&E de una cría de 3 días de edad. En **A**, se muestra la delimitación del área de hueso supracoronar considerada como área total. En **B**, se muestra marcado en amarillo

el contorno trabecular en la zona de hueso supracoronal. A la derecha, los datos cuantificados en micrómetros cuadrados son exportados luego a un procesador. El resultado se expresa como porcentaje de volumen óseo en relación al área ósea total.

**b) Determinación del número de osteoclastos (N.Oc/mm<sup>2</sup>) y de sus núcleos (N.Nc/Oc) en la zona supracoronal de la canastilla ósea del germen del primer molar mandibular**

La identificación y conteo de osteoclastos y sus núcleos se realizó sobre los cortes teñidos con H&E bajo la observación al microscopio óptico y mediante las impresiones en papel de las imágenes digitalizadas. Posteriormente, esos datos fueron confirmados en los cortes coloreados mediante la técnica histoquímica para la detección enzimática TRAP, enzima presente en pre-osteoclastos y en osteoclastos. En las fotos impresas de cada uno de los preparados se marcó el límite del área correspondiente al hueso supracoronal considerada como superficie ósea total (figs. II-2 y II-3) y que había sido medida previamente con el programa Image Pro Plus 4.1. Luego se contó bajo observación al microscopio y a un aumento de 1000X, la cantidad de osteoclastos presentes en esa área como así también el número de sus núcleos. Se consideró osteoclastos a aquellas células gigantes de citoplasma acidófilo, en contacto con una superficie trabecular y con al menos dos núcleos. La foto impresa con el límite marcado permitió descartar los osteoclastos ubicados más allá de la zona delimitada. El número de osteoclastos se relacionó así con la superficie medida y luego se refirió su cantidad a una superficie de 1mm<sup>2</sup> de modo tal de hacer posible las comparaciones entre los distintos cortes de los cinco grupos.

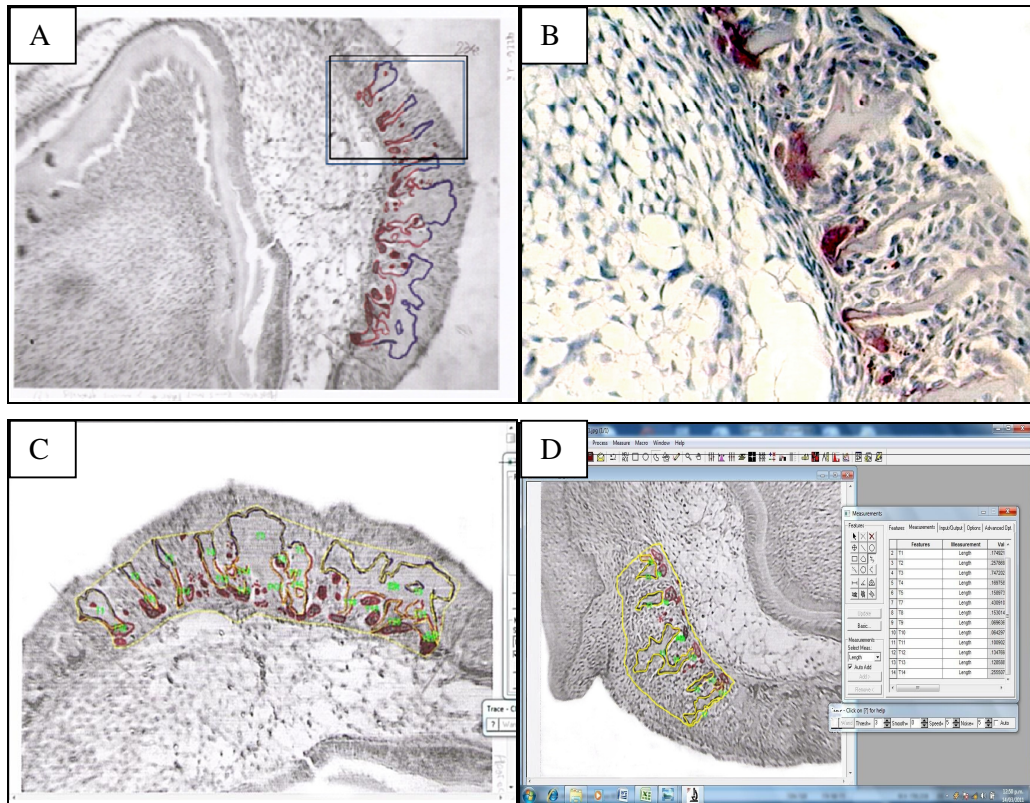
El número de núcleos se contó por cada osteoclasto y fue referido a cada uno de ellos. Se obtuvo el valor medio del número de núcleos para cada uno de los grupos estudiados.

**Mediciones en cortes coloreados con la técnica histoquímica para detección de TRAP**

**a) Evaluación de la superficie trabecular TRAP+ [TRAP (+)/BS (%)],**

Para la medición de este parámetro se utilizaron microfotografías de los cortes coloreados con la técnica para detección de TRAP a un aumento de 25X y las impresiones en papel de esas fotos. Los cortes fotografiados fueron observados y analizados al microscopio óptico a un aumento de 400X y 1000X para medir la

superficie trabecular TRAP+ en hueso supracoronar de la canastilla ósea. De esta manera, sobre las impresiones se marcaron las superficies óseas TRAP+ y las superficies TRAP-. Posteriormente esas impresiones marcadas, fueron escaneadas para obtener imágenes digitales sobre las cuales se midió con el programa Image Pro Plus 4.1, la superficie trabecular marcada como TRAP+ y la superficie marcada como TRAP- (Figura II-4). De esta forma se obtuvo el porcentaje de superficie trabecular TRAP+ en relación a la superficie trabecular total del hueso supracoronar de la canastilla ósea de crías para cada uno de los grupos experimentales.



**Figura II-4. Determinación de la superficie trabecular TRAP+.** Las microfotografías de cortes de maxilar inferior de crías de 3 días de vida fueron impresas en papel. Sobre las impresiones se marcaron en color rojo las áreas trabeculares TRAP+ y en azul, las TRAP- (A) según lo que se observaba en los cortes coloreados con la técnica para detección de TRAP al microscopio óptico con aumentos de 400X y 1000X (B). Posteriormente, las impresiones marcadas fueron escaneadas y mediante el programa Image Pro Plus, se cuantificó la superficie trabecular TRAP+ y TRAP- (C y D). Los resultados se expresaron como porcentaje en relación a la superficie total del hueso supracoronar.

**b) Determinación de número de osteoclastos TRAP+ (N.Oc TRAP+/mm<sup>2</sup>) y número de osteoclastos TRAP- (N.Oc TRAP-/mm<sup>2</sup>)**

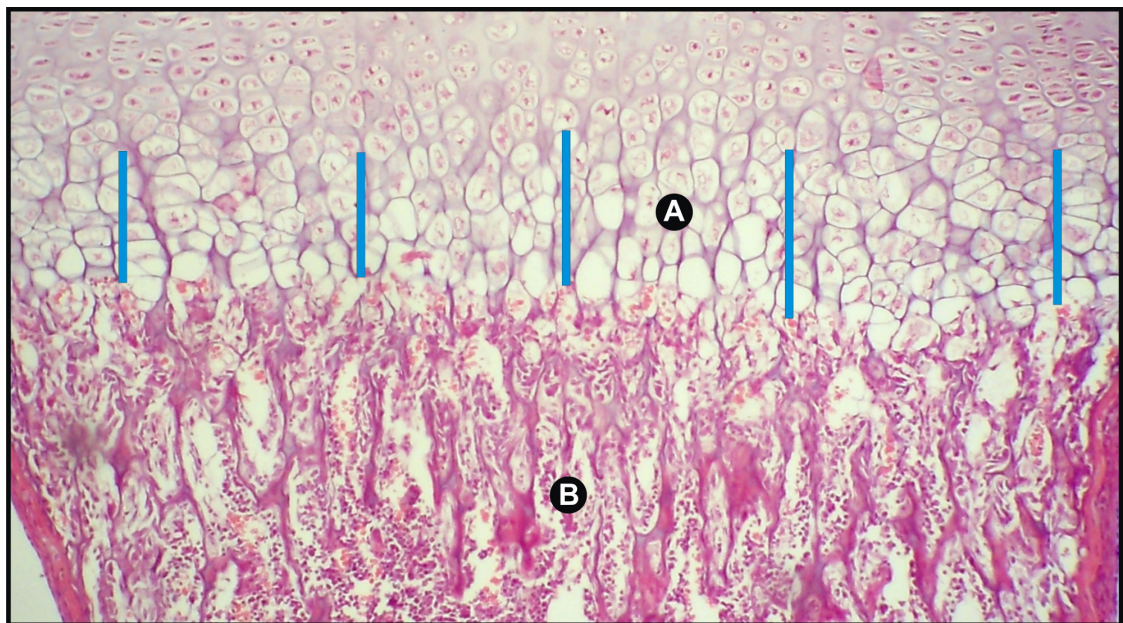


Los osteoclastos fueron observados con el microscopio óptico a aumentos de 400X y 1000X. Se contó la totalidad de osteoclastos presentes en el hueso supracoronaral (fig. II-2) y se diferenció los que se marcaron positivamente con la técnica para detección de TRAP (Oc TRAP+) de los que no (OC TRAP-). Se consideró osteoclastos a aquellas células con al menos dos núcleos y en contacto con una superficie trabecular. El número de osteoclastos TRAP+ y osteoclastos TRAP- de cada uno de los cortes fueron referidos a  $1\text{mm}^2$ .

## II.5.2 Tibias

### a) Determinación en tibias del espesor de cartílago hipertrofiado [HpZ.Th (mm)]

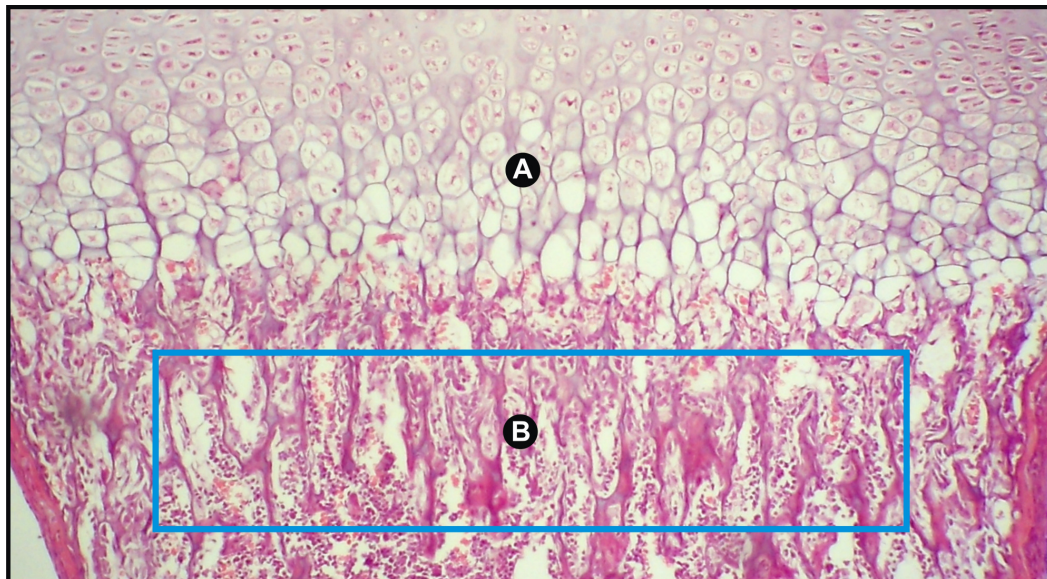
Para la medición del espesor de la zona de cartílago hipertrofiado [HpZ.Th(mm)] se marcaron sobre las fotografías cinco líneas rectas cuya longitud se extendió desde el comienzo del estrato de cartílago hipertrofiado hasta la zona de trabéculas mixtas. La primera línea se trazó exactamente en el centro del ancho de la tibia, luego dos líneas paralelas a ésta y adyacentes a los extremos de la tibia y finalmente dos líneas paralelas más, equidistantes entre las anteriores. A partir de esas cinco longitudes, se calculó un promedio que se usó como medida de longitud del espesor de cartílago de cada tibia. (Figura II-5)



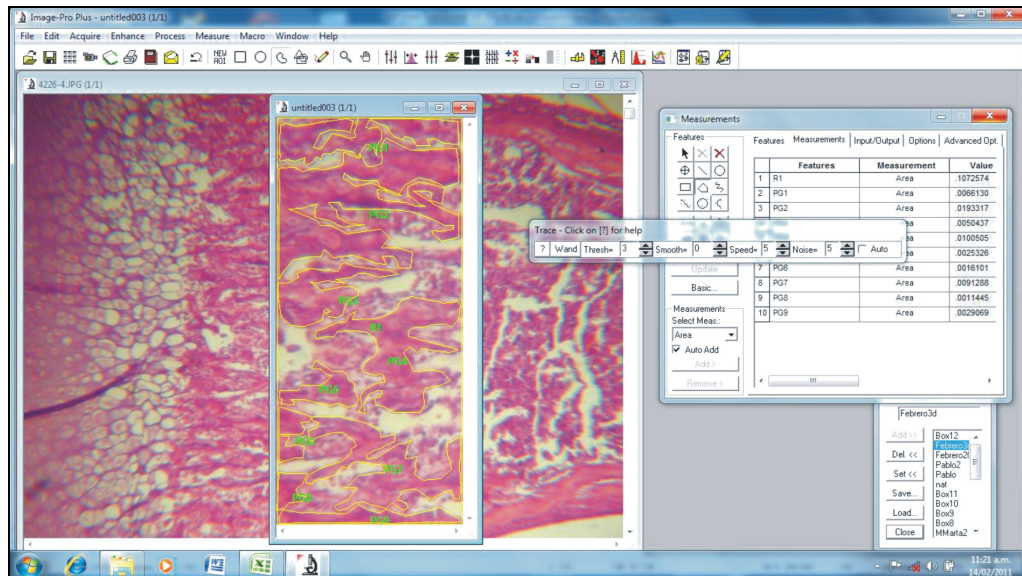
**Figura II-5.** Microfotografía de un corte longitudinal de tibia de una cría control de 3 días de edad coloreado con H&E. En azul se muestran las líneas marcadas con el programa Image Pro Plus 4.1 para la medición del espesor de cartílago hipertrofiado. **A:** Zona de cartílago hipertrofiado. **B:** Hueso subcondral.

**b) Determinación en tibias del volumen óseo subcondral [BV/TV (%)]**

Para la medición del volumen óseo subcondral (BV/TV %), se delimitó y midió un área representativa en el tejido óseo subcondral. Esta área fue la misma para todos los casos y se la consideró como superficie ósea total. El volumen óseo fue expresado como la relación entre hueso trabecular sobre la superficie ósea total y expresado en porcentaje. La superficie ósea total comprendió al hueso trabecular más el tejido mesenquimático presente en el área predeterminada. (Figs. II-6 y II-7).



**Figura II-6.** Microfotografía de un corte longitudinal de tibia de una cría control de 3 días de edad coloreado con H&E. Se seleccionó un área representativa del hueso subcondral (**A**) y evaluó el volumen trabecular dentro de ella. Los datos fueron cuantificados y los resultados se expresaron como porcentaje de volumen óseo trabecular en relación al volumen óseo total. **B:** Cartílago hipertrofiado.



**Figura II-7.** Captura de pantalla de la medición del volumen óseo subcondral con el programa Image Pro Plus. A la izquierda se muestra una microfotografía de tibia de una cría de 3 días de edad y la delimitación del contorno trabecular en el área predeterminada. A la derecha, la cuantificación de las mediciones que luego se exportan a un procesador de datos.

## II.6 - Mediciones en crías de 15 días de vida

### II.6.1 Mandíbula o maxilar inferior

#### a) Determinación del Grado de Erupción Dentaria [TED (mm)]

En la literatura científica están escasamente descritos los métodos para determinar el grado de erupción dentaria a través del estudio histomorfométrico. La mayoría considera sólo el grado de erupción por uno de los lados del diente, generalmente por vestibular. Teniendo en cuenta que el proceso eruptivo implica el movimiento de un elemento dentario a través de la canastilla ósea siguiendo el canal eruptivo, es importante que la medición histomorfométrica del grado de erupción considere al menos un punto óseo y un punto dentario. De esta forma se descartaron las técnicas que solo determinaban grado de erupción a partir de referencias exclusivamente óseas o dentarias. Las mediciones realizadas en el presente trabajo se basaron en dos métodos histomorfométricos publicados en la literatura científica (Pujadas Bigi y col., 2003 ; Villarino y col., 2005). De esta forma, se llevaron a cabo 4 técnicas diferentes para medir el grado de erupción del primer molar. Con todas ellas se encontraron las mismas diferencias estadísticamente significativas al realizar las comparaciones entre grupos. Se tomaron fotografías de



cada uno de los cortes coloreados con H&E a un aumento de 40X. Las fotografías fueron digitalizadas y mediante el uso del programa Image Pro Plus versión 4.1 se midió el Grado de Erupción Dentaria. Dado que los molares no están erupcionados en este estadio del proceso eruptivo, en todas las técnicas utilizadas, las mediciones fueron expresadas en valores negativos. Mayores distancias indican menor grado de erupción dentaria. Los resultados que se publican en esta tesis son los hallados con la técnica IV dado que utiliza como referencia los límites amelocementarios vestibular y lingual para las mediciones histomorfométricas. Estos puntos son los más estables y regulares en los cortes orientados. No obstante, se describen a continuación todas las técnicas utilizadas:

### Técnica I (Fig. II-8)

Sobre las microfotografías digitales se traza una línea recta (**línea a**) que une los extremos de la vaina de Hertwig por vestibular ( $\alpha$ ) y lingual ( $\beta$ ). Luego, una línea recta paralela a la anterior que pase por el punto más superior de la cúspide vestibular ( $\delta$ ) del primer molar inferior (**línea b**) y una línea paralela a la anterior que pase por la cresta ósea lingual ( $\epsilon$ ) (**línea c**). Las distancias b-a y c-a se utilizan como dato para la evaluación del grado de erupción dentaria por vestibular y lingual respectivamente (Pujadas Bigi et al., 2003). V: Lado vestibular. L: Lado lingual.

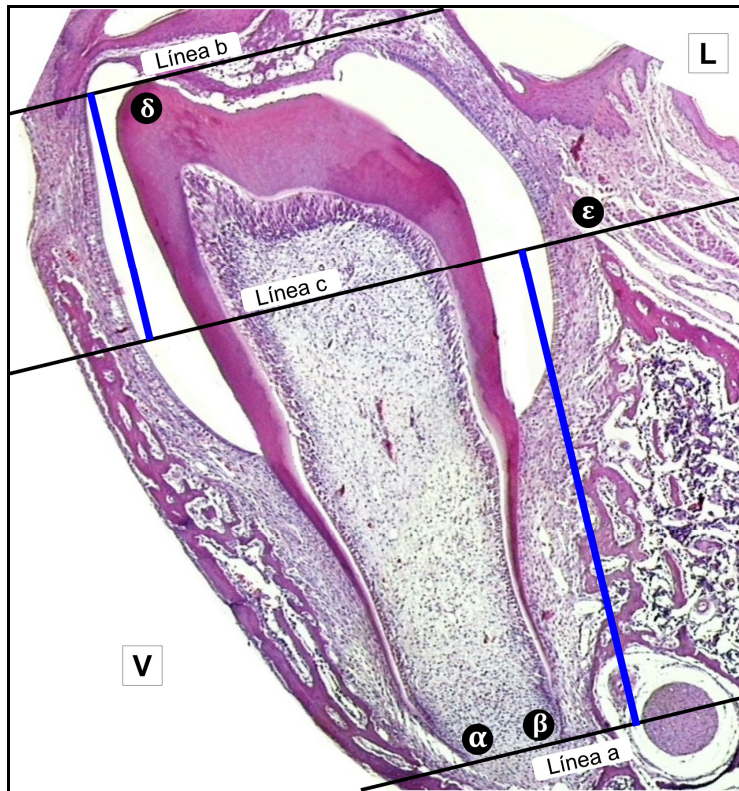


Figura II-8

### Técnica II (Figura II-9)

Sobre las microfotografías digitales se traza una línea recta paralela al eje longitudinal del primer molar inferior y una línea recta perpendicular a la anterior que pase por el límite amelocementario vestibular ( $\lambda$ ) (**línea a**). Luego se traza una línea recta paralela a la línea "a" que pase por el punto superior de la cresta ósea vestibular ( $\phi$ ) (**línea b**). Posteriormente se trazó una línea paralela a la anterior que pase por la cresta ósea lingual ( $\epsilon$ ) (**línea c**). Las distancias b-a y c-a se utilizan como dato para la evaluación del grado de erupción dentaria por vestibular y lingual respectivamente puesto que representan la distancia existente entre el límite amelocementario y la cresta ósea (Pujadas Bigi et al., 2007). V: Lado vestibular. L: Lado lingual.

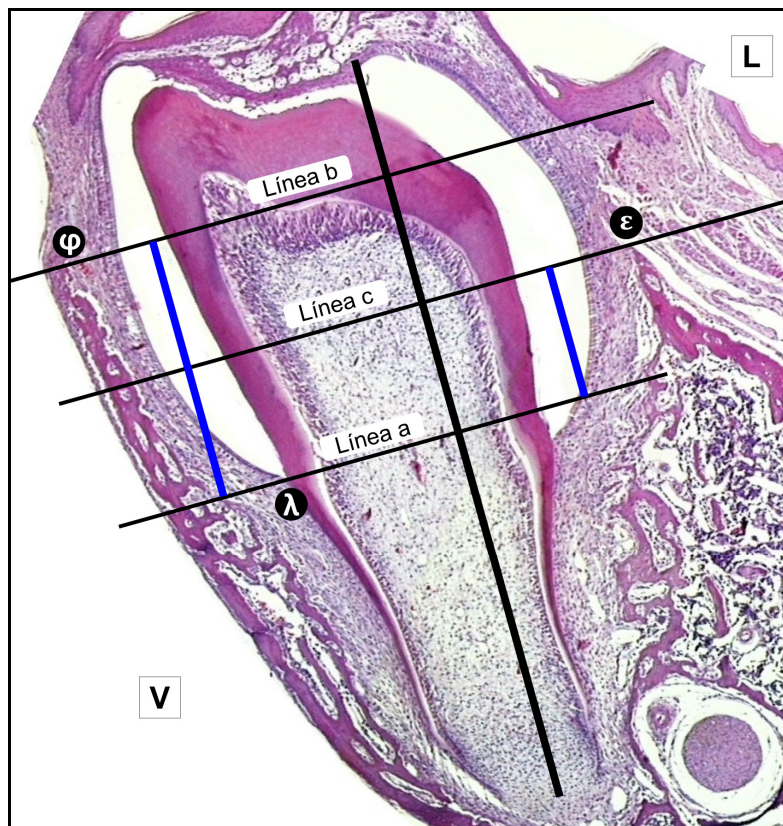


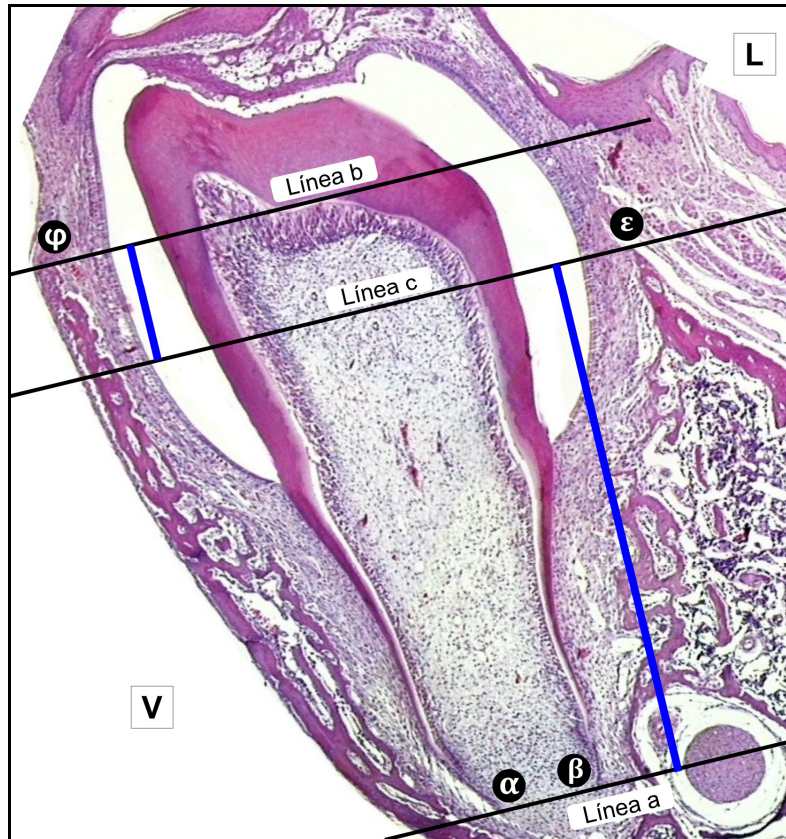
Figura II-9

### Técnica III (Figura II-10)

Sobre las microfotografías digitales se traza una línea recta que una los extremos de la vaina de Hertwig por vestibular ( $\alpha$ ) y lingual ( $\beta$ ) (**línea a**). Luego, una línea recta paralela a la anterior que pase por el punto superior de la cresta ósea



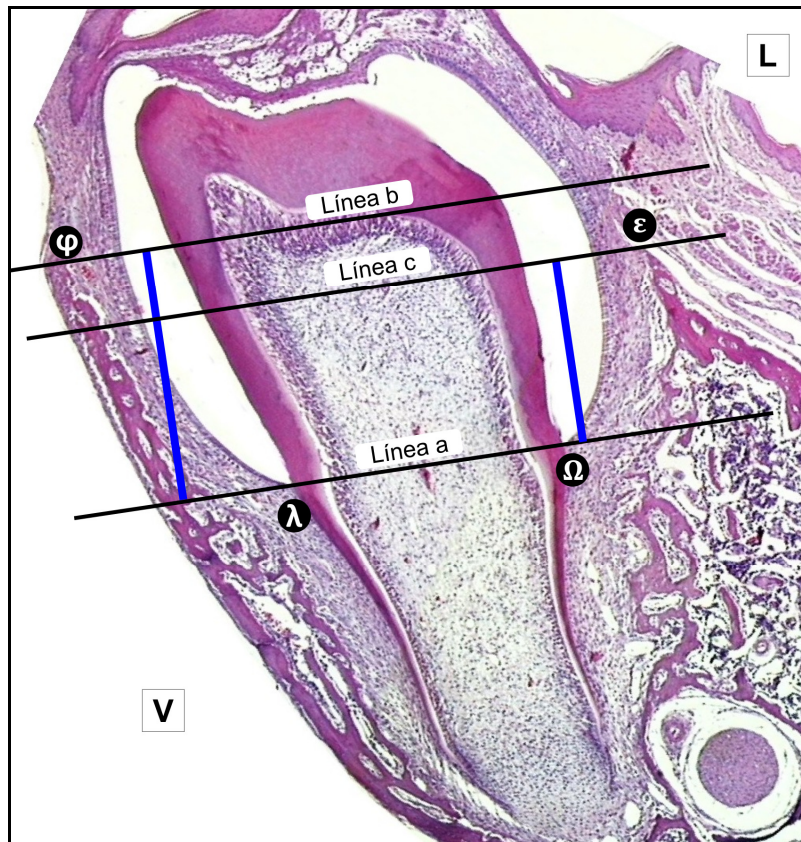
vestibular ( $\varphi$ ) (**línea b**) y una línea paralela a la anterior que pase por la cresta ósea lingual ( $\epsilon$ ) (**línea c**). Las distancias b-a y c-a se utiliza como dato para la evaluación del grado de erupción dentaria por vestibular y lingual respectivamente puesto que representan la distancia existente entre el límite amelocementario y la cresta ósea (Villarino M y col., 2005). V: Lado vestibular. L: Lado lingual.



**Figura II-10**

**Técnica IV** (Figura II-11)

Sobre las microfotografías digitales se traza una línea recta que una los límites amelocementarios vestibular ( $\alpha$ ) y lingual ( $\beta$ ) (**línea a**). Luego, una línea recta paralela a la anterior que pase por el punto superior de la cresta ósea vestibular ( $\varphi$ ) (**línea b**) y una línea paralela a la anterior que pase por la cresta ósea lingual ( $\epsilon$ ) (**línea c**). Las distancia b-a y c-a se utiliza como dato para la evaluación del grado de erupción dentaria por vestibular y lingual respectivamente puesto que representan la distancia existente entre el límite amelocementario y la cresta ósea. V: Lado vestibular. L: Lado lingual.



**Figura II-11**

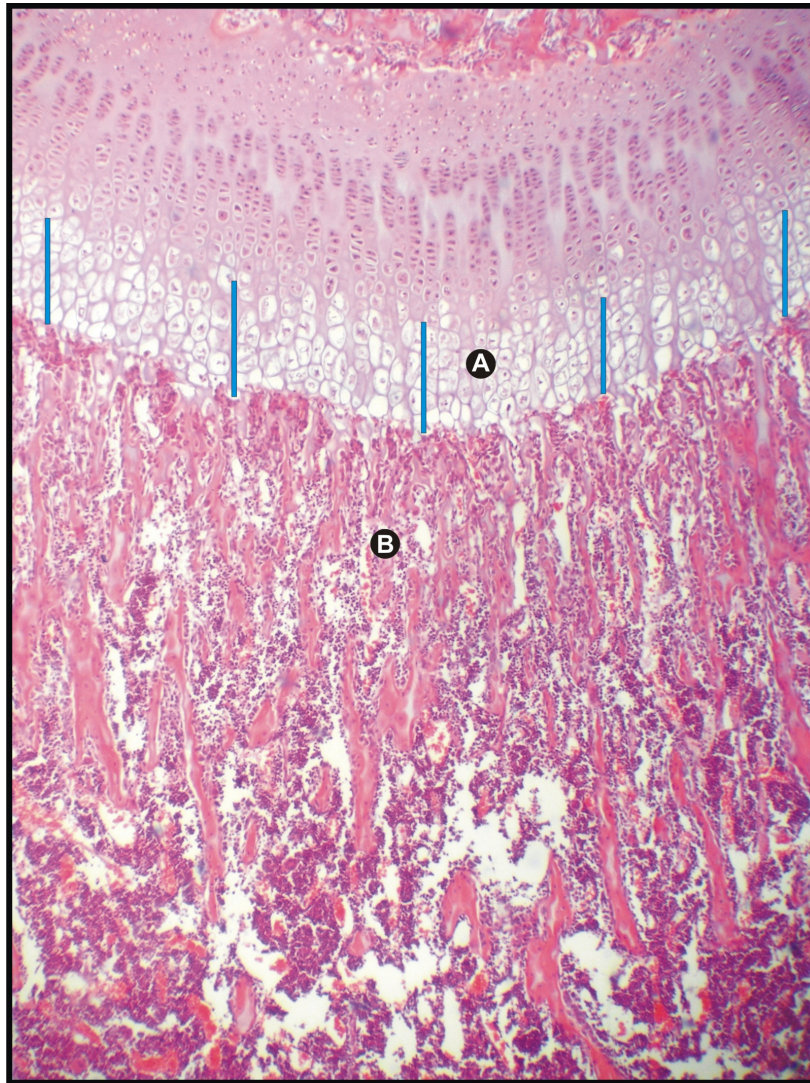
### **II.6.2 Tibias**

Se tomaron microfotografías de cada uno de los cortes coloreados con H&E y luego esas imágenes se digitalizaron para su posterior análisis y medición con el programa Image Pro Plus versión 4.1.

#### **a) Determinación del espesor del cartílago hipertrofiado [HpZ.Th (mm)]**

Para la medición del espesor del cartílago hipertrofiado se realizó la misma técnica utilizada para medir esta variable en tibias de crías de 3 días de vida (ver II-5-2-a). Figura II-12.

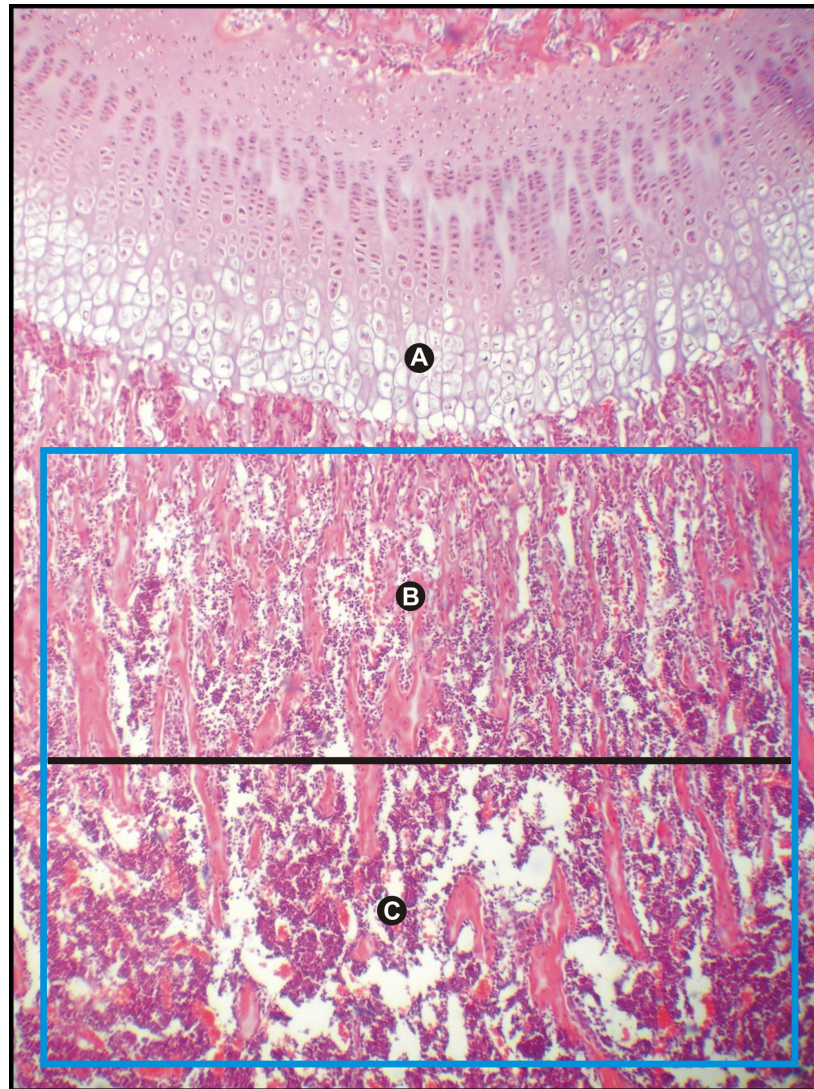




**Figura II-12.** Microfotografía de un corte longitudinal de tibia de una cría control de 15 días de edad coloreado con H&E. En azul se muestran las líneas marcadas con el programa Image Pro Plus 4.1 para la medición del espesor de cartílago hipertrofiado. **A:** Zona de cartílago hipertrofiado. **B:** Hueso subcondral.

#### **b) Determinación del espesor del volumen óseo subcondral [(BV/TV (%)]**

Para la medición del **volumen óseo subcondral**, se subdividió el hueso subcondral en las zonas correspondientes a la esponjosa primaria y esponjosa secundaria tal como se muestra en la siguiente microfotografía:

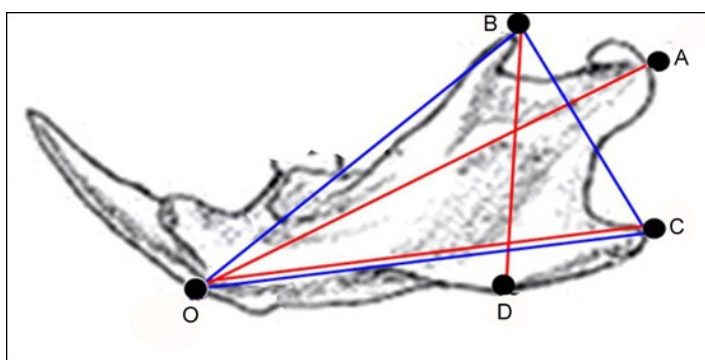


**Figura II-13:** Microfotografía de un corte longitudinal de tibia de una cría control de 3 días de edad coloreado con H&E. Se evaluó el volumen óseo subcondral total (recuadro azul). Luego dicha área fue subdividida en dos sectores: sector de esponjosa primaria (**B**) y sector de esponjosa secundaria (**C**). En ambos sectores también se evaluó el volumen óseo. **A:** Cartílago Hipertrofiado.

## II.7 - Mediciones en crías de 60 días de vida

### II.7.1- Determinación del Grado de crecimiento mandibular

Sobre las imágenes escaneadas y digitalizadas se marcaron un conjunto de puntos fijos y se trazaron líneas rectas que permiten medir parámetros indicadores del desarrollo y crecimiento mandibular tales como altura, base, longitud y área (Eratalay et al., 1981; Giglio et al., 2001; Villarino et al., 2005) según se indica en la figura II-14:



**Figura II-14**

**Punto O:** Punto más anterior e inferior de la mandíbula

**Punto A:** Punto medio del cóndilo mandibular

**Punto B:** Punto más superior de la apófisis coronoides

**Punto C:** Punto más posterior del gonion mandibular

**Punto D:** Punto más inferior de la rama mandibular

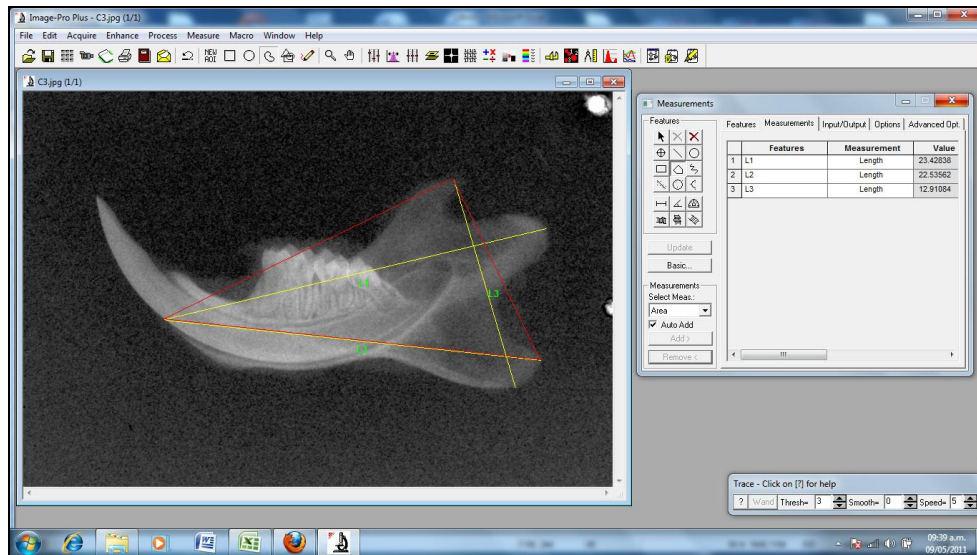
**Distancia O-A:** Largo mandibular

**Distancia O-C:** Base mandibular

**Distancia B-D:** Altura mandibular

**Área BOC:** Área mandibular





**Figura II-15.** Captura de pantalla de una radiografía de mandíbula de 60 días donde se muestra el método de medición del crecimiento mandibular con el programa Image Pro Plus 4.1.

## II.7- Análisis Estadístico

Los datos se hallan expresados como media aritmética y error estándar. Los valores de p menores que 0,05 fueron considerados significativos.

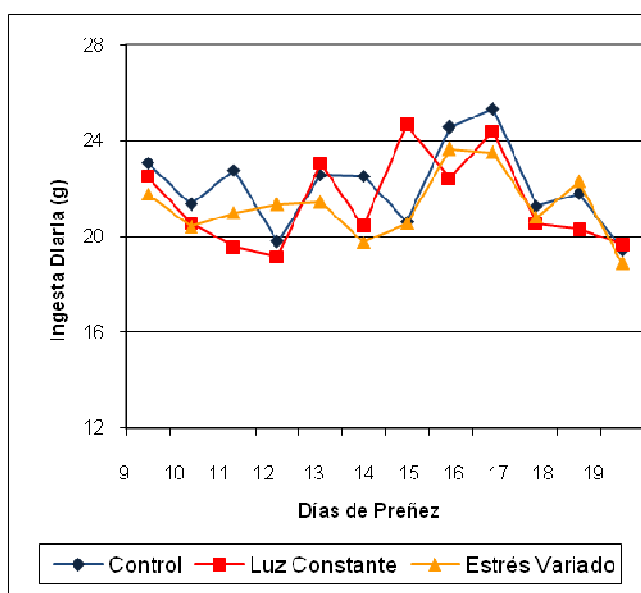
Para el análisis estadístico de los datos numéricos durante la comparación entre los grupos experimentales, se utilizó el test estadístico de ANOVA y posterior test de Bonferroni como test post hoc.

### ***III. RESULTADOS***

### III-A. ESTRÉS PRENATAL

#### Ingesta de alimento de las madres durante la preñez

Desde un día previo al comienzo del tratamiento prenatal y hasta la finalización del mismo, se midió la cantidad de alimento ingerido diariamente por madre preñada en forma individual. No se hallaron diferencias significativas en la cantidad ingerido entre madres de los distintos grupos estudiados ( $p > 0,05$ ). La tendencia de ingesta fue similar en todos los grupos a lo largo de la preñez, observándose una ligera caída hacia el final de la gestación.



**Figura III-1. Ingesta diaria materna de alimento.** En el grafico se representa la cantidad de alimento consumido por cada una de las madres de los tres grupos estudiados desde el día 9 al 21 de gestación ( $n=8$  por grupo). No se encontraron diferencias significativas a lo largo del tratamiento entre ninguno de los grupos.

#### Peso Corporal de las Crías

Se determinó el peso de cada una de las crías en los tres grupos previo al sacrificio. A los 3 y 15 días de vida el peso de crías nacidas de madres tratadas fue significativamente menor que las del control ( $p < 0,01$ ), mientras que a los 60 días sólo las crías de madres sometidas a LL permanecieron con valores significativamente menores al control ( $p < 0,01$ ).



	<b>3 días</b>	<b>15 días</b>	<b>60 días</b>
<b>Control</b>	8,92±0,47(20)	30,66±1,55(14)	188,94±4,68(10)
<b>EV</b>	8,17±0,43(18)*	25,90±1,35(14)*	184,64±5,05(9)
<b>LL</b>	7,55±0,52(19)**	25,53±2,02(13)*	164,10±9,04(8)*

**Tabla III-1. Efecto de la exposición materna a EV o LL sobre el peso corporal de crías a los 3, 15, y 60 días de edad.** Los resultados se expresan como la media ± error estándar; número de animales entre paréntesis; \*: p<0.05; \*\* p<0.01.

### III.A-1 Crías de 3 días de vida

#### III.A.1-1 Mandíbula o maxilar inferior

Las mediciones en mandíbulas de crías de 3 días de edad se realizaron en la zona supracoronal de la canastilla ósea que rodea al germen del primer molar mandibular, lugar donde se formará posteriormente el canal eruptivo mediante un proceso de resorción ósea. Los parámetros histomorfométricos estudiados en esa zona fueron los siguientes:

En cortes coloreados con la técnica de H&E:

- Volumen óseo [BV/TV(%)],
- Número de osteoclastos (N.Oc/mm<sup>2</sup>) y
- Número de núcleos por Osteoclasto (N.Nc/Oc).

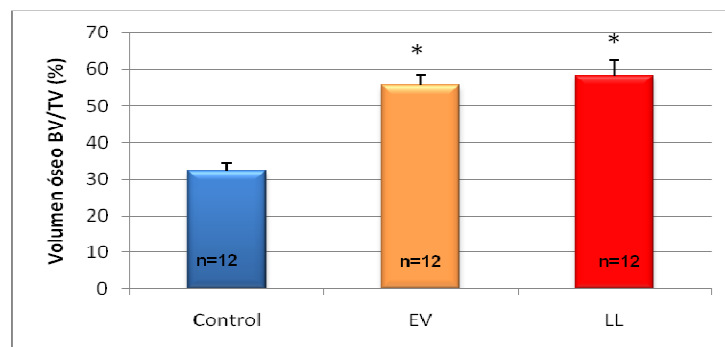
En cortes coloreados para la detección de TRAP:

- Superficie trabecular TRAP+ [TRAP+/BS (%)], y
- Número de osteoclastos TRAP+ (N.Oc TRAP+/mm<sup>2</sup>) y
- Número de osteoclastos TRAP- (N.Oc TRAP-/mm<sup>2</sup>).

### Coloración con la técnica de H&E

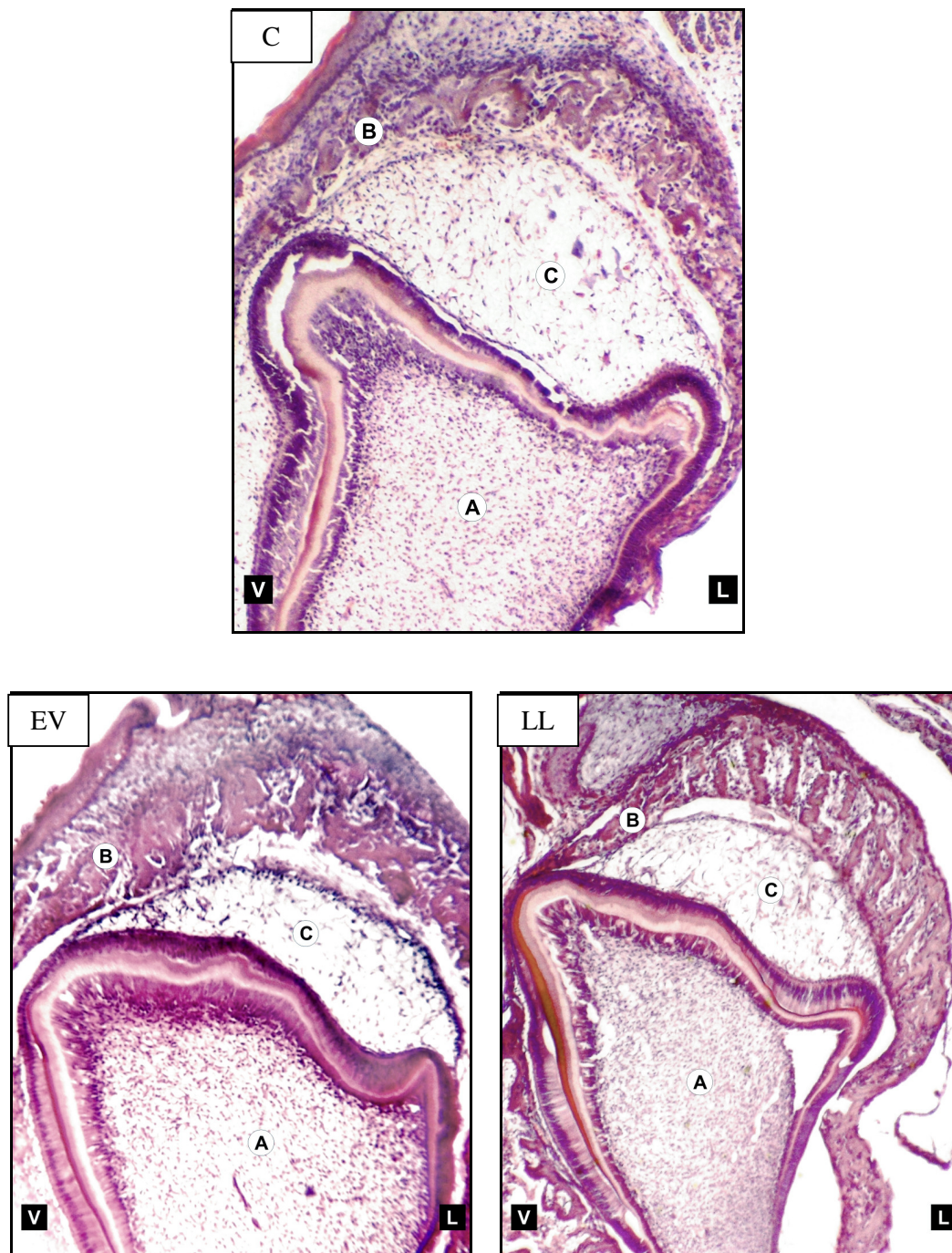
#### a- Volumen Óseo

En crías de tres días de edad el porcentaje de volumen óseo trabecular [BV/TV (%)] fue significativamente mayor en crías nacidas de madres sometidas a LL o a EV en comparación con el grupo Control (C: 32,31±2,16 vs EV: 55,53±3,07 y LL: 58,14±4,24 ; p< 0.01). Figuras III-2 y III-3.



**Figura III-2. Volumen óseo supracoronal.** Se registró un incremento significativo en el volumen óseo de 1.80 veces en crías del grupo LL y de 1.72 veces en crías nacidas de madres sometidas a EV, respecto al control. C vs EV y LL; \* p<0.01, ANOVA Bonferroni.

A continuación se muestran microfotografías representativas:

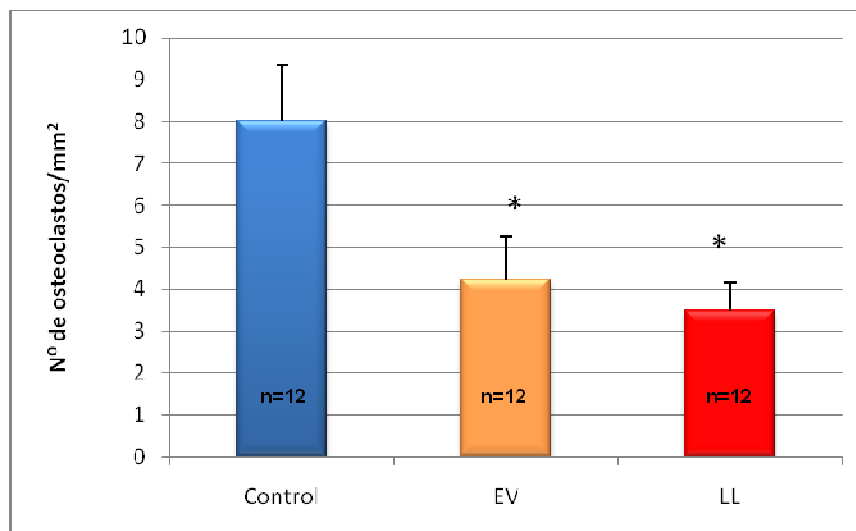


**Figura III-3. Volumen óseo supracoronar de la canastilla ósea.** Las imágenes muestran la porción supracoronar del hueso de la canastilla ósea que rodea al germen del primer molar inferior. Tanto en crías del grupo EV como del LL el volumen óseo fue significativamente mayor en comparación con el de crías controles. B: Hueso supracoronar. C: Retículo estrellado. V: Lado vestibular. L: Lado lingual. Coloración H&E. Magnificación 25X.

El aumento de volumen óseo en crías nacidas de madres tratadas, podría indicar una disminución de la actividad osteoclástica de resorción en la zona de formación del canal eruptivo. Para confirmar esta observación se midió también en la misma zona el número de osteoclastos por área.

### b) Número de osteoclastos por área

El número de Osteoclastos por  $\text{mm}^2$  (**N.Oc/mm<sup>2</sup>**) en hueso supracoronaral de la canastilla ósea del germen del primer molar mandibular fue significativamente menor tanto en crías nacidas de madres sometidas a LL como a EV comparado con el grupo Control (C:  $8,03 \pm 1,31$ ; EV:  $4,23 \pm 1,04$ ; LC:  $3,5 \pm 0,65$ ;  $p < 0,01$ ). Figuras III-4 y III-5.

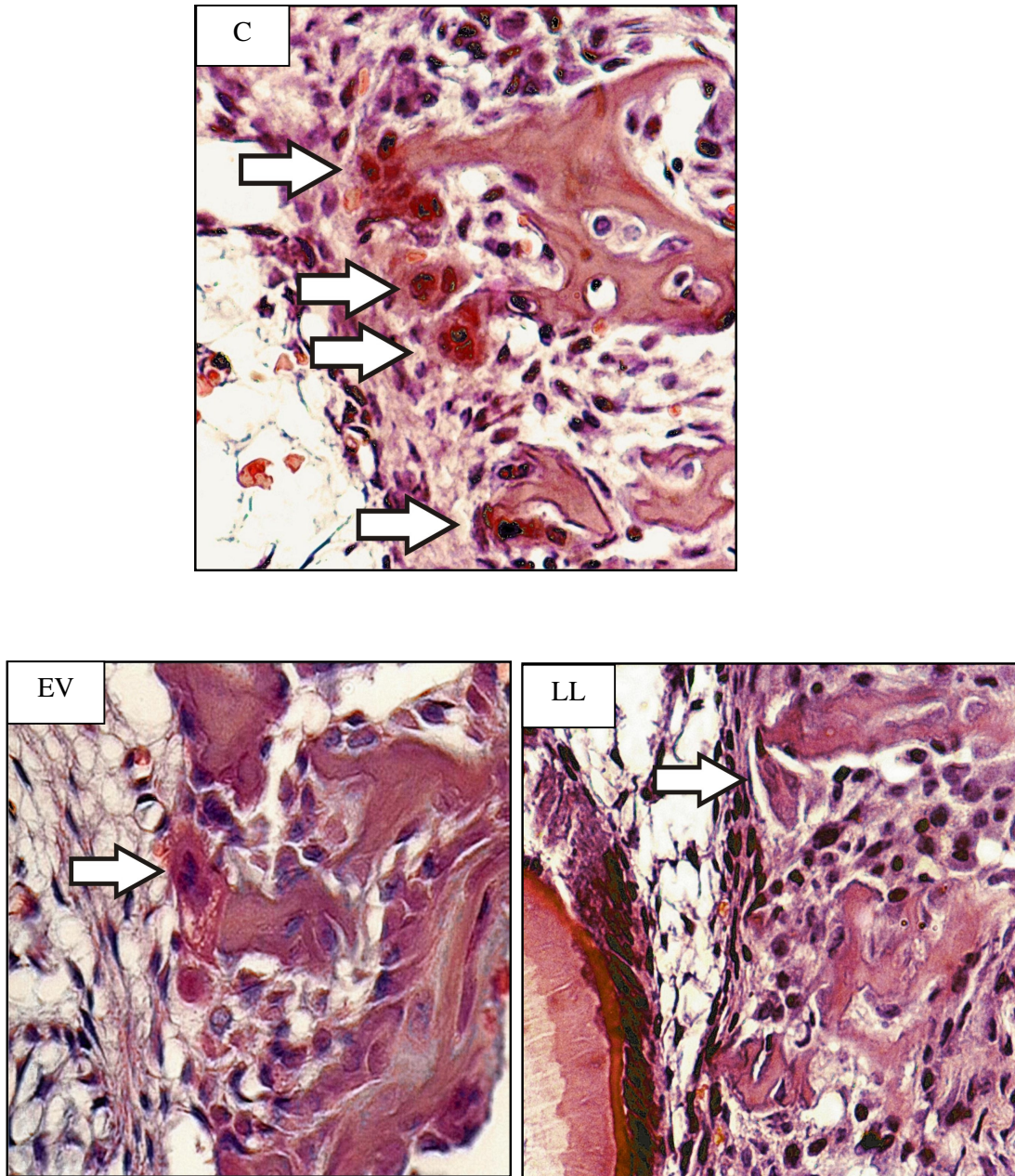


**Figura III-4. Número de osteoclastos por unidad de área.** Se halló una reducción significativa en el número de osteoclastos en el hueso supracoronaral de crías nacidas de madres EV y LL con respecto a las crías controles. C vs EV y LL, \*  $p < 0,01$ , ANOVA-Bonferroni.

En la Figura III-5 se muestran microfotografías representativas del número de Osteoclastos de crías de cada uno de los grupos.

La disminución en el número de osteoclastos por área en crías nacidas de madres tratadas, se correlaciona con el aumento de volumen óseo medido en la misma zona. Estos datos permiten inferir que la actividad resortiva en la zona de formación del canal eruptivo se encuentra disminuida lo cual podría retardar la formación del canal eruptivo y afectar así el grado de erupción dentaria.



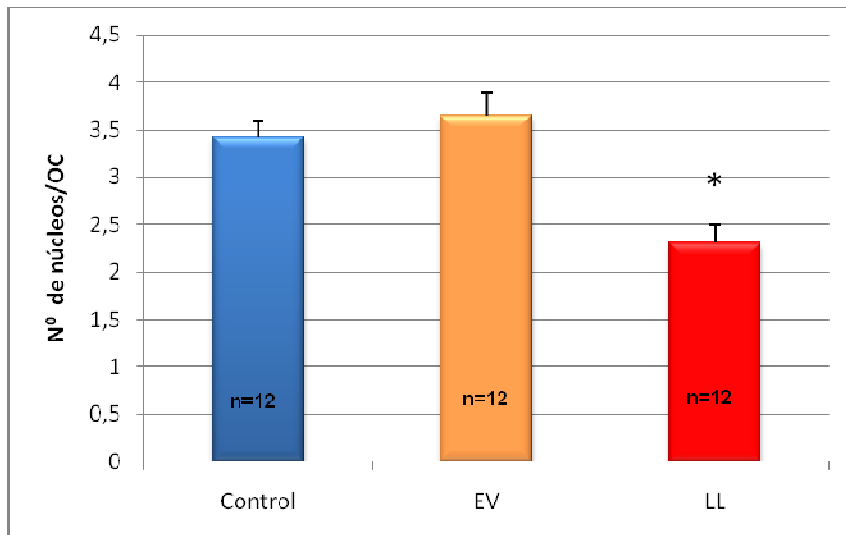


**Figura III-5 Número de osteoclastos por mm<sup>2</sup>.** Microfotografías representativas de cortes bucolinguales a nivel del hueso supracoronar de la canastilla del germen del primer molar inferior de crías nacidas de madres sin tratar (C), sometidas de estrés variado (EV) o a luz constante (LL). -. Magnificación 20X. Nótese la mayor cantidad de osteoclastos por área (flechas blancas) en crías controles. Coloración H&E. Magnificación 400X.

Para obtener datos acerca del proceso de fusión de estas células a partir de sus precursores mononucleares, se evaluó además el número de núcleos por osteoclasto.

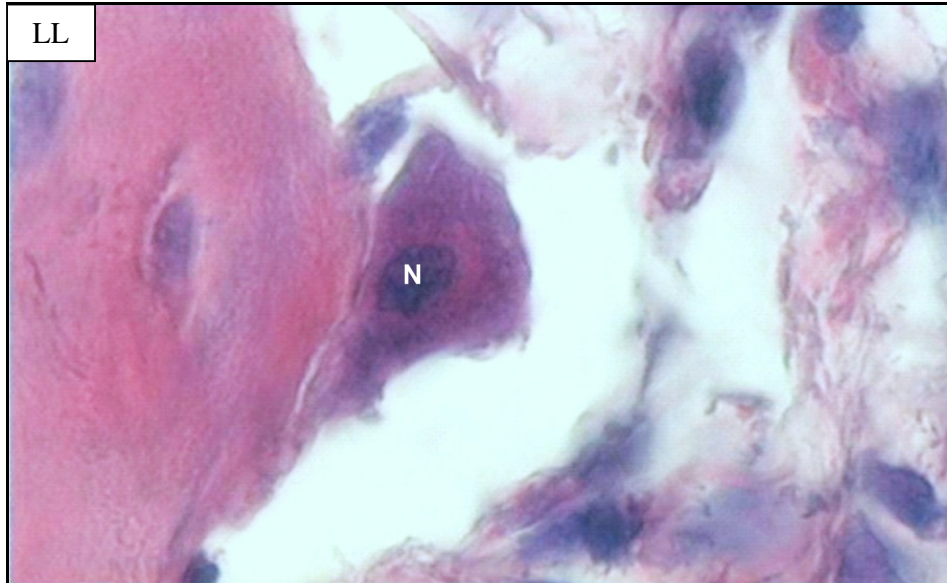
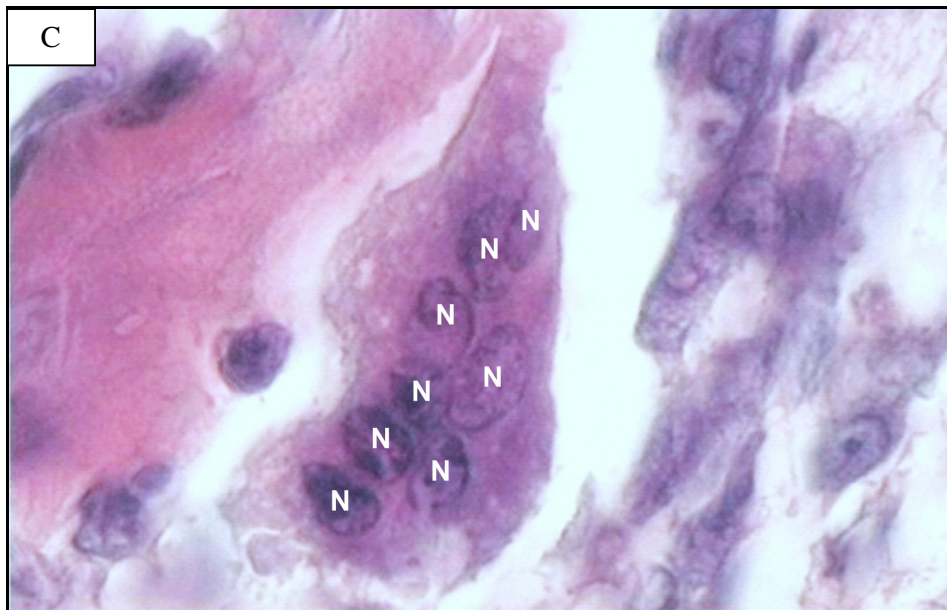
### c) Número de núcleos por osteoclasto

Los núcleos fueron contados en cada osteoclasto presente en la zona supracoronaral de la canastilla ósea del primer molar inferior en los grupos de crías nacidas de madres control, EV y sometidas a LL. No se hallaron diferencias significativas en el número de núcleos (**N.Nc/Oc**) entre las crías nacidas de madres tratadas con EV y crías controles. Sin embargo, el número de núcleos por osteoclasto fue significativamente menor en crías del grupo LL ( $p < 0.01$ ) (C:  $3,42 \pm 0,17$ , EV:  $3,25 \pm 0,24$  y LL:  $2,31 \pm 0,19$ ). Figuras III-6 y III-7.



**Figura III-6. Cuantificación del número de núcleos por osteoclasto.** El número de núcleos por Osteoclasto fue significativamente menor sólo en crías nacidas de madres sometidas a LL (\* $p < 0,01$ ). C y EV vs LL, ANOVA-Bonferroni.

En la Figura III-7 se muestran microfotografías solo de los grupos C y LL, donde se observa la menor cantidad de núcleos por osteoclasto en el grupo LL.



**Figura III-7.** Microfotografías a una magnificación de 1000X de osteoclastos representativos de crías de los grupos control y LL. Nótese la menor cantidad de núcleos (N) en el osteoclasto del grupo LL en comparación con un osteoclasto del grupo control. Ambos osteoclastos fueron fotografiados de la misma zona supracoronal. Coloración H&E.

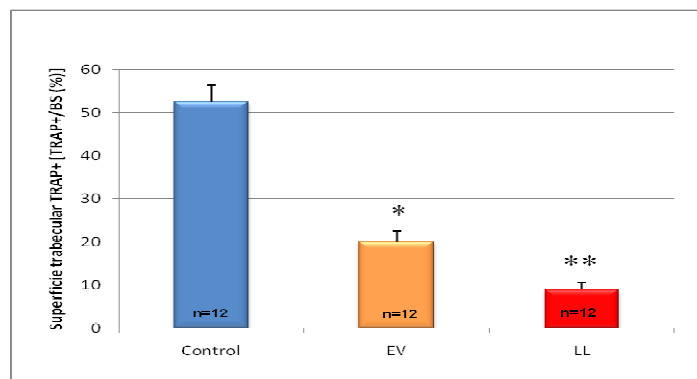
Dado que el osteoclasto es una célula gigante multinucleada que se forma por fusión de precursores mononucleares, la disminución en el número de núcleos por células indicaría una menor cantidad de precursores participantes en la formación del osteoclasto maduro.

### **Coloración histoquímica para detección de TRAP**

Posteriormente, para confirmar y profundizar los hallazgos obtenidos a partir de cortes coloreados con H&E, se midieron parámetros histomorfométricos en cortes coloreados con la técnica histoquímica para la detección de la enzima TRAP. Como se detalló previamente, los cortes se realizaron de manera seriada y al mismo nivel del germen del primer molar inferior. Los parámetros histomorfométricos medidos fueron:

#### **a) Superficie trabecular TRAP+**

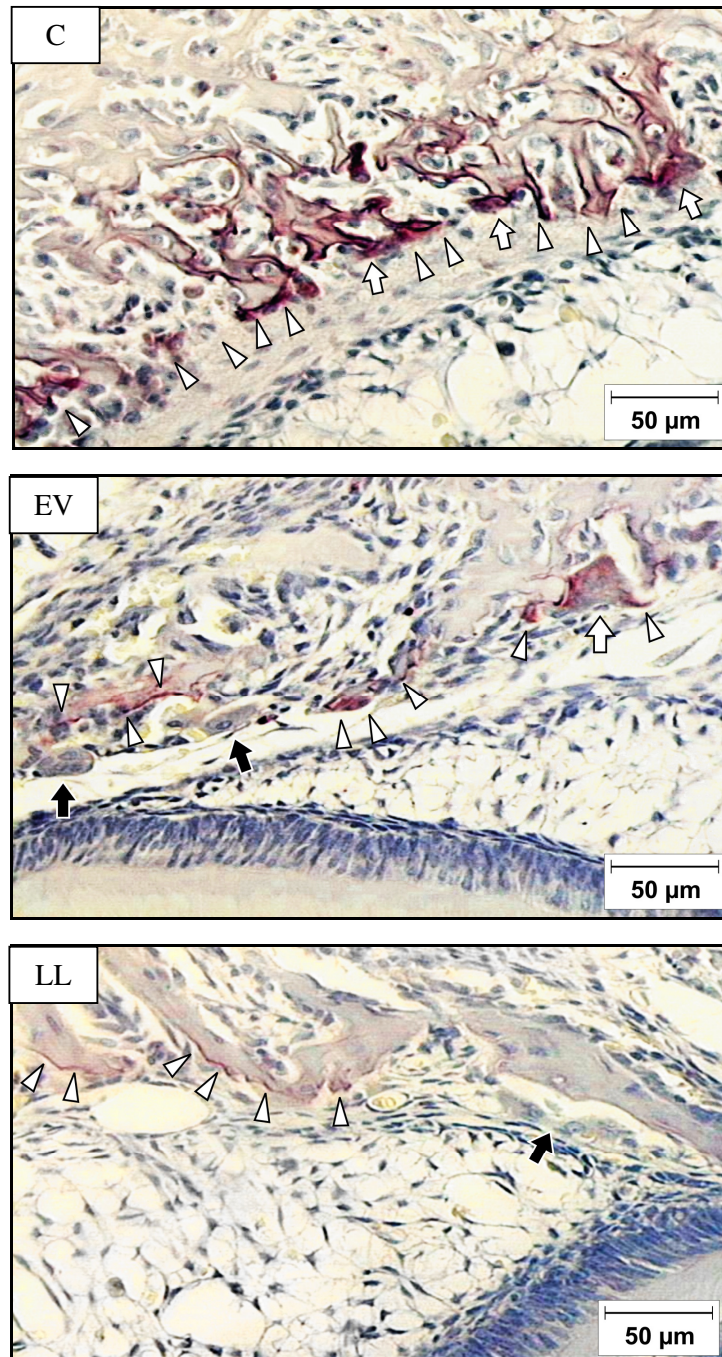
El empleo de esta técnica permitió confirmar y ampliar los resultados hallados con la tinción de HE. El porcentaje de superficie trabecular TRAP+ [TRAP (+)/BS (%)] fue significativamente menor en la canastilla ósea de crías nacidas de madres sometidas a EV, respecto al Control (Figura III-8). En crías nacidas de madres sometidas a LL fue a su vez, significativamente menor que en las de EV y de Control (C: 52,63±3,76; EV: 20,07±2,37; LL: 8,89±1,75;  $p < 0,05$ ).



**Figura III-8. Cuantificación de TRAP+/BS (%) en zona supracoronal del primer molar inferior.** La superficie trabecular TRAP+ fue significativamente menor en las crías EV (\*) y LL (\*\*) con respecto a las crías controles. C>EV>LL; \* $p < 0,05$ ; ANOVA-Bonferroni.



A continuación se muestran microfotografías representativas de la superficie trabecular TRAP+ en hueso supracoronal de crías de cada uno de los grupos.



**Figura III-9 Superficie trabecular TRAP+.** El porcentaje de superficie trabecular TRAP+ en zona supracoronal del primer molar inferior fue significativamente menor en las crías nacidas de los grupos de madres tratadas en relación a las crías nacidas de madres control. En los cortes de grupos prenatalmente estresados se observó una marcación TRAP+ mucho menos intensa a nivel de las trabéculas. Flechas blancas: Ocs TRAP+; flechas negras: Ocs TRAP-; cabezas blancas de flecha: superficie ósea TRAP+. Coloración: TRAP. Magnificación 200X.

Estos datos sugieren un efecto más potente de la luz constante utilizado como estresor crónico respecto al estrés variado y confirma resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio (Cisternas, 2009; Tesis de grado). La marcación TRAP+ en las trabéculas indica la presencia de la enzima a nivel extracelular. La enzima TRAP es producida y secretada por el osteoclasto durante el proceso resorptivo. Si bien esta enzima es un marcador de estirpe, la menor marcación de la misma en trabéculas de crías nacidas de madres tratadas respecto a la notable marcación observada en los controles, sugeriría una menor funcionalidad osteoclástica. Para obtener más datos en relación con este resultado, en los mismos cortes se evaluó además:

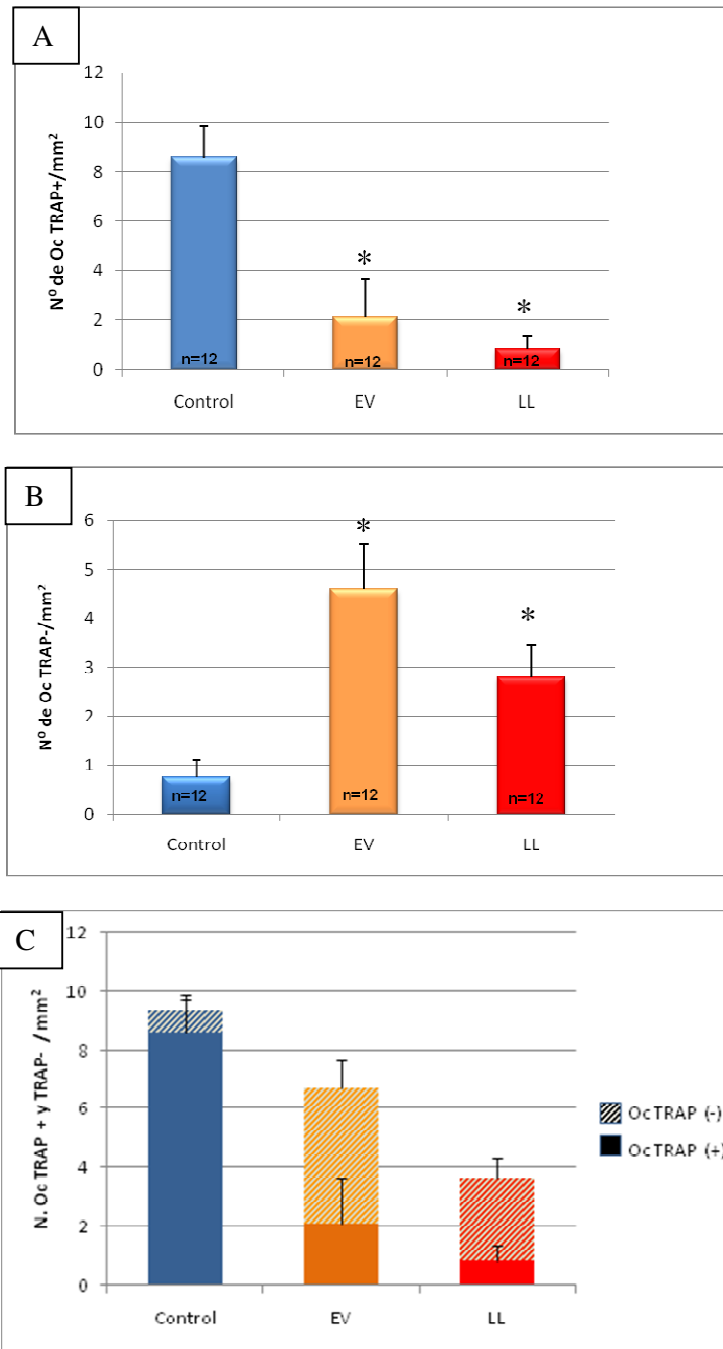
**b) Número de osteoclastos TRAP+ y**

**c) Número de osteoclastos TRAP-**

El conteo del número de osteoclastos TRAP+ (**N.Oc TRAP+/mm<sup>2</sup>**) y TRAP- (**N.Oc TRAP-/mm<sup>2</sup>**) se realizó en la misma zona donde se evaluó el porcentaje de superficie trabecular TRAP+. El número de osteoclastos TRAP+ fue significativamente menor en crías nacidas de madres sometidas a LL y a EV (Figura III-10 A) comparado con el grupo Control (C: 8,59±1,26; EV: 2,11±1,55; LL: 0,84±0,53; p<0,01), resultado que se correlaciona con la menor superficie trabecular TRAP+ observada en crías de esos grupos experimentales.

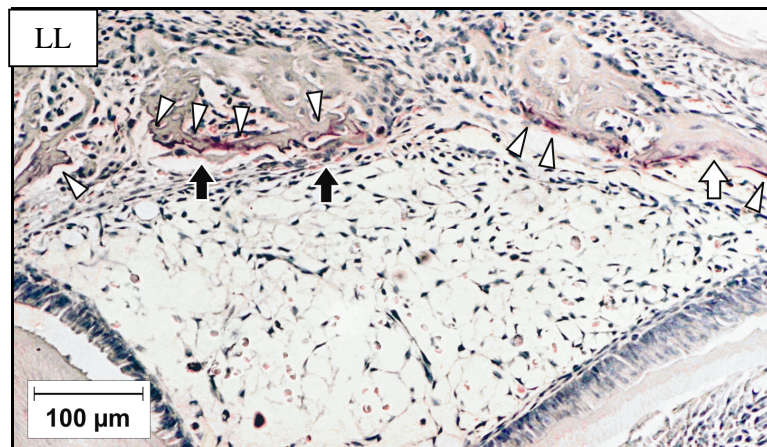
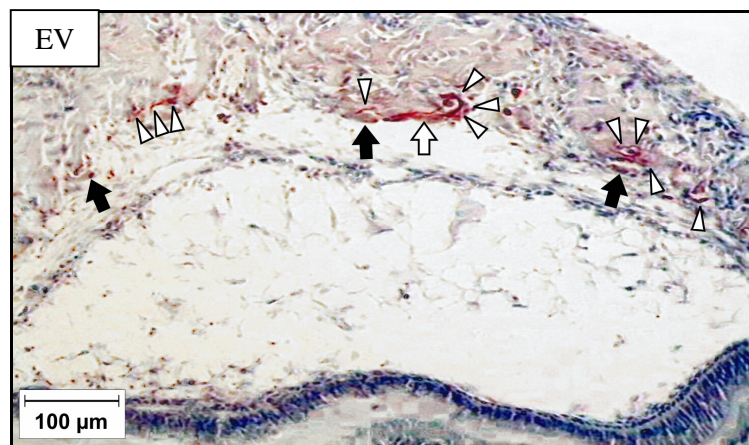
A su vez, el número de osteoclastos TRAP- fue significativamente mayor (Figura III-10 B) en la canastilla ósea de crías nacidas de madres sometidas a LL y EV respecto al Control (C: 0,76±0,36; EV 4,59±0,93; LL 2,8±0,66, p<0,01).

Es interesante destacar que el número total de osteoclastos (Figura III-10 C), siguió siendo significativamente menor en crías de los grupos EV y LL (p<0,01) en relación al Control, lo cual corrobora los resultados obtenidos a partir de los cortes coloreados con H&E (ver figura III-4)



**Figura III-10. Número de Osteoclastos TRAP+ y TRAP-.**

(A) Representación del número de osteoclastos TRAP+, (B) Número de osteoclastos TRAP-; \*  $p < 0.01$ , ANOVA- Bonferroni. (C) Número de osteoclastos TRAP+ y TRAP- sumados. Las barras con textura a rayas representan el número de osteoclastos TRAP- en cada grupo. Las barras con relleno sólido representan el número de osteoclastos TRAP+.



**Figura III-11.** Microfotografías representativas de cortes en sentido buco-lingual a nivel de la canastilla ósea del primer molar mandibular coloreados con la técnica para detección de TRAP. El número de osteoclastos TRAP+ fue significativamente menor en crías nacidas de los grupos EV y LL. Lo opuesto se observó con el número de osteoclastos TRAP- el cual fue significativamente mayor en crías nacidas de madres tratadas. Flechas blancas: Ocs TRAP+; flechas negras: Ocs TRAP-; cabezas blancas de flecha: superficie ósea TRAP+. Magnificación 200X.



Estos resultados se correlacionan con la menor superficie TRAP+ observada en crías nacidas de los grupos tratados. Analizando en conjunto los hallazgos hasta aquí obtenidos a partir de cortes coloreados para detección de TRAP, se infiere que existe una menor actividad de la enzima en crías nacidas de los grupos EV y LL. Si bien esta enzima es un marcador fenotípico de osteoclastos, tanto la disminución en el número de osteoclastos TRAP+ como el aumento de osteoclastos TRAP- y el mayor volumen óseo supracoronal observado en crías nacidas de madres tratadas sugiere una alteración en la formación y/o función osteoclástica. Esto podría reducir la actividad resortiva necesaria para la formación del canal eruptivo durante la fase intraósea de la erupción.

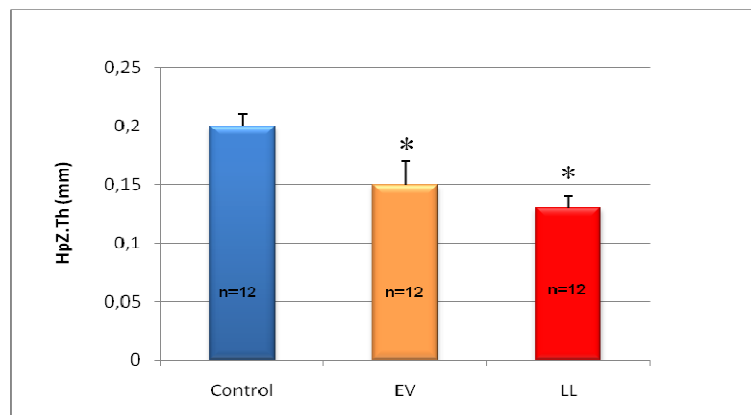
### III.A.1-2 Tibias

Debido a las diferencias existentes entre los huesos largos y el hueso maxilar en cuanto a origen, estructura y respuestas frente a diversos estímulos, nos interesó evaluar también el efecto de ambos modelos de estrés prenatal sobre variables asociadas al crecimiento de los huesos largos. Sobre cortes de tibia de crías de 3 días de edad coloreados con H&E se midió:

- Esesor de cartílago hipertrofiado [**HpZ.Th (mm)**]
- Volumen óseo subcondral [**BV/TV (%)**].

#### a) Esesor de cartílago hipertrofiado

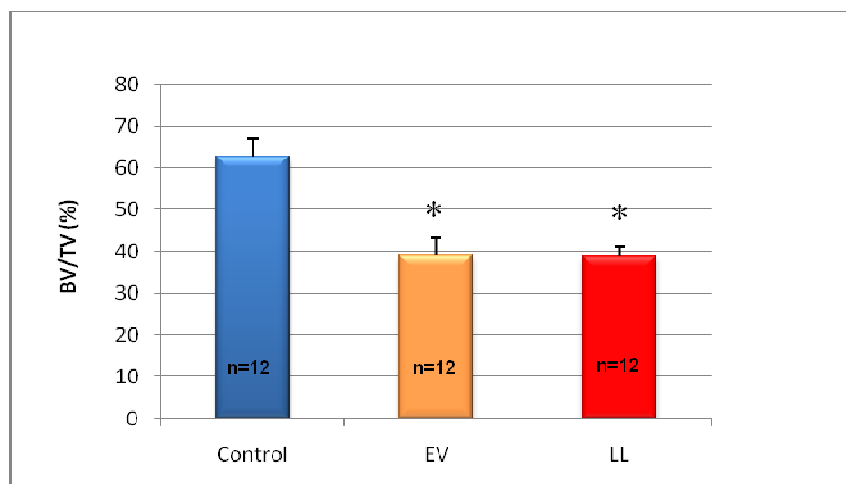
El esesor de la zona de cartílago hipertrofiado [**HpZ.Th (mm)**] de tibia de los grupos EV y LL fue significativamente menor respecto al grupo control ( $p < 0.01$ ) (EV:  $0,13 \pm 0,02$  mm; LL:  $0,13 \pm 0,01$  mm, C:  $0,2 \pm 0,01$  mm). Figuras III-12 y III-14.



**Figura III-12. Esesor de cartílago hipertrofiado en tibias.** Se observa una disminución significativa del esesor en los grupo EV y LL, ( $*p < 0,01$ , ANOVA-Bonferroni).

## b) Volumen óseo subcondral

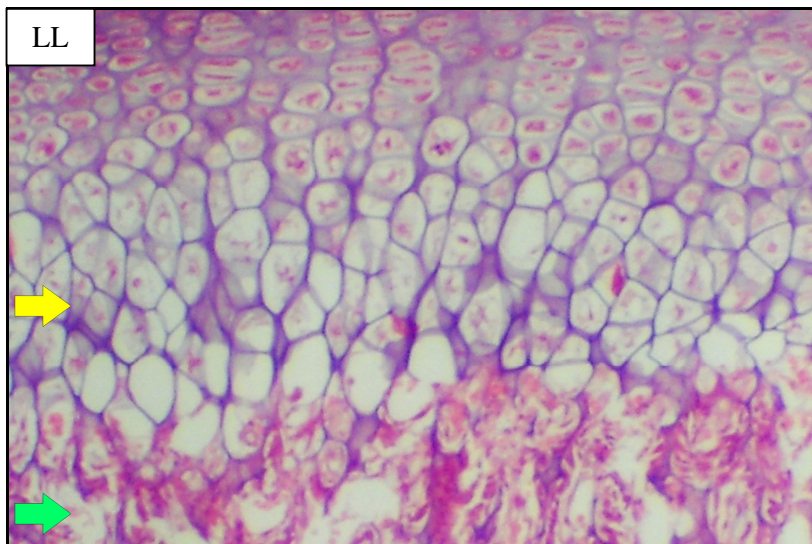
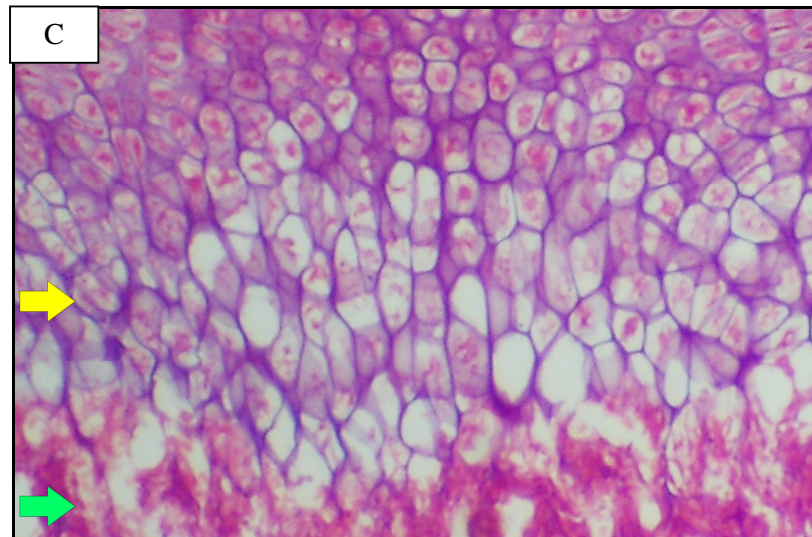
A su vez, el porcentaje de volumen óseo **[BV/TV (%)]** a nivel del hueso subcondral fue significativamente menor en crías nacidas de los grupos EV y LL respecto del control,  $p < 0.01$  (EV:  $39,11 \pm 4,12$ ; LL:  $38,83 \pm 2,32$  y C:  $62,83 \pm 4,03$ ). Figuras III-13 y III-14.



**Figura III-13. Volumen óseo subcondral en tibias.** El volumen óseo en hueso subcondral por debajo de la zona de cartílago de crecimiento mostró una disminución significativa en crías de los grupos tratados respecto del control. C vs EV y LL;  $*p < 0.01$  (ANOVA-Bonferroni)

La disminución del espesor de la zona de cartílago de crecimiento junto con el menor volumen óseo en la zona subcondral de tibias de crías prenatalmente estresadas, indican una alteración en el proceso de osificación endocondral.

Si bien el hueso maxilar y los hueso largos poseen diferente origen embriológico y distintos mecanismos de osificación, los resultados hallados indicarían que el estrés sufrido por la madre durante la gestación, tuvo efectos adversos sobre las crías, afectando de manera sistémica distintos parámetros relacionadas con la biología ósea en los dos tipos de osificación.



**Figura III-14. Espesor de cartilago hipertrofiado** (demarcado con flechas amarillas) y **hueso subcondral** (demarcado con flechas verdes). Coloración H&E. Magnificación 25X.

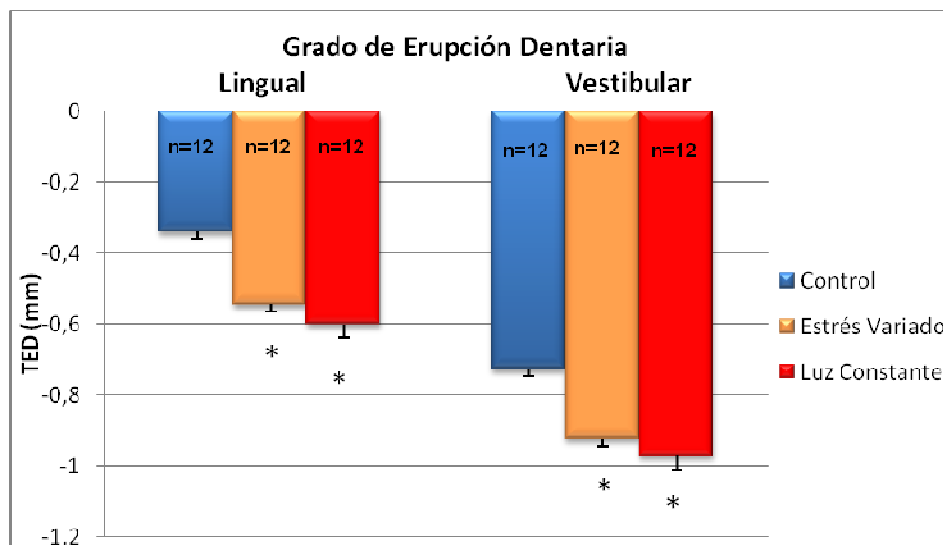
## III.A-2 Crías de 15 días de vida

### III.A.2-1 Mandíbula o maxilar inferior

#### a) Grado de Erupción Dentaria [TED (mm)]

El grado de erupción dentaria fue medido en crías de 15 días de vida. Esta edad se corresponde con la fase pre-eruptiva del proceso de erupción dentaria. A tal efecto se trazaron líneas tomando un punto de referencia óseo y un punto de referencia dentario y la medición se realizó por el lado lingual y el vestibular como ya fue descrito en materiales y métodos. Dado que en este estadio el primer molar no ha erupcionado aun en la cavidad bucal, las distancias medidas entre estos puntos se expresan como valores negativos. De esta manera, mayores distancias, indican menor grado de erupción.

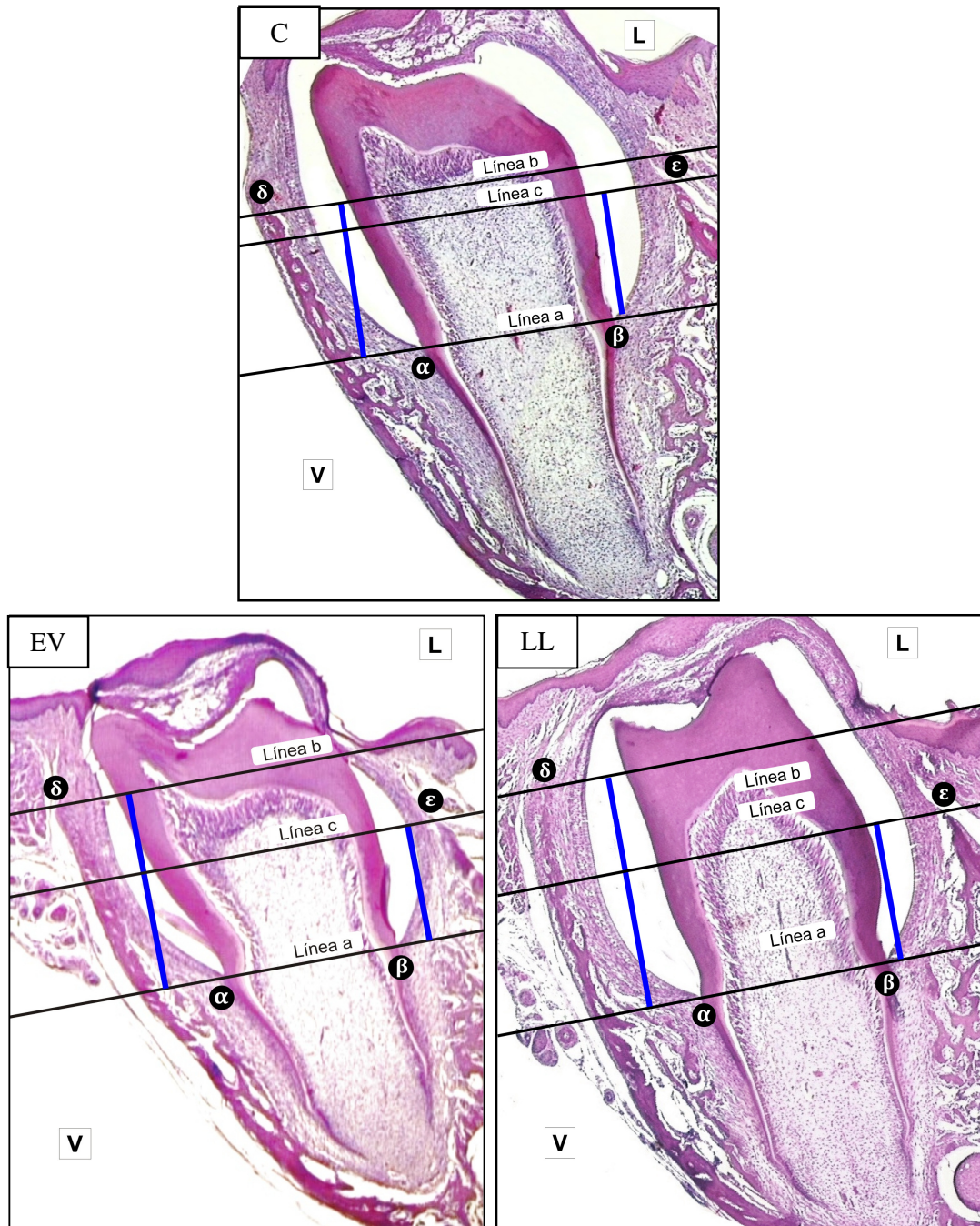
Los resultados obtenidos mostraron que el grado de erupción dentaria fue significativamente menor en crías nacidas de los grupos EV y LL con respecto al grupo control, tanto por lingual (EV:  $-0,545 \pm 0,03\text{mm}$ ; LL:  $-0,605 \pm 0,05\text{mm}$  vs. C:  $-0,342 \pm 0,02\text{mm}$ ;  $p < 0,01$ ) como por vestibular (EV:  $-0,9234 \pm 0,02\text{mm}$ ; LL:  $-0,9718 \pm 0,04$  vs. C:  $-0,726 \pm 0,04$   $p < 0,01$ ). (Figuras III-15 y III-16).



**Figura III-15. Grado de erupción dentaria.** El grado de erupción dentaria medido por lingual y vestibular fue significativamente menor en crías nacidas de los grupos tratados con respecto a crías controles ( $p < 0,01$ ; ANOVA- Bonferroni).



A continuación se muestran microfotografías representativas de cortes bucolinguales de crías de 15 días de los diferentes grupos.



**Figura III-16. Grado de erupción del primer molar inferior en crías de 15 días de edad.**

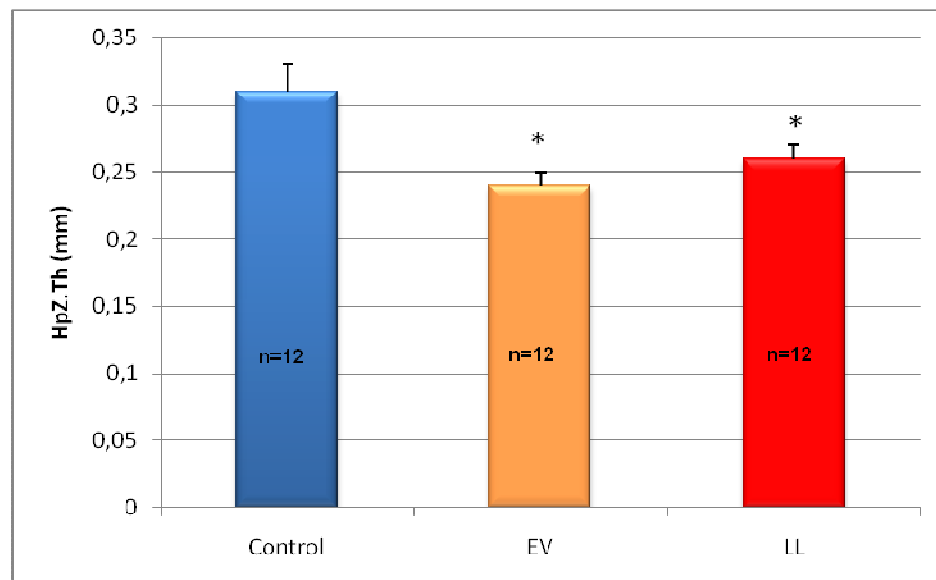
Microfotografías representativas de cortes bucolinguales del primer molar inferior. Mayores longitudes indican menor grado de erupción.  $\alpha$ : LAC vestibular.  $\beta$ : LAC lingual.  $\delta$ : cresta ósea vestibular.  $\epsilon$ : cresta ósea lingual. Distancia a-b: grado de erupción vestibular. Distancia a-c: grado de erupción lingual. Coloración H&E. Magnificación 25X.

Estos datos muestran que el grado de erupción promedio entre los lados vestibular y lingual en los grupos nacidos de madres estresadas se encuentra disminuido 1.55 veces en comparación con los controles. La disminución del grado de erupción dentaria podría interpretarse como un retardo en la formación del canal eruptivo en la zona supracoronal de la canastilla ósea del primer molar inferior. Este resultado se correlaciona con los datos obtenidos de crías a los 3 días de edad. Es probable que, en crías prenatalmente estresadas, el aumento del volumen óseo como consecuencia de la disminución del número de osteoclastos y superficie TRAP+ en hueso supracoronal de la canastilla ósea, demoren la formación del canal eruptivo y por tanto, reduzcan el grado de erupción dentaria a los 15 días de edad.

### III.A. 2-2 Tibias

#### a) Espesor de cartílago hipertrofiado

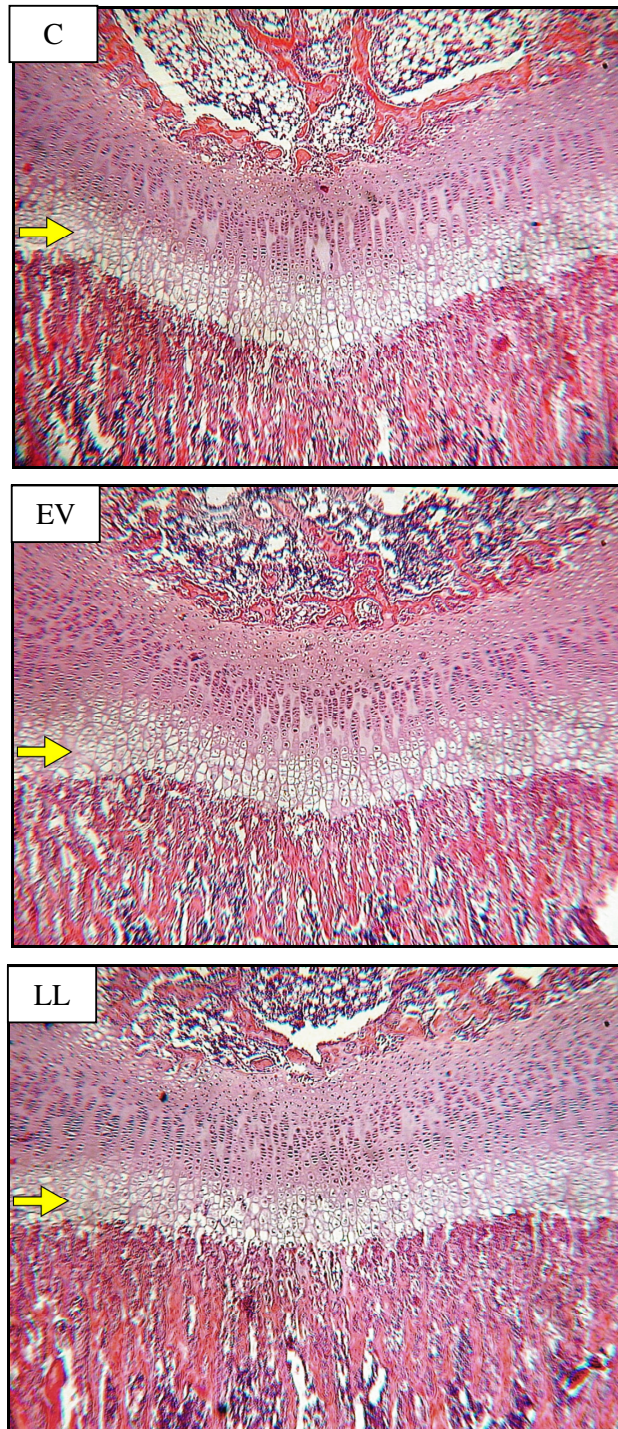
El espesor de cartílago hipertrofiado [HpZ.Th (mm)] fue significativamente menor en tibias de crías de 15 días nacidas de madres sometidas a luz constante o estrés variado en comparación con el grupo control (EV:  $0,24 \pm 0,01$ ; LL:  $0,26 \pm 0,01$  vs. C:  $0,31 \pm 0,02$ ;  $p < 0,01$ ). Figuras III-17 y III-18.



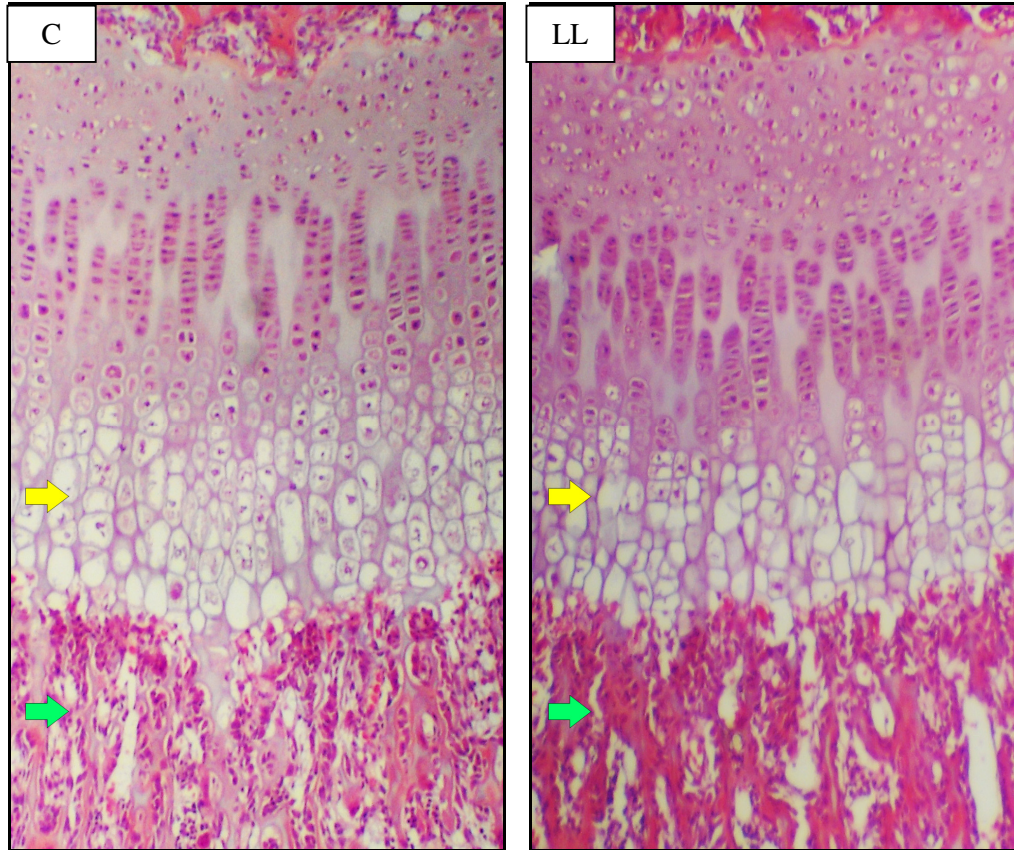
**Figura III-17. Espesor de cartílago hipertrofiado.** El espesor de la zona de cartílago hipertrofiado fue significativamente menor en tibias de crías nacidas de los grupos tratados respecto del control (\*  $p < 0,01$ ; ANOVA- Bonferroni) C vs EV y LL).



A continuación se muestran microfotografías representativas:



**Figura III-18a. Espesor de cartilago hipertrofiado en tibias de crías de 15 días de edad.** Microfotografías representativas de cortes longitudinales de tibias a nivel de la epífisis proximal. Nótese la disminución del espesor en la zona de cartilago hipertrofiado (flecha amarilla) en todo el ancho de la tibia de crías nacidas de los grupos EV y LL en relación con el grupo Control. Coloración: H&E. Magnificación 25X.



**Figura III-18b. Espesor de cartilago hipertrofiado en tibias de crías de 15 días de edad.** Microfotografías representativas a mayor aumento de cortes longitudinales de tibias a nivel de la epífisis proximal de los grupos Control y LL. Se observa una disminución del espesor en la zona de cartilago hipertrofiado (flecha amarilla) en la microfotografía del grupo LL en relación con el grupo Control. Flecha verde: hueso subcondral. Coloración: H&E. Magnificación 100X.

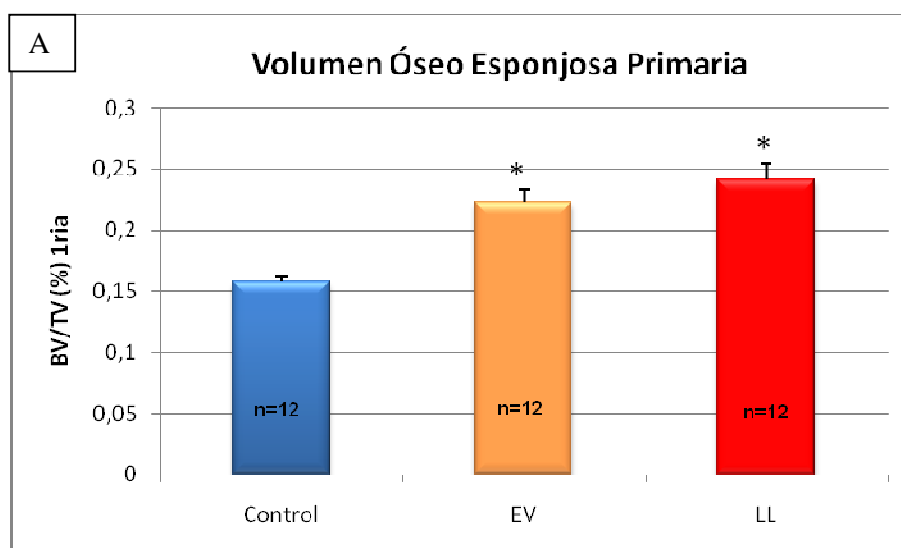
## b) Volumen óseo subcondral

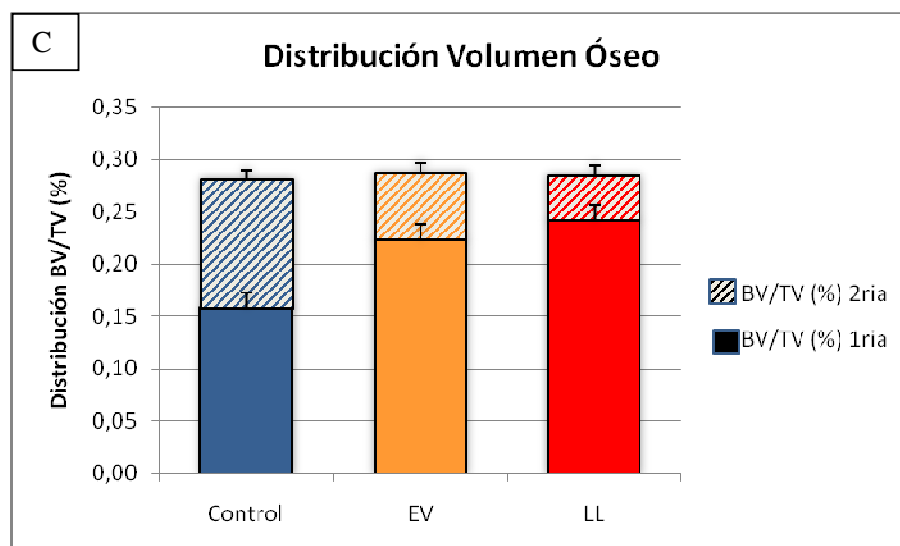
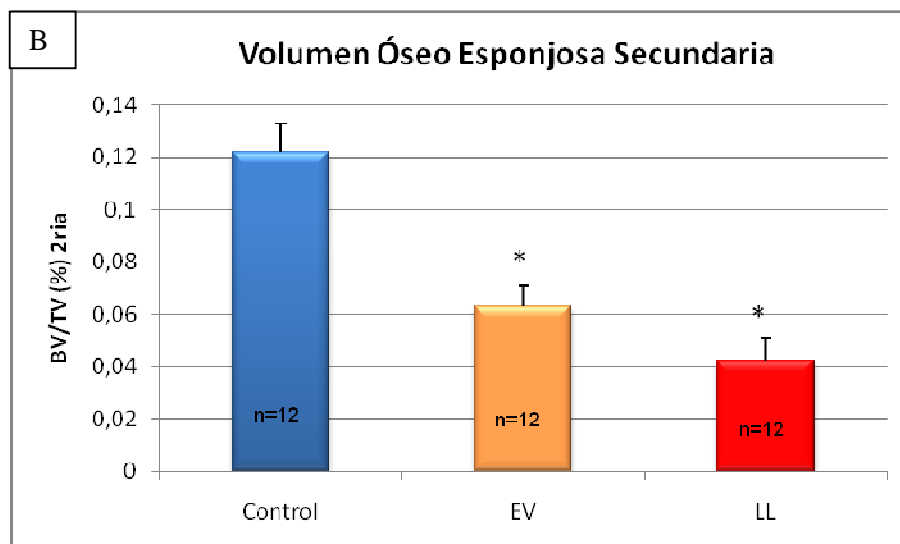
Este parámetro histomorfométrico [BV/TV (%)] se evaluó en un área determinada debajo del cartílago de crecimiento. Como se describió previamente en materiales y métodos, luego el área fue subdividida en dos sectores: sector de esponjosa primaria y sector de esponjosa secundaria y en ambos sectores también se evaluó el volumen óseo.

A nivel de la esponjosa primaria se encontró un incremento significativo en la distribución del BV/TV(%) (C: 28,12±0,83; EV: 36,46±2,02; LL: 39,43±1,94; \*p<0,01) Figura III-19 A.

A nivel de la esponjosa secundaria se observó una reducción significativa (C: 17,55±2,08; EV: 9,65±1,87; LL: 7,02±1,58; \*\*p<0,01). Figura III-19 B.

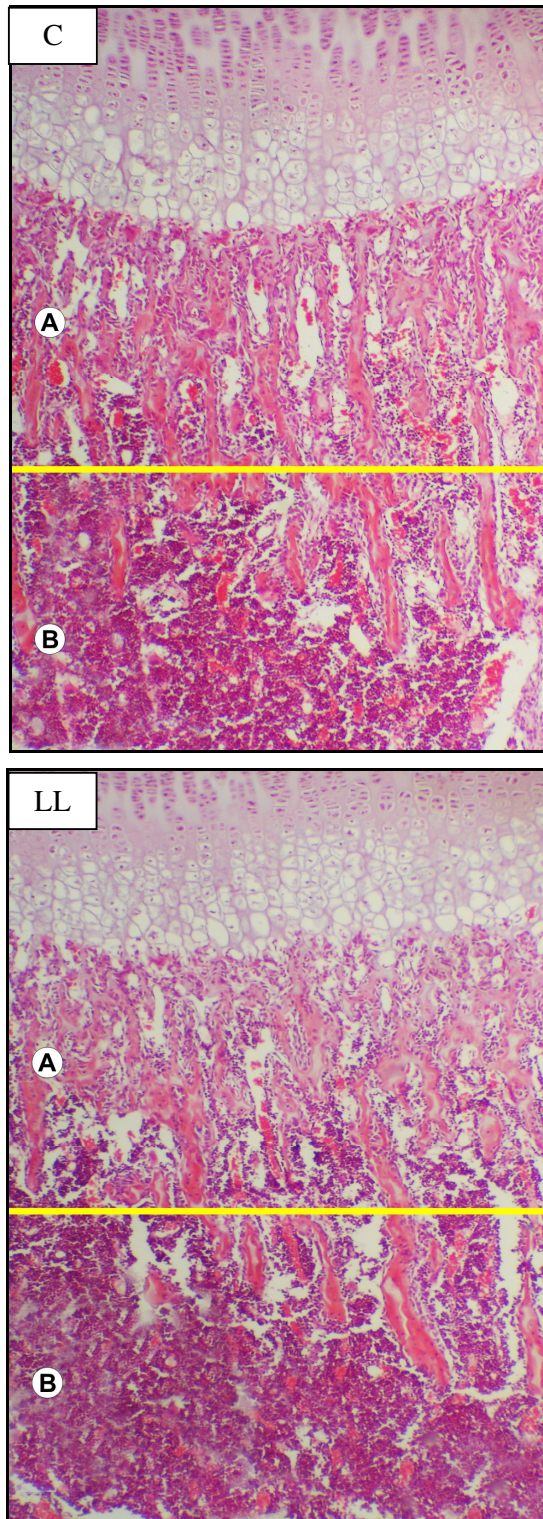
Sin embargo no se encontraron diferencias en el volumen óseo subcondral total entre crías nacidas de los grupos tratados y control (C: 22,96±0,86; EV: 23,12±1,04; LL: 23,32±1,78; p>0,05). Figura III-19 C.





**Figura III-19. Volumen óseo subcondral.** (A) Volumen óseo en las esponjas primarias, (B) en las esponjas secundarias (C) Volumen óseo total (barras con relleno sólido: BV/TV (%) esponjosa 1<sup>a</sup> – Barras con textura a rayas: BV/TV (%) esponjosa 2<sup>a</sup>) Si bien no se encontraron diferencias en el volumen óseo subcondral total entre crías de los diferentes grupos, en la esponjosa secundaria de tibias de los grupos EV y LL el porcentaje de volumen óseo fue menor en comparación con los controles, mientras que a nivel de la esponjosa primaria el volumen óseo fue mayor.





**Figura III-20. Volumen óseo subcondral en tibias de crías de 15 días de edad.** Se midió el volumen óseo subcondral total y además en la esponjosa primaria (A) y en la secundaria (B). No se hallaron diferencias significativas en el volumen óseo total entre los grupos. No obstante, se hallaron diferencias significativas en la distribución del volumen óseo en las dos esponjosas entre los grupos control y tratados. Coloración: H&E. Magnificación 25X.

Se conoce que durante el crecimiento en largo de la tibia, hay una activa reabsorción de las trabéculas primarias subcondrales. La actividad osteoclástica permite el desprendimiento de estas trabéculas y la formación de la esponjosa secundaria. Cuando este proceso resortivo se encuentra disminuido, las trabéculas primarias quedan selladas al cartílago de crecimiento afectando la formación de la esponjosa secundaria. Por consiguiente el aumento de volumen óseo subcondral en la esponjosa primaria de crías tratadas, podría deberse a una inhibición de la reabsorción ósea. En resumen, el efecto negativo del estrés prenatal observado en crías de 3 días sobre la osificación endocondral, persiste aun a los 15 días de vida.

### **III.A-3 Crías de 60 días de vida**

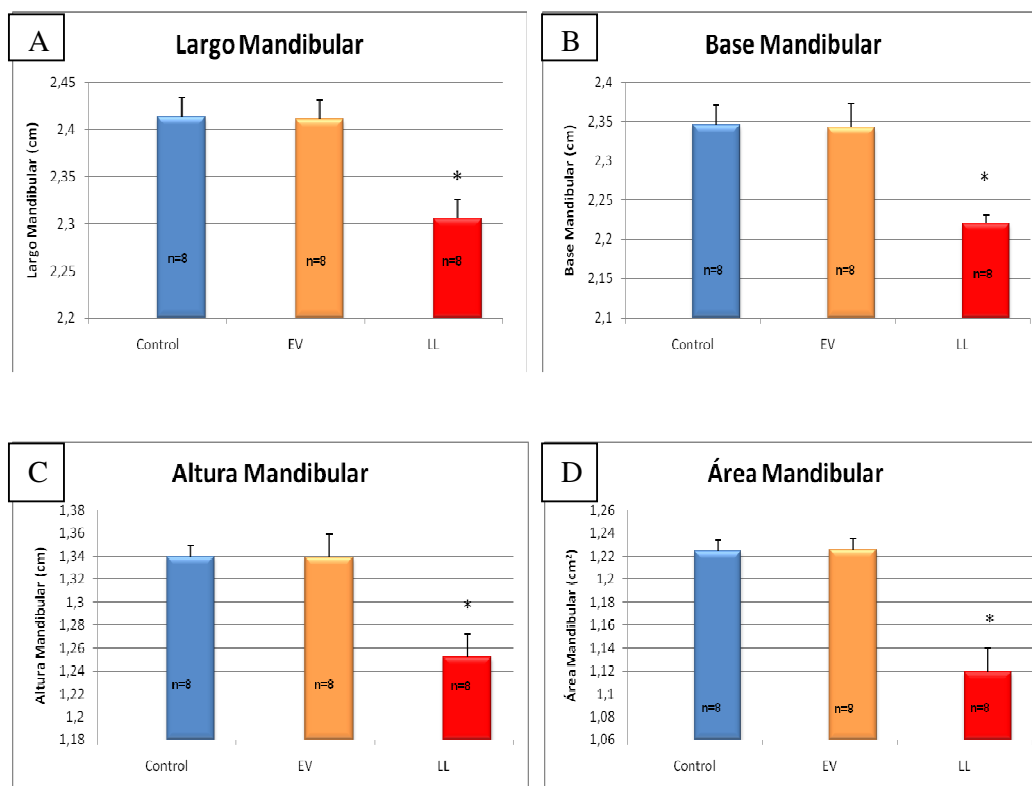
#### **III.A.3-1 Mandíbula o maxilar inferior**

Con el fin de evaluar también los efectos del estrés prenatal a largo plazo, se midió, además del peso corporal ya descrito, el grado de desarrollo y crecimiento mandibular en crías adultas de 60 días de vida. Los indicadores de crecimiento y desarrollo mandibular que se midieron en este estudio sobre digitalización de radiografías de los maxilares inferiores fueron: largo mandibular, base mandibular, altura mandibular y área mandibular.

#### **Crecimiento mandibular**

La comparación de los cuatro parámetros medidos mostró una reducción significativa en las crías nacidas del grupo LL en relación con el grupo Control ( $p < 0,05$ ) a los 60 días de vida. No se hallaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los parámetros entre crías de los grupos EV y Control.

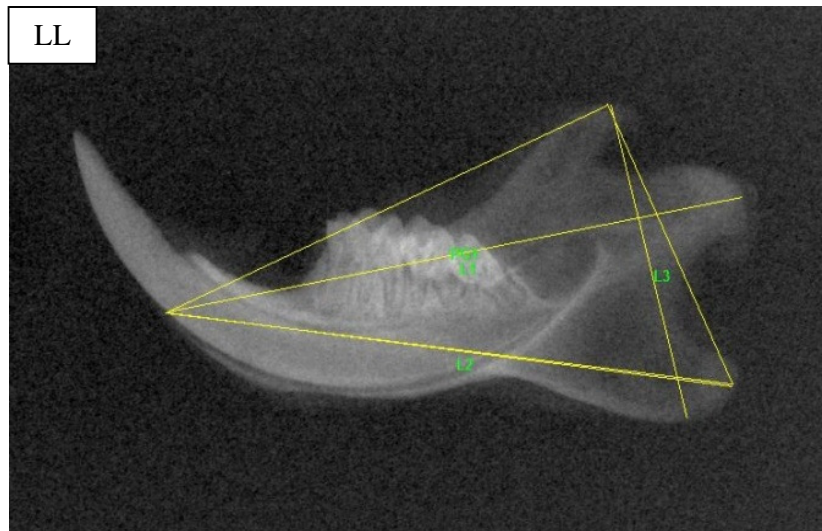
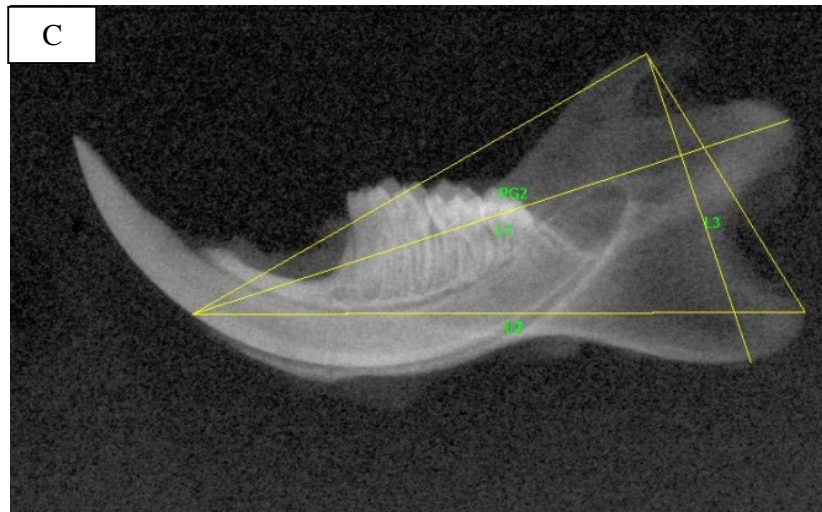




**Figura III-20.** Representación de los parámetros indicadores de crecimiento mandibular. LL vs C y EV,  $p < 0,01$  (ANOVA-Bonferroni) en A, B, C y D. Solo se redujo significativamente en las crías nacidas de madres sometidas a LL.

	Grupo Control	Grupo Estrés Variado	Grupo Luz Constante
<b>Largo mandibular (cm)</b>	2,4132±0,02 (12)	2,4107±0,025 (11)	2,3057±0,02 (12) *
<b>Base mandibular (cm)</b>	2,3457±0,025(12)	2,343±0,03 (12)	2,2205±0,01(10) *
<b>Altura mandibular (cm)</b>	1,3394±0,01(10)	1,3389±0,02 (11)	1,2521±0,02 (10) *
<b>Área mandibular (cm²)</b>	1,2242±0,01(9)	1,2255±0,01 (10)	1,1195±0,02 (9) *

**Tabla III-2. Parámetros de crecimiento mandibular.** Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos para cada una de las variables ( $p < 0.01$ ; C y EV vs LL).



**Figura III-19. Crecimiento mandibular en crías de 60 días de edad.** Escaneos digitalizados de mandíbulas de crías de los grupos control y LL. El largo mandibular se midió desde el punto más anterior e inferior de la mandíbula hasta el punto más posterior del gonion mandibular (L1), la base mandibular desde el punto más anterior e inferior de la mandíbula hasta el punto más posterior del gonion mandibular (L2). La altura mandibular, desde el punto más superior de la apófisis coronoides hasta el punto más inferior de la rama mandibular (L3). El área mandibular (A1) fue calculada en un triángulo formado por las líneas que unieron los siguientes puntos: punto más anterior e inferior de la mandíbula, punto más superior de la apófisis coronoides y punto más posterior del gonion mandibular.

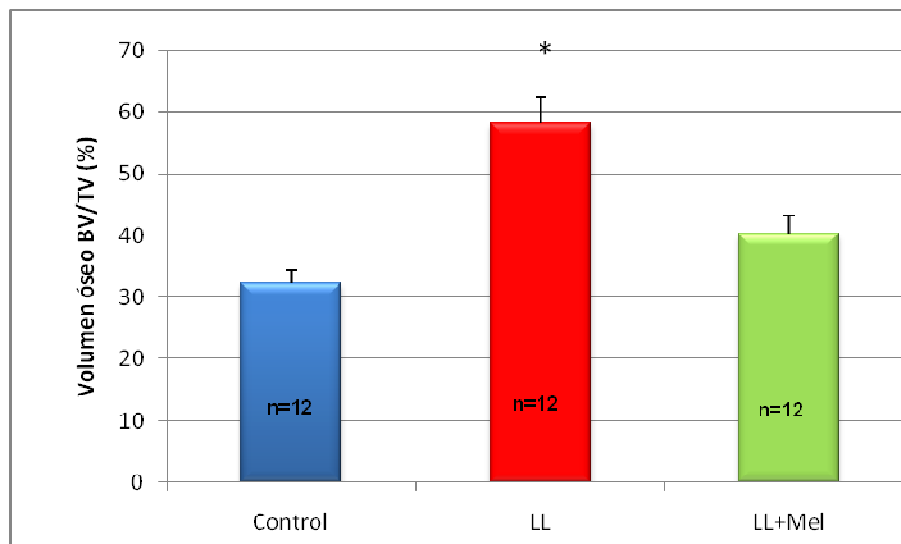
### III-B. LUZ CONSTANTE + MELATONINA PRENATAL

La melatonina es una hormona sintetizada y secretada por la glándula pineal e inhibida por la luz. Tiene funciones antiapoptóticas, antioxidantes, neuroprotectora y además es moduladora de los ritmos circadianos.

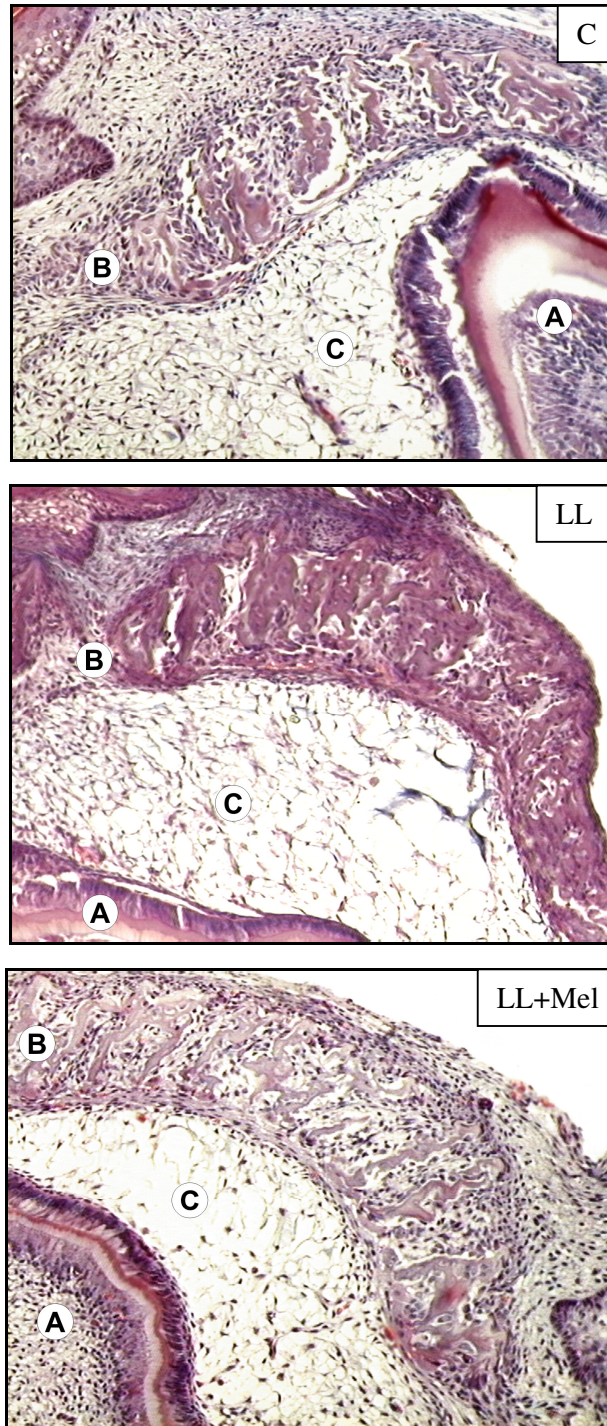
Ha sido demostrado que la melatonina exógena aplicada a ratas preñadas sometidas a luz constante fue capaz de prevenir los efectos negativos del tratamiento estresante observados en el ritmo de actividad enzimática de LDH y MDH y comportamiento sexual de las crías (Bellavía y col., 2006; Cisternas y col., 2010). Sobre la base de estos antecedentes, nos propusimos evaluar el posible rol preventivo de melatonina sobre algunos de los parámetros de mandíbula medidos en **crías de 3 y 15 días de edad**, estresadas prenatalmente bajo el **modelo de luz constante**.

#### a) Volumen óseo supracoronar

En crías de tres días de edad el porcentaje de volumen óseo trabecular **[BV/TV (%)]** fue significativamente mayor en crías nacidas de madres sometidas a LL en comparación con los grupos LL+Mel y Control (C:  $32,31 \pm 2,16$  y LL+Mel  $40,21 \pm 3,07$  vs LL:  $58,14 \pm 4,24$ ;  $p < 0.01$ ). Figuras III-20 y III-21.



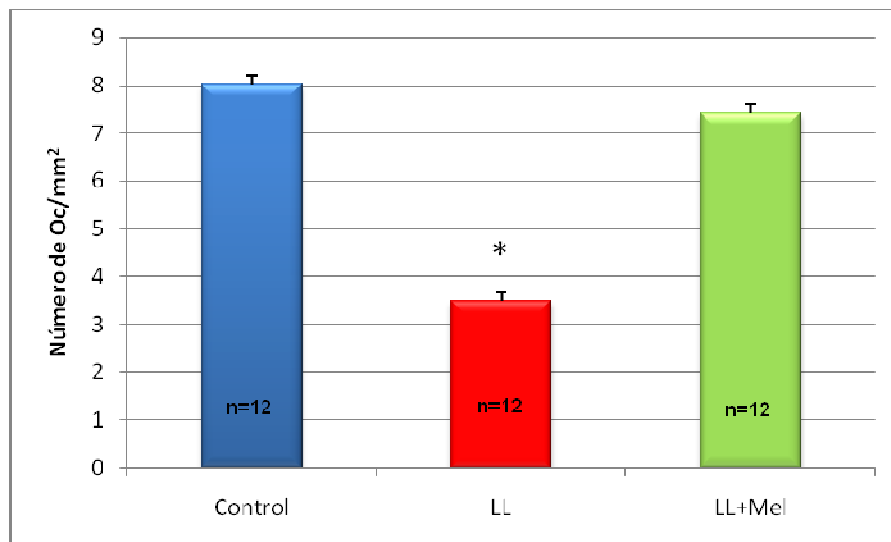
**Figura III-20. Volumen óseo supracoronar.** Se registró un incremento significativo del volumen óseo en crías del grupo LL en comparación con crías nacidas del grupo LL+Mel y al control. C y LL+Mel vs LL; \*  $p < 0.05$ , ANOVA Bonferroni.



**Figura III-21. Volumen óseo supracoronario de la canastilla ósea.** Las imágenes muestran la porción supracoronario del hueso de la canastilla ósea que rodea al germen del primer molar inferior. En crías del grupo LL el volumen óseo fue significativamente mayor en comparación con el de crías del grupo LL+Mel y controles. A: Germen primer molar. B: Hueso supracoronario. C: Retículo estrellado. Coloración H&E. Magnificación 25X.

### b) Número de Osteoclastos por área

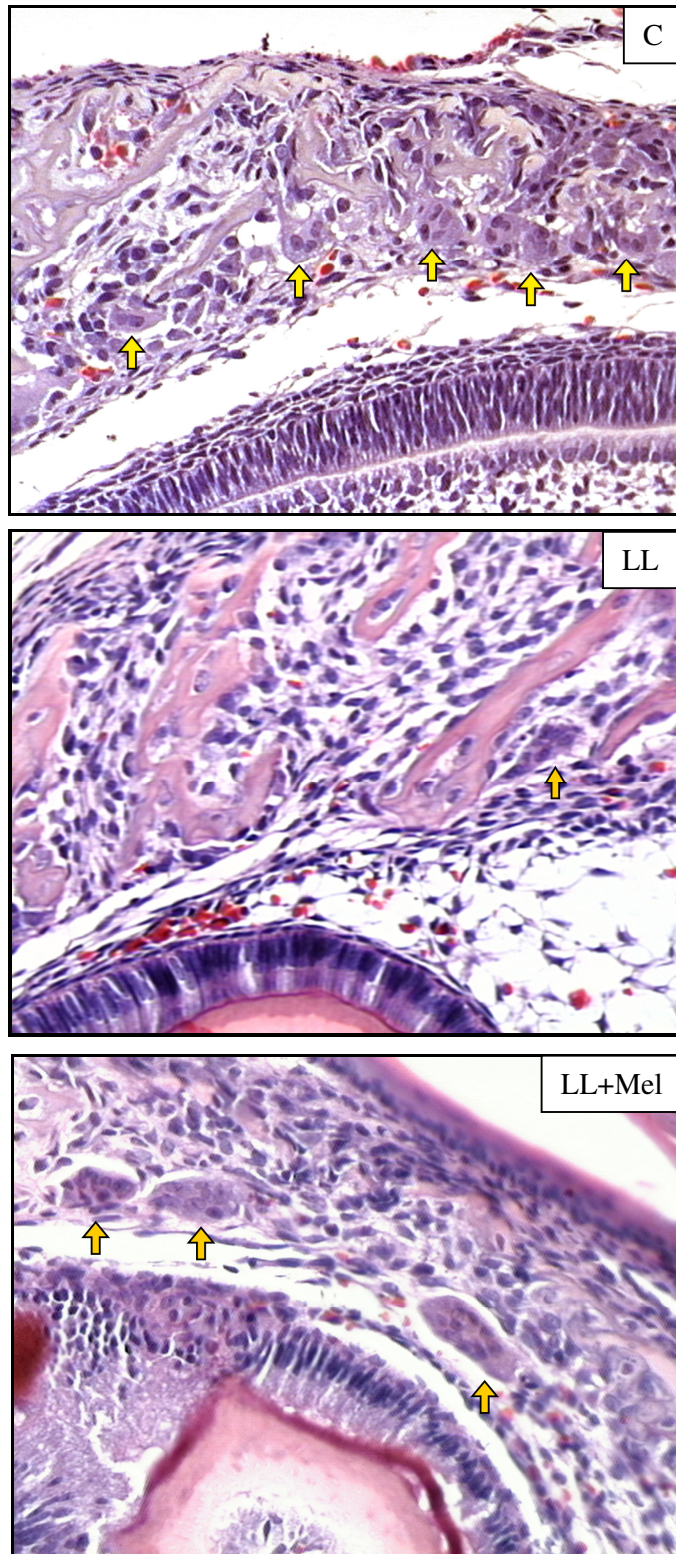
El número de Osteoclastos por  $\text{mm}^2$  (**N.Oc/mm<sup>2</sup>**) en hueso supracoronal de la canastilla ósea del germen del primer molar mandibular fue significativamente menor tanto en crías nacidas de madres sometidas a LL como a EV comparado con el grupo Control (C:  $8,03 \pm 1,31$  y LL+Mel:  $7,43 \pm 1,02$ ; LL:  $3,5 \pm 0,65$ ;  $p < 0,05$ ). Figuras III-22 y III-23.



**Figura III-22. Número de osteoclastos por unidad de área.** Se halló una reducción significativa en el número de osteoclastos en el hueso supracoronal de crías nacidas de madres sometidas a LL con respecto a las crías nacidas del grupo LL+Mel y controles. C y LL+Mel vs LL, \*  $p < 0,05$ , ANOVA-Bonferroni.

En la Figura III-23 se muestran microfotografías representativas del número de Osteoclastos de crías de cada uno de los grupos.



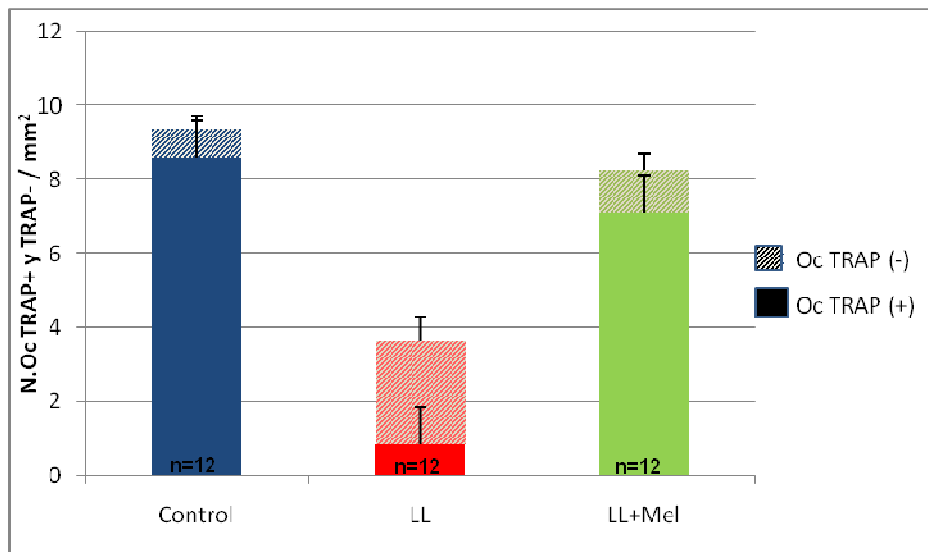


**Figura III-23 Número de osteoclastos/mm<sup>2</sup>.** Microfotografías representativas de cortes bucolinguales a nivel del hueso supracoronal de la canastilla del germen del primer molar inferior de crías nacidas de madres sin tratar (C), sometidas de estrés variado (EV) o a luz constante (LL). Nótese la mayor cantidad de osteoclastos por área (flechas amarillas) en crías controles. Coloración H&E. Magnificación 200X.

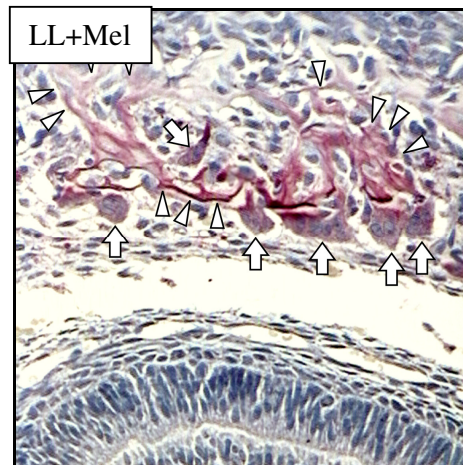
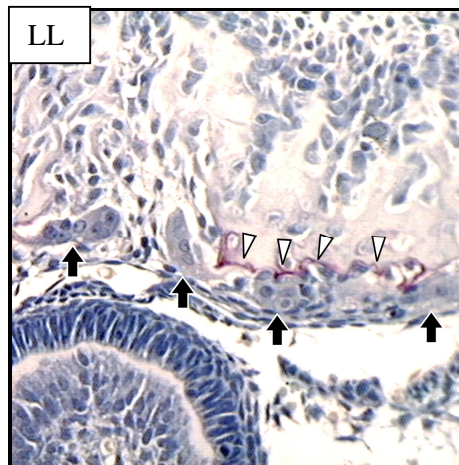
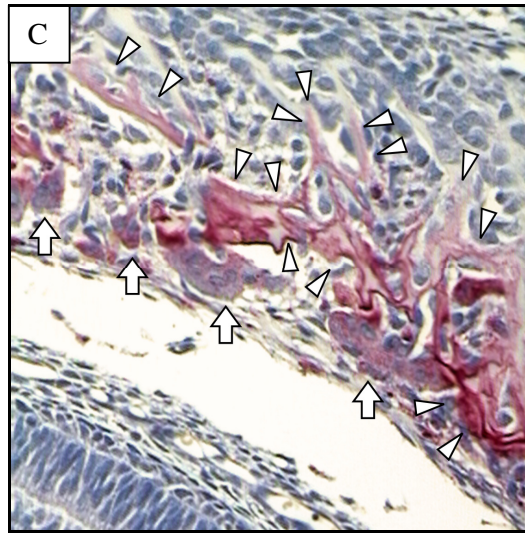
### c) Número de osteoclastos TRAP+ y TRAP-

El número de osteoclastos TRAP+ fue significativamente menor en crías nacidas de madres sometidas a LL comparado con los grupos LL+Mel y Control (C:  $8,59 \pm 1,26$ ; LL+Mel:  $7,12 \pm 1,05$ ; LL:  $0,84 \pm 0,53$ ;  $p < 0,05$ ), resultado que se correlaciona con la menor superficie trabecular TRAP+ observada en crías de esos grupos experimentales.

A su vez, el número de osteoclastos TRAP- fue significativamente mayor en la canastilla ósea de crías nacidas de madres sometidas a LL respecto a los grupos LL+Mel y Control (C:  $0,76 \pm 0,36$ ; LL+Mel  $1,15 \pm 0,45$ ; LL  $2,8 \pm 0,66$ ,  $p < 0,05$ ).



**Figura III-24. Número de Osteoclastos TRAP+ y TRAP-.** Representación del número de osteoclastos TRAP+ y TRAP-; \*  $p < 0,01$ , ANOVA- Bonferroni. Las barras con textura a rayas representan el número de osteoclastos TRAP- en cada grupo. Las barras con relleno sólido representan el número de osteoclastos TRAP+.

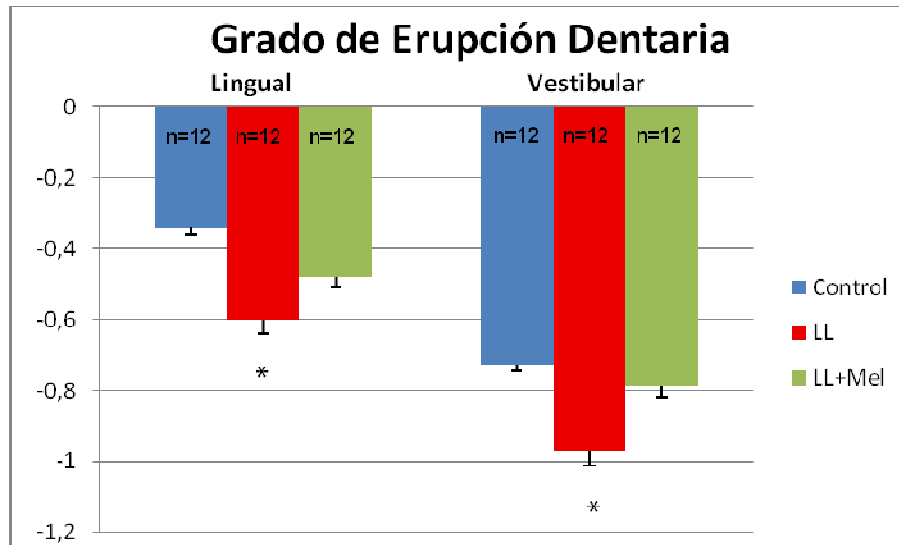


**Figura III-25.** Microfotografías representativas de cortes en sentido buco-lingual a nivel de la canastilla ósea del primer molar mandibular coloreados con la técnica para detección de TRAP. El número de osteoclastos TRAP+ fue significativamente menor en crías nacidas del grupo LL. Lo opuesto se observó con el número de osteoclastos TRAP- el cual fue significativamente mayor en crías nacidas de madres LL en comparación con crías de los grupos LL+Mel y Control. Flechas blancas: Ocs TRAP+; flechas negras: Ocs TRAP-; cabezas blancas de flecha: superficie ósea TRAP+. Magnificación 200X.



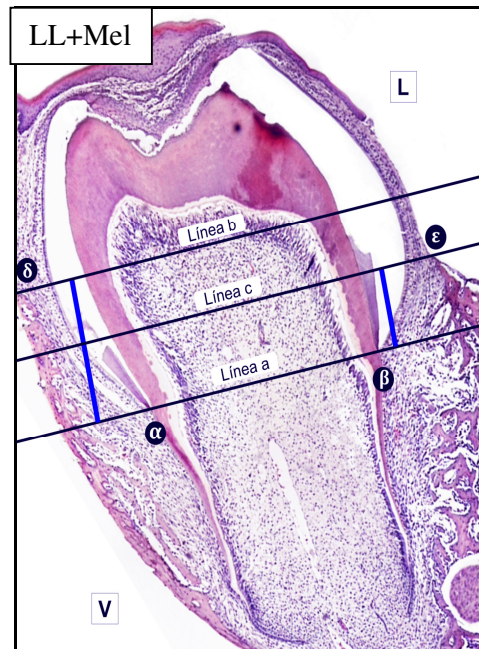
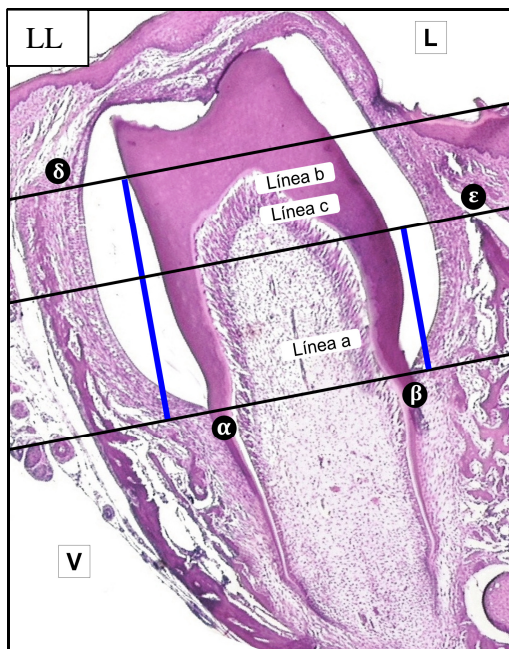
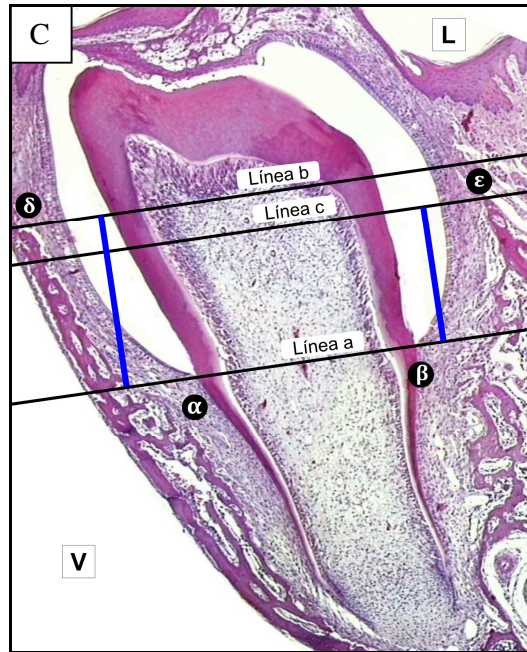
#### d) Grado de Erupción dentaria a los 15 días

El grado de erupción dentaria fue significativamente menor en crías nacidas del grupo LL con respecto a los grupos de crías nacidas de madres LL+Mel y Controles, tanto por lingual (C:  $-0,342 \pm 0,02\text{mm}$  y LL+Mel:  $-0,480 \pm 0,03\text{mm}$  vs LL:  $-0,605 \pm 0,05\text{mm}$  vs.  $p < 0,05$ ) como por vestibular (C:  $-0,726 \pm 0,04$  y LL+Mel  $-0,789 \pm 0,05\text{mm}$  vs LL:  $-0,9718 \pm 0,04$  vs.  $p < 0,01$ ). (Figuras III-26).



**Figura III-26. Grado de erupción dentaria.** El grado de erupción dentaria medido por lingual ( $p < 0,05$ ) y vestibular ( $p < 0,01$ ) fue significativamente menor en crías nacidas del grupo LL con respecto a crías de los grupos LL+Mel y controles (ANOVA- Bonferroni).

En la Figura III-27 se muestran microfotografías representativas de cortes bucolinguales de crías de 15 días de los diferentes grupos. Las líneas indican las diferentes referencias utilizadas para determinar los valores de la ED.



**Figura III-27. Grado de erupción del primer molar inferior en crías de 15 días de edad.** Microfotografías representativas de cortes bucolinguales del primer molar inferior. Mayores longitudes indican menor grado de erupción.  $\alpha$ : LAC vestibular.  $\beta$ : LAC lingual.  $\delta$ : cresta ósea vestibular.  $\epsilon$ : cresta ósea lingual. Distancia a-b: grado de erupción vestibular. Distancia a-c: grado de erupción lingual. Coloración H&E. Magnificación 25X.

## ***IV. DISCUSIÓN***

En el presente trabajo demostramos una asociación entre un ambiente prenatal adverso y ciertos aspectos del modelado y remodelado óseo en mandíbula y en tibia. La exposición a un ambiente prenatal desfavorable inducido por un modelo de estrés variado o de luz constante desde el día 10 al 20 de gestación, provocó en crías de 3 días de edad, un incremento del volumen óseo y una reducción del número de osteoclastos y de sus núcleos en el hueso supracoronal de la canastilla ósea del primer molar inferior. Este hallazgo se relacionó, a los 15 días de edad, con una disminución del grado de erupción dentaria, sugiriendo una disminución del proceso de resorción ósea. Además, a los 60 días de edad, el grado de crecimiento mandibular disminuyó significativamente en crías nacidas de madres sometidas a estrés por LL respecto a crías controles.

Se conoce que los eventos moleculares que promueven la resorción ósea están estrictamente regulados e involucran numerosos factores locales y sistémicos tales como factores de crecimiento, hormonas, factores de transcripción, enzimas y transportadores (Hadjidakis y col., 2006). Entre los factores moleculares secretados por células del folículo dental, la expresión de MCP-1 y de CSF-1 presentan un pico en la rata en el día 3 de vida postnatal. Este incremento coincide con el pico de osteoclastogénesis observado en el folículo a esa edad (Wise y col, 1999). La osteoclastogénesis es también promovida por el ligando RANKL que se une a RANK, receptor presente en los pre-osteoclastos mononucleares (Yao y col., 2004). La unión RANK-RANKL no solo activa una cascada de señalización para la maduración osteoclástica sino también influencia otras vías de señalización regulando la homeostasis ósea. Esta compleja cascada de señales es crucial para la formación de la vía de erupción (Wise y col., 2002). En el presente trabajo, el aumento de volumen óseo hallado en crías de 3 días de edad nacidas de madres estresadas (Fig. III-3), se interpreta como un efecto disruptivo producido por el estrés crónico prenatal sobre el proceso de resorción ósea en las crías.

Además, dado que el osteoclasto es una célula gigante multinucleada que se forma por fusión de precursores mononucleares, la disminución en el número de núcleos por célula indicaría una menor cantidad de precursores participantes en la formación del osteoclasto maduro (Figs. III-5 y III-7). Este dato, junto con la disminución en el número de osteoclastos por área, podría sugerir una alteración en el proceso de osteoclastogénesis en el hueso supracoronal de la canastilla ósea, posiblemente por una deficiencia en factores estimuladores de la osteoclastogénesis como RANK, RANKL, CSF-1 entre otros, o bien una sobre estimulación de OPG.

El recuento de osteoclastos registrados en cortes coloreados con la técnica de H&E fue similar a lo hallado con la técnica para detección de TRAP tanto en crías de los grupos experimentales como en las del grupo control.

Como ya se mencionó, la enzima TRAP se expresa en osteoclastos, pre-osteoclastos y células dendríticas (Hayman y col., 2003). Esta enzima es sintetizada como una pro-enzima latente, activada por clivaje proteolítico y luego liberada a la laguna de Howship durante la resorción. TRAP cumple un rol importante en la degradación de proteínas no colágenas, abundantes en huesos de osificación intramembranosa (Ek-Rylander y col., 1994). El número de células TRAP+ en el folículo dental exhibe su pico en el día 3 de vida postnatal y luego decrece sostenidamente hasta el día 16 simultáneamente con la máxima expresión de factores moleculares secretados por células del folículo dental en ratas normales (Wise y col., 1989). El número reducido de osteoclastos TRAP+ hallado en crías de 3 días de edad nacidas de madres crónicamente estresadas está íntimamente relacionado con el descenso significativo en la superficie trabecular TRAP+ del hueso supracoronal de la canastilla ósea del primer molar inferior acompañado por un aumento significativo de osteoclastos TRAP- (Figs. III-9 y III-11). No es sencillo explicar el por qué del incremento de osteoclastos TRAP- en crías nacidas de madres estresadas. Si bien la TRAP es una enzima marcadora de fenotipo osteoclástico, es posible asumir que la actividad osteoclástica está disminuida en aquellas células TRAP-. Resulta importante señalar que estudios realizados en cultivos de células dendríticas mostraron una reducción en la actividad de TRAP cuando las células son inmaduras e incrementan cinco veces su actividad cuando las células alcanzan la madurez (Hayman y col., 2000). Asimismo, estudios en ratones donde la expresión del gen para TRAP fue bloqueada, muestran abundantes osteoclastos TRAP- y un descenso significativo en la resorción ósea en roedores adultos, causada por una disminución de la actividad osteoclástica (Hayman y col., 2003). En correlación con estos antecedentes, el efecto del estrés crónico durante la gestación estaría reflejando en crías, tanto una disminución de la actividad osteoclástica como de la osteoclastogénesis. Estos resultados sugieren que la desregulación de la osteoclastogénesis provoca un alto número de osteoclastos no funcionales lo cual determinaría una disminución de la resorción ósea.

La asociación existente entre los osteoclastos y la erupción dentaria fue demostrada en modelos de osteopetrosis en rata (Helfrich y col., 2005). En esta enfermedad genética, la diferenciación y maduración osteoclástica es afectada por un desorden displásico óseo caracterizado por un aumento general de la masa ósea.

Consecuentemente, la falta de actividad osteoclástica genera un retardo o una inhibición completa del proceso de erupción dentaria (Wise y col., 2002). Del mismo modo, el tratamiento con bisfosfonatos (drogas inhibidoras de la resorción ósea) a crías de ratas recién nacidas inhibe la actividad osteoclástica y por consiguiente retarda la erupción dentaria (Grier y Wise, 1998). Asimismo, el proceso eruptivo es retardado o completamente inhibido en patologías tales como diabetes (Villarino y col., 2005) o en estados de intoxicación con cromo (De Lucca y col., 2009) o uranio (Pujadas Bigi y col., 2003). En el presente trabajo, la disminución en 1,55 veces del grado de erupción del primer molar inferior en crías de 15 días de edad nacidas de madres estresadas, indicaría un retraso del proceso de erupción dentaria debido a un retardo en la maduración de osteoclastos y consecuentemente en su actividad, esencial para la formación del canal de erupción (Fig. III-16).

Una de las respuestas del organismo al estrés es la secreción de altas concentraciones de GCs por estimulación del eje HPA. En ratas preñadas bajo condiciones normales, el pasaje de los GCs a la circulación fetal es controlado por la enzima placentaria  $11\beta$ -HSD2. Esta enzima cataliza la conversión de la corticosterona en 11-ceto formas inertes, limitando así la concentración plasmática de GCs que llegan al feto (Waddell y col., 1998). Bajo condiciones estresantes, la sobre estimulación materna del eje HPA incrementa los niveles de GCs y la actividad de  $11\beta$ -HSD2 sería insuficiente para catalizar la conversión de corticosterona a 11-ceto formas. De este modo, la corticosterona materna podría atravesar la placenta y llegar a la circulación fetal (Mairesse y col., 2007). En consecuencia, los GCs en altas concentraciones, alcanzarían al cerebro fetal logrando alterar la programación de funciones fisiológicas y conductuales (Weinstock, 2005, Zagron y Weinstock, 2006; Mairesse y col., 2007; Sarkar y col., 2008). De esta manera pueden desencadenarse efectos deletéreos a corto y largo plazo, por ejemplo una disminución de la habilidad de aprendizaje y memoria (Tavassoli y col., 2013), retardo de crecimiento intrauterino y bajo peso al nacer (Maccari y col., 2003; Seckl y col., 2004), estos últimos predictores de enfermedades crónicas en la vida adulta (Osmond y col., 2000).

Si bien es conocido que los GCs afectan el remodelado óseo, su acción específica sobre los osteoclastos es controversial. Algunos autores asocian los GCs con un incremento de la resorción ósea (Dalle Carbonare y col., 2005; Elvy Suhana, 2011), mientras que otros muestran que los GCs en rata, inhiben la resorción ósea ya sea por estimulación de la apoptosis de osteoclastos (Dempster y col., 1997), un efecto inhibitor en CSF-1, señal esencial para la osteoclastogénesis (Kim y col., 2006)

o bien por una disminución en el número de osteoclastos y pre-osteoclastos (Wang y col., 2002). En este sentido, nuestros resultados muestran en crías prenatalmente estresadas, una disminución significativa en el número de osteoclastos y pre-osteoclastos con el consiguiente aumento del volumen óseo en el hueso supracoronar de la canastilla ósea del primer molar inferior. Si comparamos nuestros resultados con estudios previos de otros autores, es posible inferir un incremento de los niveles circulantes de GCs por efecto del estrés crónico, lo que apoyaría la hipótesis de una reducción ósea por disminución en el número de osteoclastos y pre-osteoclastos.

Asimismo, hay evidencias que indican que el tratamiento con glucocorticoides a ratas adultas disminuye el largo mandibular y el peso corporal (Fujita y col., 2008a) mientras que el estrés crónico disminuye la masa ósea mandibular en ratones adultos (Seferos y col., 2010). De igual forma, el efecto del estrés prenatal redujo significativamente el crecimiento mandibular en el largo, altura, base y área, a largo plazo (60 días de edad) en crías adultas nacidas de madres sometidas a luz constante crónica (Figs. III-19 y III-20). También, el peso corporal de crías de 3 y 15 días de edad prenatalmente estresadas, fue significativamente menor respecto a crías del grupo control. En resumen, nuestros resultados sugieren que el efecto deletéreo producido por el estrés crónico sobre madres preñadas y observado postnatalmente en las crías, estaría asociado a altos niveles de GCs sistémicos durante la gestación.

Una observación interesante surge de la comparación de los dos modelos de estrés prenatal estudiados. En la mayoría de los parámetros evaluados de mandíbula y tibia, no encontramos diferencias significativas entre ambos tratamientos estresantes. Sin embargo, los resultados muestran una tendencia de mayor agresividad del tratamiento con luz constante respecto al estrés crónico variado. Esta observación se manifestó con mayor énfasis a los 60 días de edad, donde sólo las crías adultas del grupo LL conservaron alteraciones significativas en el crecimiento mandibular y en el peso corporal. Estos resultados indicarían que la acción estresante de la luz constante es más severa que la del estrés crónico variado durante la gestación, dado que los efectos de la LL se manifiestan aun en crías de edad adulta, o sea, a largo plazo.

Por otra parte, el estrés prenatal afectó también la osificación endocondral en tibias de crías nacidas de madres sometidas a ambos modelos estresantes. Esta es la primera vez que se describe histomorfométricamente una alteración significativa del cartílago hipertrofiado y del volumen óseo subcondral producida por estrés crónico

prenatal en tibias de crías prepúberes (Figs. III-12, III-13 y III-17). Existen trabajos que describen sólo una reducción significativa en la longitud de la tibia y el fémur en crías adultas de rata nacidas de madres sometidas a estrés perinatal variado (Dancause y col. 2012) o luego del tratamiento prenatal con dexametasona (Swolin-Eide y col., 2002). En este trabajo encontramos además, en tibias de crías de 15 días de edad, que el estrés prenatal causó un contraste en la distribución del volumen óseo entre las esponjosas primarias y secundarias, siendo el volumen de la esponjosa primaria significativamente mayor en tibias de crías prenatalmente estresadas, mientras que lo opuesto ocurrió a nivel de la esponjosa secundaria (Fig. III-19). Durante el crecimiento en largo de la tibia gradualmente se reemplaza el tejido cartilaginoso por tejido óseo. Es probable que la alteración del espesor de cartílago hipertrofiado y del volumen óseo subcondral encontrado en tibias de crías prenatalmente estresadas, esté asociada a un efecto inhibitorio de los GCs sobre las células mesenquimáticas que participan en la osificación endocondral de huesos largos en crecimiento. Es aceptado que el incremento de los GCs por efecto del estrés disminuye el número de Obs y osteocitos (Hughes y Boyce, 1997; Weinstein y col., 1998; Weinstein y Manolagas, 2000) e inhibe la función de los condrocitos y Obs (Chen y Feldman 1979; Wong y col., 1990; Klaus y col., 2000) lo que conduciría a una alteración en la osificación endocondral observada en este estudio. Otra posible explicación es que las alteraciones observadas en tibias no sean sólo por acción directa de los GCs sobre las células óseas sino también por una acción de los GCs sobre ciertas hormonas que regulan la osificación endocondral. La administración de dexametasona prenatal inhibe en los condrocitos la síntesis del receptor para la hormona de crecimiento lo cual disminuye su sensibilidad a esta hormona. Consecuentemente y dado que la hormona de crecimiento estimula la secreción de IGF-1, la acción paracrina de este factor estaría disminuida (Jux y col., 1998). El IGF-1 es un factor anabólico y estimulador de la formación ósea (Canalis, 1996) por lo tanto su inhibición induce una menor tasa de formación ósea a nivel del hueso subcondral y podría explicar el menor volumen trabecular hallado en nuestro estudio.

Otra posibilidad es que la osificación endocondral se encuentre disminuida debido a un efecto central sobre el sistema circadiano fetal. La caída de melatonina en madres sometidas a luz constante afectaría la programación del NSQ fetal, dado que el tratamiento crónico estresante se inició a los 10 días de preñez, previo al comienzo de la programación materna del reloj circadiano fetal (Bellavía y col., 1996). Por el contrario, en ratas nacidas de madres sometidas a estrés por inmovilización a partir del día 14 de gestación, no se observaron modificaciones ni en el peso corporal ni en parámetros histomorfométricos de tibias tales como perímetro óseo, número de



osteoclastos y superficie erosiva, entre otros (Amugongo y col., 2013). Es probable que estos hallazgos se deban a que el tratamiento estresante comenzó luego de que el NSQ de las crías fuera sincronizado por la madre. Estos resultados confirman que el proceso de sincronización materna se inicia en la rata a partir del día 10 de gestación y puede ser interrumpido por estímulos estresantes iniciados antes de esa edad gestacional.

Como hemos demostrado hasta aquí, el efecto crónico de la luz constante o del estrés variado afecta al hueso mandibular y a la osificación endocondral en tibia. Como ya se mencionó, estos dos tipos de hueso presentan diferencias no sólo en su origen embriológico sino también difieren en la composición de su matriz orgánica (Van des Bos y col., 2008), en las enzimas de degradación (Perez-Amodio y col., 2006) y en algunos factores de crecimiento necesarios para madurar y remodelarse (Everts y col., 2009). Trabajos previos evaluaron la respuesta de ambos huesos frente a un mismo estímulo o patología. Fujita (2008b) describe una respuesta diferencial al evaluar la calidad ósea de tibia y mandíbula ante el tratamiento con bisfosfonatos (risedronato) a ratas en desarrollo. Asimismo, la desnutrición o la ovariectomía aumentan significativamente la pérdida ósea en huesos largos mientras que dicha pérdida en hueso mandibular es mucho menor (Mavropoulos y col., 2007).

En relación con esto, cuando evaluamos volumen óseo en hueso supracoronal de la canastilla y en hueso subcondral de tibias, encontramos resultados opuestos. El estrés prenatal aumentó el volumen óseo en zona supracoronal de la canastilla del primer molar inferior mientras que lo disminuyó en el hueso subcondral de la tibia. No obstante, este resultado es contradictorio en apariencia dado que ambas alteraciones están asociadas a un retardo o inhibición de parámetros de crecimiento en ambos tipos de hueso. En resumen, el estrés prenatal provocado por luz constante o por estrés crónico variado disminuyó significativamente la erupción dentaria y la osificación endocondral en el corto plazo y el crecimiento mandibular en el largo plazo.

Estos resultados apoyan hallazgos previos de nuestro laboratorio, que mostraron que tanto el estrés variado como la luz constante prenatal alteran patrones conductuales, comportamentales y enzimáticos en las crías (Vermouth y col., 1984; Compagnucci, 2008 Tesis de Grado; Cisternas y col., 2010;) y confirman la idea de una disrupción funcional generalizada en la descendencia provocada por el estrés crónico durante la gestación.

Se conoce que el estrés prenatal interrumpe los niveles plasmáticos de melatonina (Persengiev y col., 1991; Depres-Brummer y col., 1995) lo cual tendría múltiples efectos sobre el desarrollo fetal. Una de las hipótesis sostiene que el ritmo de melatonina plasmática materno sincronizaría el sistema circadiano fetal, el que a su vez transmitiría la información a otros tejidos.

En condiciones fisiológicas normales, la melatonina materna comienza a incrementar sus niveles séricos a partir del día 12 de gestación (Tamura y col., 2007). La presencia de luz constante durante la preñez impide la oscilación diaria de la hormona en la madre y alteraría la sincronía inter-celular dentro del propio NSQ (Ohta y col., 2005). Esto conduciría a una disrupción en el NSQ materno comprometiendo su habilidad para generar ritmos, entre ellos el de melatonina. El reloj circadiano fetal ubicado en el NSQ, se desarrolla gradualmente durante el período prenatal y postnatal temprano. En la rata, este período abarca desde el día 15 de la gestación hasta el día 10 del desarrollo postnatal. El sistema circadiano de los fetos y de las crías recién nacidas es programado principalmente por señales maternas no-fólicas durante el desarrollo prenatal y postnatal temprano.

En concordancia con lo anteriormente descrito, crías nacidas de madres pinealectomizadas mediante extirpación de ambos ganglios cervicales superiores, no evidencian un ritmo de actividad diaria de MDH en testículo, siempre y cuando la cirugía se realice antes del día 11 de gestación (Bellavía y col., 1996). Es así que la ausencia de la oscilación diaria de LDH y MDH es interpretada como una consecuencia de la pérdida de la señal rítmica circadiana materna de melatonina y sugiere una interrupción de la sincronización dentro y entre camadas. Esta interpretación se corroboró mediante la ausencia de los ritmos circadianos individuales de bebida observado en crías nacidas de madres pinealectomizadas (Bellavía y col., 2006).

Un hallazgo destacable en el presente trabajo es el efecto del tratamiento con Melatonina en madres preñadas bajo el efecto del estrés crónico. La administración de la hormona melatonina entre los días 17 y 21 de gestación previno los efectos adversos provocados por la luz constante prenatal sobre el proceso eruptivo del primer molar inferior en todos los parámetros analizados en este estudio. Es decir, las crías nacidas del grupo de madres LL+Mel mostraron valores similares a crías controles en el número de osteoclastos, volumen óseo y grado de erupción dentaria. Estudios clínicos y experimentales demostraron que las células óseas presentan ritmos de 24h y estos ritmos estarían controlados, en parte, por melatonina. El ritmo de melatonina

sincroniza los relojes situados en tejidos periféricos, incluido el hueso, manteniendo de esta forma el metabolismo óseo en sintonía con el ciclo luz/oscuridad (Maria y Witt-Enderby., 2013). Los resultados del presente trabajo confirman estudios previos de nuestro laboratorio en los cuales la melatonina exógena materna normalizó las actividades enzimáticas diarias de  $\alpha$ -amilasa de glándula parótida y de MDH testicular y de la conducta circadiana de bebida en ratas pinealectomizadas o tratadas con luz constante (Vermouth y col., 1995; Bellavía y col., 2006; Cisternas y col., 2010). Asimismo, Torres-Farfán y col. (2003) trabajando en primates, demostraron que el tratamiento con melatonina a madres LL, inhibe el aumento de glucocorticoides y revierte la interrupción de las oscilaciones del gen Bmal-1 y del receptor Melatonina-1 en el NSQ del feto (Torres-Farfán y col., 2006). En este sentido, la melatonina exógena administrada al inicio de la noche subjetiva a madres estresadas durante la última fase de la gestación impediría el exceso de GCs (Mendez y col., 2012) previniendo los efectos adversos de éstos sobre la actividad ósea en hueso supracoronaral y tibia.

De este modo, nuestros resultados sugieren que la ausencia de la señal sincronizadora materna, melatonina, como consecuencia de la pinealectomía funcional inducida por la luz constante crónica, impediría la sincronización del NSQ fetal. Alternativamente, no se descarta la posibilidad de que otras señales maternas contribuyan a generar el mismo efecto sincronizador sobre la progenie.

Es probable que la exposición crónica materna a luz constante o a estrés variado durante la gestación constituya para los fetos, una señal predictiva del entorno adverso en el que nacerán. Las respuestas adaptativas del feto le permitirían sobrevivir a un potencial ambiente desfavorable postnatal (Gluckman y col., 2005).

Consecuentemente, es posible que la cría redistribuya su patrón metabólico y consecuentemente su ritmo de maduración, asegurando así el desarrollo de órganos vitales a expensas de otros procesos de crecimiento.

En síntesis, los resultados presentados sugieren que las condiciones prenatales crónicas adversas poseen un efecto desestabilizador en la programación del marcapasos fetal con consecuencias sobre la formación ósea de tibia y mandíbula de la progenie a corto y largo plazo. Asimismo, enfatizan la importancia preventiva de la administración de melatonina sobre la programación del marcapasos fetal, evaluado en este estudio en el proceso de erupción dentaria del primer molar mandibular.

## CONCLUSIONES

Los resultados del presente trabajo permiten establecer las siguientes conclusiones:

- Los modelos de estrés crónico prenatal aplicados (luz constante y estrés variado) afectaron negativamente el proceso de erupción dentaria del primer molar inferior en crías, tanto a los 3 días como a los 15 días de edad.

Colectivamente, nuestros hallazgos sugieren una disminución en la actividad osteoclástica y por lo tanto, un retraso en la formación del canal eruptivo a través del proceso de resorción ósea, lo cual explicaría a su vez el retardo en la erupción observado a los 15 días de edad.

- Asimismo, ambos modelos de estrés prenatal materno provocaron en las crías alteraciones negativas, tanto a los 3 días como a los 15 días de edad, sobre la osificación endocondral de las tibias.
- Además, a los 60 días de edad, sólo el tratamiento por luz constante crónica durante la gestación produjo una disminución significativa en el crecimiento mandibular.

Este hallazgo sugiere un efecto más severo y agresivo del modelo prenatal estresante por luz constante crónica en comparación con el tratamiento de estrés variado, motivo por el cual induciría efectos a largo plazo que se manifiestan en la vida adulta.

- La melatonina exógena prenatal (administrada a madres preñadas sometidas a luz constante) fue capaz de prevenir los efectos adversos provocados por la luz constante sobre la erupción dentaria

Estos resultados confirman la acción preventiva de la hormona melatonina ante los efectos estresantes provocados por la luz constante crónica y sugieren que la supresión del ritmo circadiano de melatonina plasmática materna, secundaria a la exposición de ratas preñadas a luz constante durante la segunda mitad de la gestación, impide una óptima programación prenatal materna generando así disrupciones en el desarrollo fetal.

Colectivamente, la importancia de esta investigación radica en el aporte de una nueva visión de los efectos del estrés prenatal crónico sobre dos clases de tejido óseo embriológicamente diferentes y confirman una vez más que el ritmo circadiano de melatonina materno es una señal clave para la programación prenatal de los ritmos circadianos de las crías.

Estudios futuros permitirán completar el estudio de melatonina sobre los efectos adversos provocados por el estrés prenatal en huesos largos como así también profundizar el estudio de hormonas asociadas al estrés prenatal en las madres, y su pasaje a los fetos. Asimismo, posteriores trabajos permitirán elucidar y comprender posibles mecanismos moleculares asociados al proceso de erupción dentaria y osificación endocondral.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ackermann K, Dehghani F, Bux R, Kauert G, Stehle JH (2007) Day-night expression patterns of clock genes in the human pineal gland. *J Pineal Res* 43: 185-194.

Ahmed, Y. A., Tatarczuch, L., Pagel, C. N., Davies, H. M., Mirams, M., & Mackie, E. J. (2007). Physiological death of hypertrophic chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*, 15(5), 575–586.

Alonso, S. J., M. A. Castelano, D. Afonso and M. Rodríguez. (1991). Sex differences in behavioral despair: relationships between behavioral despair and open field activity. *Physiol. Behav.* 49(1):69-72.

Alterman, A., Mathison, R., Coronel, C.E., Stroppa, M.M., Finkelberg, A.B., Gallará, R.V. (2012). Functional and proteomic analysis of submandibular saliva in rats exposed to chronic stress by immobilization or constant light. *Arch. Oral Biol.* 57, 663–669.

Amugongo SK, Hlusko LJ. (2013). Impact of maternal prenatal stress on growth of the offspring. *Aging Dis.* 4;5(1):1-16.

Anderson DM, Marakovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, Teepe MC, DuBose RF, Cosman D, Galiberti L. (1997). A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 390:175-179.

Anitua E. Introducción a la Biología Ósea. En: Anitua E editor. Un nuevo enfoque en la regeneración ósea. Plasma rico en factores de crecimiento. Vitoria: Puesta al día publicaciones, S.L.; 2000. 17-31.

Arai F, Miyamoto T, Ohneda O, Inada T, Sudo T, Brasel K, Miyata T, Anderson DM, Suda T. (1999). Commitment and differentiation of osteoclast precursor cells by the sequential expression of c-Fms and receptor activator of nuclear factor kappaB (RANK) receptors. *J Exp Med.* 190(12):1741-54.

Axelrod, J. (1974) The pineal gland: A neurochemical transducer. *Science* 184, 1341-1348.

Ballock, R. T., & Reddi, A. H. (1994). Thyroxine is the serum factor that regulates morphogenesis of columnar cartilage from isolated chondrocytes in chemically defined medium. *J. Cell Biol.*, 126(5), 1311–1318.

Barker DJ, Osmond C. (1986). Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet*, 1:1077-81.

Bastepe, M., Weinstein, L. S., Ogata, N., Kawaguchi, H., Juppner, H., Kronenberg, H. M., et al. (2004). Stimulatory G protein directly regulates hypertrophic differentiation of growth plate cartilage in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101(41), 14794–14799.

Bellavía, S.L., Carpentieri, A.R., Vaqué, A.M., Macchione, A.F., Vermouth, N.T. (2006). Pup circadian rhythm entrainment--effect of maternal ganglionectomy or pinealectomy. *Physiol. Behav.* 89, 342–349.

- Bellavía, S.L., Carpentieri, A.R., Vermouth, N.T. (1996). Prenatal Entrainment of Rat Testicular Malate Dehydrogenase Activity Circadian Rhythm. *Biological Rhythm Research*. 27, 302–313.
- Berkovitz BK. (1971). The effect of root transection and partial root resection on the unimpeded eruption rate of the rat incisor. *Arch Oral Biol*. 16(9):1033-43.
- Bitgood, M. J., & McMahon, A. P. (1995). Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell–cell interaction in the mouse embryo. *Dev. Biol.*, 172(1), 126–138.
- Blask DE, Dauchy RT, Sauer LA, (2005) Putting cancer to sleep at night: the neuroendocrine/circadian melatonin signal. *Endocrine* 27: 179-188.
- Bock J, Murmu MS, Biala Y, Weinstock M, Braun K. (2011). Prenatal stress and neonatal handling induce sex-specific changes in dendritic complexity and dendritic spine density in hippocampal subregions of prepubertal rats. *Neuroscience.*;193:34-43.
- Bonewald LF. (2002). Osteocytes: A proposed multifunctional bone cell. *J Musculoskel Neuron Interact* 2:239-241.
- Boyce BF, Yao Z, Xing L. (2009). Osteoclasts have multiple roles in bone in addition to bone resorption. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 19:171-180.
- Boyce BF, Yao Z; Zhang O, Guo R, Lu Y, Swarcz EM, Xing L. (2007). New roles for osteoclasts in bone. *Ann N Y Acad Sci* 1116:245-254.
- Boyce BF, Yoneda T, Lowe C, Soriano P, Mundy GR. (1992). Requirement of pp60c-src expression for osteoclasts to form ruffled borders and resorb bone in mice. *J Clin Invest* 90:1622–1627.
- Boyce WT, Ellis BJ. (2005). Biological sensitivity to context: I. An evolutionary-developmental theory of the origins and functions of stress reactivity. *Dev. Psychopathol.*;17(2):271-301.
- Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423:337–342.
- Brouwers PM, van Baar L, Pop JM. (2001). Maternal anxiety during pregnancy and subsequent infant development *Infant Behavior and Development*. 24 (1):95-106.
- Bryer LW. (1957). An experimental evaluation of the physiology of tooth eruption. *Int Dent J.*, 7: 432-478.
- Brzozowski T, Konturek PC, Zwirska-Korczala K, Konturek SJ, Brzozowska I, Drozdowicz D, Sliwowski Z, Pawlik M, Pawlik WW, Hahn EG. (2005). Importance of the pineal gland, endogenous prostaglandins and sensory nerves in the gastroprotective actions of central and peripheral melatonin against stress-induced damage. *J Pineal Res*. 39(4):375-85.

Burton PJ, Waddell BJ. (1999). Dual function of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in placenta: modulating placental glucocorticoid passage and local steroid action. *Biol Reprod.* 60(2):234-40.

Cabrera, R. J., E. L. Rodríguez Echandia, A. S. G. Janiff and M. Fóscolo. (1999). Effects of prenatal exposure to a mild chronic variable stress on body weight, preweaning mortality and rat behavior. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 32:1229-1237.

Cahill DR, Marks SC Jr (1980). Tooth eruption: evidence for the central role of the dental follicle. *J Oral Pathol Med* 9:189-200.

Cahill DR, Marks SC Jr, Wise GE, Gorski JP (1988). A review and comparison of tooth eruption systems used in experimentation— a new proposal on tooth eruption. In: *The biological mechanisms of tooth eruption and root resorption*. Davidovitch Z, editor. Birmingham, AL: EBSCO Media, pp. 1-7.

Cahill DR, Marks SC Jr. (1980). Tooth eruption: evidence for the central role of the dental follicle. *J Oral Pathol.* 9(4):189-200.

Cahill DR. (1969). Eruption pathway formation in the presence of experimental tooth impaction in puppies. *Anat Rec.* 164(1):67-77.

Campbell, S.S., Murphy, P.J., Van den Heuvel, C.J., Roberts, M.L., Stauble, T.N. (1999). Etiology and treatment of intrinsic circadian rhythm sleep disorders. *Sleep Med Rev.* 3, 179–200.

Canalis EJ. (1996). Clinical review 83: Mechanisms of glucocorticoid action in bone: implications to glucocorticoid-induced osteoporosis. *Clin Endocrinol Metab.*81(10):3441-7.

Cardinali, D. P and P. Pévet. (1998). Basic aspects of melatonin actions. *Sleep Medicine Reviews* 2(3):175-190.

Carlson B. *Embriología humana y biología del desarrollo*. 3ª Edición 2007. Editorial Mosby

Chen TL, Feldman D. (1979). Glucocorticoid receptors and actions in subpopulations of cultured rat bone cells. Mechanism of dexamethasone potentiation of parathyroid hormone-stimulated cyclic AMP production. *J Clin Invest.* 63(4):750-8

Chiarenza AP, Sanz EG, Vermouth NT, Aoki A, Bellavia SL. (1989). Effects of continuous light on rat parotid gland structure and reactivity. *Anat Embryol (Berl).*179(5):497-501.

Christensen LR, Møllgård K, Kjaer I, Janas MS. (1993). Immunocytochemical demonstration of nerve growth factor receptor (NGF-R) in developing human fetal teeth. *Anat Embryol (Berl).* 188(3):247-55.

Cielinski MJ, Jolie M, Wise GE, Ando DG, Marks SC Jr (1994). Colony-stimulating factor-1 (CSF-1) is a potent stimulator of tooth eruption in the rat. In: *The biological mechanisms of tooth eruption, resorption and replacement by implants*. Davidovitch Z, editor. Birmingham, AL: EBSCO Media, pp. 429-436.



Cisternas CD (2007) *Sincronización materna del sistema circadiano fetal. Influencia de Agentes externos prenatales adversos sobre las oscilaciones circadianas de conducta de bebida y de MDH en testículo de ratas*. Tesis de Grado. Argentina, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. U.N.C.

Cisternas, C.D., Compagnucci, M.V., Conti, N.R., Ponce, R.H., Vermouth, N.T. (2010). Protective effect of maternal prenatal melatonin administration on rat pups born to mothers submitted to constant light during gestation. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 43, 874–882.

Cohen S (1962). Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the newborn animal. *J Biol Chem* 237:1555-1562.

Cole, A.A., Walters, L.M. (1987). Tartrate-resistant acid phosphatase in bone and cartilage following decalcification and cold-embedding in plastic. *J. Histochem. Cytochem.* 35, 203–206.

Compagnucci M (2008) *Influencia de condiciones externas adversas durante la gestación sobre la sincronización del reloj circadiano fetal. Estudio bioquímico y conductual a largo plazo*. Tesis de Grado. Argentina, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. U.N.C.

Dahlof, L. G., E. Hard and K. Larsson. (1978). Influence of maternal stress on the development of the fetal genital system. *Physiol. Behav.* 20:193-195.

Dalle Carbonare, L., Bertoldo, F., Valenti, M.T., Zenari, S., Zanatta, M., Sella, S., Giannini, S., Cascio, V.L. (2005). Histomorphometric analysis of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Micron.* 36, 645–652.

Dancause KN, Laplante DP, Oremus C, Fraser S, Brunet A, King S. (2011). Disaster-related prenatal maternal stress influences birth outcomes: project Ice Storm. *Early Hum Dev.* 87(12):813-20.

Dancause KN, Cao XJ, Veru F, Xu S, Long H, Yu C, Laplante DP, Walker CD, King S. (2012). Brief communication: prenatal and early postnatal stress exposure influences long bone length in adult rat offspring. *Am J Phys Anthropol.* 149(2):307-11.

Davis FC, Gorski RA. (1988). Development of hamster circadian rhythms: role of the maternal suprachiasmatic nucleus. *J Comp Physiol A.*;162(5):601-10.

Davis, F. C. (1997). Melatonin: Role in development. *Journal of Biological Rhythms* 12(6):498-508.

De Lucca, R.C., Dutrey, P.L., Villarino, M.E., Ubios, A.M. (2009). Effect of different doses of hexavalent chromium on mandibular growth and tooth eruption in juvenile Wistar rats. *Exp. Toxicol. Pathol.* 61, 347–352.

de Souza Faloni AP, Schoenmaker T, Azari A, Katchburian E, Cerri PS, de Vries TJ, Everts V. (2011). Jaw and long bone marrows have a different osteoclastogenic potential. *Calcif Tissue Int.* 88(1):63-74.

- Dempster, D.W., Moonga, B.S., Stein, L.S., Horbert, W.R., Antakly, T. (1997). Glucocorticoids inhibit bone resorption by isolated rat osteoclasts by enhancing apoptosis. *J. Endocrinol.* 154, 397–406.
- Deprés-Brummer P, Lévi F, Metzger G, Touitou Y. (1995). Light-induced suppression of the rat circadian system. *Am J Physiol.* 268(5 Pt 2):R1111-6.
- D'mello AP, Liu Y. (2006). Effects of maternal immobilization stress on birth weight and glucose homeostasis in the offspring. *Psychoneuroendocrinology.*;31(3):395-406.
- Ek-Rylander B, Flores M, Wendel M, Heinegård D, Andersson G. (1994). Dephosphorylation of osteopontin and bone sialoprotein by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. Modulation of osteoclast adhesion in vitro. *J Biol Chem.* 269(21):14853-6.
- Elvy Suhana, M.R., Fariyah, H.S., Faizah, O., Nazrun, A.S., Norazlina, M., Norliza, M., Ima-Nirwana, S. (2011). Effect of 11 $\beta$ -HSD1 dehydrogenase activity on bone histomorphometry of glucocorticoid-induced osteoporotic male Sprague-Dawley rats. *Singapore Med J.* 52, 786–793.
- Eratalay YK, Simmons DJ, El-Mofty SK, Rosenberg GD, Nelson W, Haus E, Halberg F. (1981). Bone growth in the rat mandible following every-day or alternate-day methylprednisolone treatment schedules. *Arch Oral Biol.* 26(10):769-77.
- Everts V, de Vries TJ, Helfrich MH. (2009). Osteoclast heterogeneity: lessons from osteopetrosis and inflammatory conditions. *Biochim Biophys Acta.* 1792(8):757-65.
- Eynard A, Valentich M, Rovasio R. *Histología y embriología del ser humano: bases celulares y moleculares.* 4<sup>a</sup> Edición. Editorial Médica Panamericana, 2008. 696 p. ISBN: 978-950-06-0602-8.
- Felix E, Cecchini MG, Hofstetter W, Elford PR, Stutzer A, Fleisch H (1990). Impairment of macrophage colony-stimulating factor production and lack of resident bone marrow macrophages in the osteopetrotic op/op mouse. *J Bone Miner Res* 5:781-789.
- Fischbeck KL, Rasmussen KM. (1987) Effect of Repeated Reproductive Cycles on Maternal Nutritional Status, Lactational Performance and Litter Growth in Ad Libitum-Fed and Chronically Food-Restricted Rats. *Journal of Nutrition.* 117: 1967-1975.
- Franzoso G, Carlson L, Xing L, Poljak L, Shores EW, Brown KD, et al. (1997). Requirement for NF- $\kappa$ B in osteoclast and B-cell development. *Genes Dev* 11:3482-3496.
- Fride, E. and A. Weinstock. (1984). The effects of prenatal exposure to predictable or unpredictable stress on early development in the rat. *Dev. Psychobiol.* 17(6):651-660.
- Frost HM. (2001). Cybernetic aspects of bone modeling and remodeling, with special reference to osteoporosis and whole-bone strength. *Am J Hum Biol* 13:235–248.

Fujita Y, Konoo T, Maki K. (2008a). Short-term etidronate treatment prevents glucocorticoid-induced bone debility of the mandible in growing rats. *Orthod Craniofac Res.* 11(4):187-95.

Fujita Y. (2008b). Differential Response of Risedronate on Tibial and Mandibular Bone Quality in Glucocorticoid-treated Growing Rats. *The Journal of the Kyushu Dental Society*; ISSN:0368-6833; 62:1-17.

Geneser F. *Histología*. 3ª Edición. Editorial Médica Panamericana, 2000. 814 p. ISBN: 978-950-06-0883-1.

Giglio MJ, Lama MA. (2001). Effect of experimental diabetes on mandible growth in rats *Eur J Oral Sci.* 109(3):193-7.

Gluckman PD, Hanson MA. (2004). Developmental origins of disease paradigm: a mechanistic and evolutionary perspective. *Pediatr Res*, 56:311-7.

Gluckman, P.D., Cutfield, W., Hofman, P., Hanson, M.A. (2005). The fetal, neonatal, and infant environments-the long-term consequences for disease risk. *Early Hum. Dev.* 81, 51–59.

Gluckman, P.D., Hanson, M.A., Cooper, C., Thornburg, K.L. (2008). Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. *N. Engl. J. Med.* 359, 61–73.

Gómez de Ferraris ME; Campos Muñoz A. *Histología, Embriología e Ingeniería Tisular Bucodental*. 3ª Edición. Ed. Médica Panamericana, 2009. 454 p. ISBN: 978-847-90-3449-8.

Gorski JP, Marks SC Jr, Cahill DR, Wise GE. (1988). Developmental changes in the extracellular matrix of the dental follicle during tooth eruption. *Connect Tissue Res.* 18(3):175-90.

Grier RL 4th, Wise GE. (1998). Inhibition of tooth eruption in the rat by a bisphosphonate. *J Dent Res.* 77(1):8-15.

Grier, R.L., 4th, Wise, G.E. (1998). Inhibition of tooth eruption in the rat by a bisphosphonate. *J. Dent. Res.* 77, 8–15.

Grigoriadis AE, Wang ZQ, Cecchini MG, Hofstetter W, Felix R, Fleisch HA, et al. (1994). c-Fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling. *Science* 266:443–448.

Grigoriadis AE, Wang ZQ, Cecchini MG, Hofstetter W, Felix R, Fleisch HA, et al. (1994). c-Fos: a key regulator of osteoclastmacrophage lineage determination and bone remodeling. *Science* 266:443-448.

Hadjidakis, D.J., Androulakis, I.I. (2006). Bone remodeling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1092, 385–396.

Hales CN, Barker DJ. (1992). Type 2 (non-insulin- dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia*, 35:595-601.

Hales CN, Barker DJ. (2001). The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull.*;60:5-20.

Hayman, A.R., Bune, A.J., Bradley, J.R., Rashbass, J., Cox, T.M. (2000). Osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase (Acp 5): its localization to dendritic cells and diverse murine tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 48, 219–228.

Hayman, A.R., Cox, T.M. (2003). Tartrate-resistant acid phosphatase knockout mice. *J. Bone Miner. Res.* 18, 1905–1907.

Helfrich, M.H. (2005). Osteoclast diseases and dental abnormalities. *Arch. Oral Biol.* 50, 115–122.

Herzberg F, Schour I. (1941). Effects of the removal of pulp and Hertwig's sheath on the eruption of the incisors in the albino rat. *J Dent Res.*, 20:264 (abstract 61).

Huang H, Wise GE (2000). Delay of tooth eruption in null mice devoid of the type I IL-1R gene. *Eur J Oral Sci* 108:297-302.

Hughes DE, Boyce BF. (1997). Apoptosis in bone physiology and disease. *Mol Pathol.* 50(3):132-7.

Iizuka T, Cielinski M, Aukerman SL, Marks SC Jr (1992). The effects of colony-stimulating factor-1 on tooth eruption in the toothless (osteopetrotic) rat in relation to the critical periods for bone resorption during tooth eruption. *Arch Oral Biol* 37:629-636.

Ikeda T, Kasai M, Utsuyama M, Hirokawa K. (2001). Determination of three isoforms of the receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand and their differential expression in bone and thymus. *Endocrinology.* 142(4):1419-26.

Iotsova V, Caamano J, Loy J, Yang Y, Lewin A, Bravo R. (1997). Osteopetrosis in mice lacking NF- $\kappa$ B1 and NF- $\kappa$ B2. *Nat Med* 3:1285–1289.

Jux C, Leiber K, Hügel U, Blum W, Ohlsson C, Klaus G, Mehls O. (1998). Dexamethasone impairs growth hormone (GH)-stimulated growth by suppression of local insulin-like growth factor (IGF)-I production and expression of GH- and IGF-I-receptor in cultured rat chondrocytes. *Endocrinology*;139(7):3296-305.

Kapoor, A., Dunn, E., Kostaki, A., Andrews, M.H., Matthews, S.G. (2006). Fetal programming of hypothalamo-pituitary-adrenal function: prenatal stress and glucocorticoids. *J. Physiol. (Lond.)* 572, 31–44.

Katz RJ, Roth KA, Carroll BJ. (1981). Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression. *Neurosci Biobehav Rev.*;5(2):247-51.

Kensara OA, Wootton SA, Phillips DI, et al. (2005). Fetal programming of body composition: relation between birth weight and body composition measured with

dualenergy X-ray absorptiometry and anthropometric methods in older Englishmen. *Am J Clin Nutr*, 82:980-7.

Kim, H.-J., Zhao, H., Kitaura, H., Bhattacharyya, S., Brewer, J.A., Muglia, L.J., Ross, F.P., Teitelbaum, S.L. (2006). Glucocorticoids suppress bone formation via the osteoclast. *J. Clin. Invest.* 116, 2152–2160.

Klaus G, Jux C, Leiber K, Hügel U, Mehls O. (1996). Interaction between insulin-like growth factor I, growth hormone, parathyroid hormone, 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and steroids on epiphyseal chondrocytes. *Acta Paediatr Suppl.* 417:69-71.

Klaus G, Jux C, Fernandez P, Rodriguez J, Himmele R, Mehls O. (2000). Suppression of growth plate chondrocyte proliferation by corticosteroids. *Pediatr Nephrol.*14(7):612-5.

Klein, D.C. (1972). Evidence for the placental transfer of 3 H-acetyl-melatonin. *Nature New Biol.* 237, 117–118.

Klein DC, Moore RY. (1979). Pineal N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase: control by the retinohypothalamic tract and the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* 174(2):245-62.

Koenig JI, Elmer GI, Shepard PD, Lee PR, Mayo C, Joy B, Hercher E, Brady DL. (2005). Prenatal exposure to a repeated variable stress paradigm elicits behavioral and neuroendocrinological changes in the adult offspring: potential relevance to schizophrenia. *Behav Brain Res.* 156(2):251-61.

Liu D, Yao S, Wise GE. (2012). Regulation of SFRP-1 expression in the rat dental follicle. *Connect Tissue Res.* 53(5):366-72.

Maccari, S., Darnaudery, M., Morley-Fletcher, S., Zuena, A.R., Cinque, C., Van Reeth, O. (2003). Prenatal stress and long-term consequences: implications of glucocorticoid hormones. *Neurosci Biobehav Rev.* 27, 119–127.

Mackie EJ, Ahmed YA, Tatarczuch L, Chen KS, Mirams M. (2008). Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int J Biochem Cell Biol.* 40(1):46-62.

Mairesse, J., Lesage, J., Breton, C., Bréant, B., Hahn, T., Darnaudéry, M., Dickson, S.L., Seckl, J., Blondeau, B., Vieau, D., Maccari, S., Viltart, O. (2007). Maternal stress alters endocrine function of the fetoplacental unit in rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 292, E1526–1533.

Mandalunis PM, Villarino ME, Puritano Manisagian GE, Ubios AM. (2009). Respuesta diferencial del hueso maxilar y la tibia a enfermedades sistémicas. *Abstract. J Dent Res* 88 B: 22. [www.dentalresearch.org](http://www.dentalresearch.org)

Mann GB, Fowler KJ, Gabriel A, Nice EC, Williams RL, Dunn AR (1993). Mice with a null mutation of the TGF $\alpha$  gene have abnormal skin architecture, wavy hair, and curly whiskers and often develop corneal inflammation. *Cell* 73:249-261.

Maria S, Witt-Enderby PA. (2013). Melatonin effects on bone: potential use for the prevention and treatment for osteopenia, osteoporosis, and periodontal disease and for use in bone-grafting procedures. *J Pineal Res.* doi: 10.1111/jpi.12116. [Epub ahead of print]

Marks SC Jr.( 1973). Pathogenesis of osteopetrosis in the rat: reduced bone resorption due to reduced osteoclast function. *Am J Anat.* 138(2):165-89.

Marks SC Jr, Cahill DR, Wise GE (1983). The cytology of the dental follicle and adjacent alveolar bone during tooth eruption in the dog. *Am J Anat* 168:277-289.

Marks SC Jr, Cahill DR (1984). Experimental study in the dog of the non-active role of the tooth in the eruptive process. *Arch Oral Biol* 29:311-322.

Marks SC Jr. (1989). Osteoclast biology: lessons from mammalian mutations. *Am J Med Genet.* 34(1):43-54.

Marks SC Jr, Schroeder HE. (1996). Tooth eruption: theories and facts. *Anat Rec.* 245(2):374-93.

Massler M, Schour I, Poncher, HG. (1941). Developmental pattern of the child as reflected in the calcification pattern of the teeth *Am J Dis Child.* 62(1):33-67.

Massler M, Schour I. (1941). Studies in tooth development: Theories of eruption, *American Journal of Orthodontics and Oral Surgery.* 27 (10):552-576.

Mavropoulos A, Rizzoli R, Ammann P. (2007). Different responsiveness of alveolar and tibial bone to bone loss stimuli. *J Bone Miner Res.* 22(3):403-10.

McCormick CM, Smythe JW, Sharma S, Meaney MJ. (1995). Sex-specific effects of prenatal stress on hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress and brain glucocorticoid receptor density in adult rats. *Brain Res Dev Brain Res.*14;84(1):55-61.

McMillen IC, Robinson JS. (2005). Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol Rev.*;85(2):571-633.

Meek, L.R., Burda, K.M., Paster, E. (2000). Effects of prenatal stress on development in mice: maturation and learning. *Physiol. Behav.* 71, 543–549.

Meijer, J.H., Rietveld, W.J. (1989). Neurophysiology of the suprachiasmatic circadian pacemaker in rodents. *Physiol. Rev.* 69, 671–707.

Mendez, N., Abarzua-Catalan, L., Vilches, N., Galdames, H.A., Spichiger, C., Richter, H.G., Valenzuela, G.J., Seron-Ferre, M., Torres-Farfan, C. (2012). Timed maternal melatonin treatment reverses circadian disruption of the fetal adrenal clock imposed by exposure to constant light. *PLoS ONE.* 7, e42713.

- Minina, E., Kreschel, C., Naski, M. C., Ornitz, D. M., & Vortkamp, A. (2002). Interaction of FGF, Ihh/Pthlh, and BMP signaling integrates chondrocyte proliferation and hypertrophic differentiation. *Dev. Cell*, 3(3), 439–449.
- Moore, RY (1996). Neural control of the pineal gland. *Behavioral Brain Research*. 73:125-130.
- Nesbitt S, Nesbit A, Helfrich M, Horton M. (1993). Biochemical characterization of human osteoclast integrins. Osteoclasts express alpha v beta 3, alpha 2 beta 1, and alpha v beta 1 integrins. *J Biol Chem*. 268(22):16737-45.
- Nilsson, O., Marino, R., De Luca, F., Phillip, M., & Baron, J. (2005). Endocrine regulation of the growth plate. *Horm. Res.*, 64(4), 157–165.
- Novack DV, Faccio R. (2011). Osteoclast motility: putting the brakes on bone resorption. *Ageing Res Rev* 10:54-61.
- Ohta, H., Yamazaki, S., McMahon, D.G. (2005). Constant light desynchronizes mammalian clock neurons. *Nat. Neurosci.* 8, 267–269.
- Osborn JW, Price DG. (1988). An autoradiographic study of periodontal development in the mouse. *J Dent Res*. 67(2):455-61.
- Osmond C, Barker DJP, Winter PD, Fall CHD, Simmonds SJ. (1993). Early growth and death from cardiovascular disease in women. *BMJ*,307:1519-24.
- Osmond, C., Barker, D.J. (2000). Fetal, infant, and childhood growth are predictors of coronary heart disease, diabetes, and hypertension in adult men and women. *Environ. Health Perspect.* 108 Suppl 3, 545–553.
- Painter RC, Roseboom TJ, de Rooij SR. (2012). Long-term effects of prenatal stress and glucocorticoid exposure. *Birth Defects Res C Embryo Today* 96(4):315-24.
- Pandi-Perumal, S.R., Srinivasan, V., Maestroni, G.J.M., Cardinali, D.P., Poeggeler, B., Hardeland, R. (2006). Melatonin: Nature's most versatile biological signal? *FEBS J.* 273, 2813–2838.
- Parfitt AM.( 2006). Misconceptions V-Activation of osteoclasts is the first step in the bone remodelling cycle. *Bone* 39:1170-1172.
- Parfitt, A.M., Drezner, M.K., Glorieux, F.H., Kanis, J.A., Malluche, H., Meunier, P.J., Ott, S.M., Recker, R.R. (1987). Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J. Bone Miner. Res.* 2, 595–610.
- Perez-Amodio S, Jansen DC, Schoenmaker T, Vogels IM, Reinheckel T, Hayman AR, Cox TM, Saftig P, Beertsen W, Everts V. (2006). Calvarial osteoclasts express a higher level of tartrate-resistant acid phosphatase than long bone osteoclasts and activation does not depend on cathepsin K or L activity. *Calcif Tissue Int.* 79(4):245-54.



- Persengiev S, Kanchev L, Vezenkova G. (1991). Circadian patterns of melatonin, corticosterone, and progesterone in male rats subjected to chronic stress: effect of constant illumination. *J Pineal Res.* 11(2):57-62.
- Peters, D.A. (1982). Prenatal stress: effects on brain biogenic amine and plasma corticosterone levels. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 17, 721–725.
- Pfister, H. P. and J. L. Muir. (1992). Prenatal exposure to predictable and unpredictable novelty stress and oxytocin treatment affects offspring development and behavior in rats. *Int. J. Neurosci.* 62(3-4):227-241.
- Philbrick WM, Dreyer BE, Nakchbandi IA, Karaplis AC (1998). Parathyroid hormone-related protein is required for tooth eruption. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:11846-11851.
- Pisano MM, Greene RM. (1986). Hormone and growth factor involvement in craniofacial development. *J Med Sci* 14: 635-640.
- Pluess, M., Belsky, J. (2011). Prenatal programming of postnatal plasticity? *Dev. Psychopathol.* 23, 29–38.
- Ponce, R.H., Carriazo, C.S., Vermouth, N.T. (2001). Lactate dehydrogenase activity of rat epididymis and spermatozoa: effect of constant light. *Eur J Histochem.* 45, 141–150.
- Prieto S. Control del metabolismo del calcio, fósforo y magnesio. En: Tresguerres J.A.F., editor. *Fisiología humana*. 2ª edición. Madrid: Mc Graw-Hill; 1999. 979-993
- Prieto S. Fisiología del hueso. En: Tresguerres J.A.F., editor. *Fisiología humana*. 3ª edición. Madrid: Mc Graw-Hill; 2005. 981-994.
- Pucciarelli HM. (1980). The effects of race, sex, and nutrition on craniofacial differentiation in rats. A multivariate analysis. *Am J Phys Anthropol.* 53(3):359-68.
- Pujadas Bigi, M.M., Lemlich, L., Mandalunis, P.M., Ubios, A.M. (2003). Exposure to oral uranyl nitrate delays tooth eruption and development. *Health Phys.* 84, 163–169.
- Pujadas Bigi MM, Ubios AM. (2007). Catch-up of delayed tooth eruption associated with uranium intoxication. *Health Phys.* 92(4):345-8.
- Reiter, RJ. (1991) Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr. Rev.* 12, 151-180.
- Reiter RJ (1992) The ageing pineal gland and its physiological consequences. *Bio Essays* 14: 169-175.
- Reiter, RJ. (2004) Mechanisms of cancer inhibition by melatonin. *J Pineal Res* 37: 213-214.
- Renard GM, Suárez MM, Levin GM, Rivarola MA. (2005). Sex differences in rats: effects of chronic stress on sympathetic system and anxiety. *Physiol Behav.* 30;85(3):363-9.

- Reppert SM, Coleman RJ, Heath HW, Keutmann HT. (1982). Circadian properties of vasopressin and melatonin rhythms in cat cerebrospinal fluid. *Am J Physiol.*243(6):E489-98.
- Reppert SM, Schwartz WJ. (1983). Maternal coordination of the fetal biological clock in utero. *Science.* 220(4600):969-71.
- Reppert, S.M. (1985). Maternal entrainment of the developing circadian system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 453, 162–169.
- Reppert SM, Schwartz WJ. (1986). Maternal suprachiasmatic nuclei are necessary for maternal coordination of the developing circadian system. *J Neurosci.*;6(9):2724-9.
- Reppert SM. (1995). Interaction between the circadian clocks of mother and fetus. *Ciba Found Symp.*;183:198-207; discussion 207-11.
- Richardson, H. N.; E. P. Zorrilla; C. D. Mandyam and C. L Rivier. (2006). Exposure to repetitive versus varied stress during prenatal development generates two distinct anxiogenic and neuroendocrine profiles in adulthood. *Endocrinology.* 147(5):2506-2517.
- Roth JA, Kim BG, Lin WL, Cho MI. (1999). Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. *J Biol Chem.* 274(31):22041-7.
- Sarkar P, Bergman K, O'Connor TG, Glover V. (2008). Maternal antenatal anxiety and amniotic fluid cortisol and testosterone: possible implications for foetal programming. *J Neuroendocrinol.* 20(4):489-96.
- Seckl, J.R. (2004). Prenatal glucocorticoids and long-term programming. *Eur. J. Endocrinol.* 151 Suppl 3, U49–62.
- Seferos N, Kotsiou A, Petsaros S, Rallis G, Tesseromatis C. (2010). Mandibular bone density and calcium content affected by different kind of stress in mice. *J Musculoskeletal Neuronal Interact.* 10(3):231-6.
- Selye, H. (1976). Forty years of stress research: principal remaining problems and misconceptions. *Can Med Assoc J.* 115, 53–56.
- Semenchenko, G.V., Anisimov, V.N., Yashin, A.I. (2004). Stressors and antistressors: how do they influence life span in HER-2/neu transgenic mice? *Exp. Gerontol.* 39, 1499–1511.
- Shearman RM, Burke AC. (2009). The lateral somitic frontier in ontogeny and phylogeny. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 312:603-612.
- Shiu, SYW (2007) Towards rational and evidence-based use of melatonin in prostate cancer prevention. *J Pineal Res* 43:1-9.
- Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, et al. (1992). Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- $\beta$ 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 359:693-699.

- Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, et al. (1997). Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89:309–319.
- Sutton PR, Graze HR. (1985). The blood-vessel thrust theory of tooth eruption and migration. *Med Hypotheses*. 18(3):289-95.
- Swolin-Eide D, Dahlgren J, Nilsson C, Albertsson Wikland K, Holmäng A, Ohlsson C. (2002). Affected skeletal growth but normal bone mineralization in rat offspring after prenatal dexamethasone exposure. *J Endocrinol*. 174(3):411-8.
- Takahashi N, Akatsu T, Udagawa N, Sasaki T, Yamaguchi A, Moseley JM, Martin TJ, Suda T. (1988). Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. *Endocrinology* 123:2600-2602.
- Takahashi, L. K. and Kalin N. H. (1991). Early developmental and temporal characteristics of stress-induced secretion of pituitary-adrenal hormones in prenatally stressed rats pups. *Brain Res*. 558:75-78.
- Tam JP (1985). Physiological effects of transforming growth factor in the newborn mouse. *Science* 229:673-675.
- Tamura H, Takayama H, Nakamura Y, Reiter RJ, Sugino N. (2007). Fetal/placental regulation of maternal melatonin in rats. *J Pineal Res*. 44(3):335-40.
- Tan DX, Manchester LC, Hardeland R, Lopez-Burillo S, Mayo JC, Sainz RM, Reiter RJ. (2003). Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin. *J Pineal Res*. 34(1):75-8.
- Tanaka S, Takahashi N, Udagawa N, Tamura T, Akatsu T, Stanley ER, Kurokawa T, Suda T. (1993). Macrophage colony-stimulating factor is indispensable for both proliferation and differentiation of osteoclast progenitors. *J Clin Invest*. 91(1):257-63.
- Tavassoli E, Saboory E, Teshfam M, Rasmi Y, Roshan-Milani S, Ilkhanizadeh B, Hesari AK. (2013). Effect of prenatal stress on density of NMDA receptors in rat brain. *Int J Dev Neurosci*. 31(8):790-5.
- Ten Cate AR. (1995). The experimental investigation of odontogenesis. *Int J Dev Biol*. 39(1):5-11.
- Ten Cate AR. (1998a). Physiological tooth movement eruption and shedding. En: *Oral Histology Development, Structure and Function*. Mosby-Year Book, Inc. Saint Louis, 295-296.
- Ten Cate AR. (1998b). Hard tissue formation and destruction. En: *Oral Histology Development, Structure and Function*. Mosby-Year Book, Inc. Saint Louis, 69-77.
- Tengattini S, Reiter RJ, Dun-Xian T, Pilar-Terron M, Rodella LF, Rezzani R. (2008) Cardiovascular diseases: protective effects of melatonin. *J Pineal Res* 44: 16-25.

- Torres-Farfan C, Richter H, Germain A, Valenzuela GJ, Campino C, Rojas-Garcia P, Forcelledo ML, Torrealba F, Seron-Ferre M (2003) Maternal melatonin selectively inhibits cortisol production in the primates fetal adrenal gland. *J Physiol* 554:841-856
- Torres-Farfan C, Rocco V, Monso C, Valenzuela FJ, Campino C, Germain A, Torrealba F, Valenzuela GJ, Seron-Ferre M (2006) Maternal melatonin effects on clock gene expression in a nonhuman primate fetus. *Endocrinology* 147(10):4518-4626.
- Tsuda E, Goto M, Mochizuki S, Yano K, Kobayashi F, Morinaga T, et al. (1997). Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 234:137–142.
- Vaag AA, Grunnet LG, Arora GP, Brøns C. (2012). The thrifty phenotype hypothesis revisited. *Diabetologia* 55(8):2085-8.
- van den Bos T, Speijer D, Bank RA, Brömme D, Everts V. (2008). Differences in matrix composition between calvaria and long bone in mice suggest differences in biomechanical properties and resorption: Special emphasis on collagen. *Bone*. 43(3):459-68.
- van der Eerden, B. C., Karperien, M., & Wit, J. M. (2003). Systemic and local regulation of the growth plate. *Endocr. Rev.*, 24(6), 782– 801.
- Velazquez E, Esquifino AI, Zueco JA, Ruiz Albusac JM, Blazquez E (1992) Evidence that circadian variations of circulating melatonin levels in fetal and suckling rats are dependent on maternal melatonin transfer *Neuroendocrinology* 55: 321-326.
- Vermouth NT, Ponce RH, Carriazo CS, Blanco A. (1984). Circadian rhythm of lactate dehydrogenase in rat testis. *Comp Biochem Physiol B*. 78(4):897-902.
- Vermouth, N.T., Carriazo, C.S., Gallara, R.V., Carpentieri, A.R., Bellava, S.L. (1995). Maternal coordination of the daily rhythm of malate dehydrogenase activity in testes from young rats: effect of maternal sympathetic denervation of the pineal gland and administration of melatonin. *Chronobiol. Int.* 12, 8–18.
- Vernikos-Danellis, J., Winget, C.M., Hetherington, N.W. (1970). Diurnal rhythm of the pituitary-adrenocortical response to stress: effect of constant light and constant darkness. *Life Sci Space Res*. 8, 240–246.
- Villarino, M.E., Goya, J.A., DE Lucca, R.C., Ubios, A.M. (2005). Alterations of tooth eruption and growth in pups suckling from diabetic dams. *Pediatr. Res*. 58, 695–699.
- Viltart, O., Vanbesien-Mailliot, C.C.A. (2007). Impact of prenatal stress on neuroendocrine programming. *ScientificWorldJournal*. 7, 1493–1537.
- Waddell, B.J., Benediktsson, R., Brown, R.W., Seckl, J.R. (1998). Tissue-specific messenger ribonucleic acid expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 and the glucocorticoid receptor within rat placenta suggests exquisite local control of glucocorticoid action. *Endocrinology*. 139, 1517–1523.

- Wang JM, Griffin JD, Rambaldi A, Chen ZG, Mantovani A (1988). Induction of monocyte migration by recombinant macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol* 141:575-579.
- Wang, Y., Ohtsuka-Isoya, M., Shao, P., Sakamoto, S., Shinoda, H. (2002). Effects of methylprednisolone on bone formation and resorption in rats. *Jpn. J. Pharmacol.* 90, 236–246.
- Ward I. L. and J. Weisz. (1984). Differential effects of maternal stress on circulating levels of corticosterone, progesterone and testosterone in male and female rat fetuses and their mothers. *Endocrinology.* 114(5):1635-1644.
- Ward HE, Johnson EA, Salm AK, Birkle DL. (2000). Effects of prenatal stress on defensive withdrawal behavior and corticotropin releasing factor systems in rat brain. *Physiol Behav.* 70(3-4):359-66.
- Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas SC. (1998). Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *J Clin Invest.* 102(2):274-82.
- Weinstein RS, Manolagas SC. (2000). Apoptosis and osteoporosis. *Am J Med.* 108(2):153-64.
- Weinstock M. (2005). The potential influence of maternal stress hormones on development and mental health of the offspring. *Brain Behav Immun.* 19(4):296-308.
- Weinstock, M. (2001). Alterations induced by gestational stress in brain morphology and behaviour of the offspring. *Prog. Neurobiol.* 65, 427–451.
- Weinstock, M., Poltyrev, T., Schorer-Apelbaum, D., Men, D., McCarty, R.( 1998). Effect of prenatal stress on plasma corticosterone and catecholamines in response to footshock in rats. *Physiol. Behav.* 64, 439–444.
- Welberg, L.A., Seckl, J.R. (2001). Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of the brain. *J. Neuroendocrinol.* 13, 113–128.
- Wise, G.E., Fan, W. (1989). Changes in the tartrate-resistant acid phosphatase cell population in dental follicles and bony crypts of rat molars during tooth eruption. *J. Dent. Res.* 68, 150–156.
- Wise GE, Lin F (1994). Regulation and localization of colony-stimulating factor-1 mRNA in cultured rat dental follicle cells. *Arch Oral Biol* 39:621-627.
- Wise GE, Lin F (1995). The molecular biology of initiation of tooth eruption. *J Dent Res* 74:303-306.
- Wise GE (1998). In vivo effect of interleukin-1a on colony-stimulating factor-1 gene expression in the dental follicle of the rat molar. *Arch Oral Biol* 43:163-165.

- Wise, G.E., Huang, H., Que, B.G. (1999). Gene expression of potential tooth eruption molecules in the dental follicle of the mouse. *Eur. J. Oral Sci.* 107, 482–486.
- Wise, G.E., Frazier-Bowers, S., D'Souza, R.N. (2002). Cellular, molecular, and genetic determinants of tooth eruption. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 13, 323–334.
- Wise GE, King GJ. (2008). Mechanisms of tooth eruption and orthodontic tooth movement. *J Dent Res.* 87(5):414-34.
- Witkop CJ Jr. Hereditary defects of dentin. *Dent Clin North Am.* 1975 Jan;19(1):25-45.
- Wong BR, Josien R, Lee SY, Sauter B, Li HL, Steinman RM, Choi Y. (1997). TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. *J Exp Med* 186:2075-2080.
- Wong MM, Rao LG, Ly H, Hamilton L, Tong J, Sturtridge W, McBroom R, Aubin JE, Murray TM. (1990). Long-term effects of physiologic concentrations of dexamethasone on human bone-derived cells. *J Bone Miner Res.* 5(8):803-13.
- Xing L, Venegas AM, Chen A, Garrett-Beal L, Boyce BF, Varmus HE, et al. (2001). Genetic evidence for a role for Src family kinases in TNF family receptor signaling and cell survival. *Genes Dev* 15:241–253.
- Yagi M, Miyamoto T, Sawatani Y, Iwamoto K, Hosogane N, Fujita N, et al. (2005). DC-STAMP is essential for cell-cell fusion in osteoclasts and foreign body giant cells. *J Exp Med* 202:345–351.
- Yao, S., Ring, S., Henk, W.G., Wise, G.E. (2004). In vivo expression of RANKL in the rat dental follicle as determined by laser capture microdissection. *Arch. Oral Biol.* 49, 451–456.
- Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Goto M, Mochizuki SI, Tsuda E, Morinaga T, Udagawa N, Takahashi N, Suda T, Higashio K. (1999). A novel molecular mechanism modulating osteoclast differentiation and function. *Bone.* 25(1):109-13.
- Yasuda H. (2013). RANKL, a necessary chance for clinical application to osteoporosis and cancer-related bone diseases. *World J Orthop.* 4(4):207-217.
- Yellon SM, Longo L (1988) Effect of maternal pinealectomy and reverse photoperiod on the circadian melatonin rhythm in the sheep fetus during the last trimester of pregnancy *Biol Reprod* 39: 1093-1099.
- Yoshimura T, Takeya M, Takahashi K (1991). Molecular cloning of rat monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and its expression in rat spleen cells and tumor cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 174:504-509.

Zagron G, Weinstock M. Maternal adrenal hormone secretion mediates behavioural alterations induced by prenatal stress in male and female rats. *Behav Brain Res.* 2006 Dec 15;175(2):323-8.

Zarkovic M, Stefanova E, Ciric J, Penezic Z, Kostic V, Sumarac- Dumanovic M et al (2003) Prolonged psychological stress .suppresses cortisol secretion. *Clin Endocrinol* 59:811–816.

Zhang C, Dou C, Xu J, Dong S. (2014). DC-STAMP, the Key Fusion-Mediating Molecule in Osteoclastogenesis. *J Cell Physiol.* doi: 10.1002/jcp.24553. [Epub ahead of print]

Este trabajo fue realizado en los siguientes laboratorios:

- Cátedra de Biología y Bioquímica Molecular. Facultad de Ciencias Médicas – UNC
- Cátedra de Histología y Embriología. Facultad de Odontología – UBA
- Area de Biología Oral. Facultad de Odontología - UNC

Contó con la colaboración de:

Histotecnólogas Mariela Lacave e Ivana Sánchez en el procesamiento histológico de las muestras.

Bioterista Daniel Vagué en el mantenimiento y cuidado de los animales de laboratorio.

Ingeniero Luis Chroare en el procesamiento de imágenes histológicas.

Odontólogo Germán Flesia en la toma y procesamiento de imágenes radiológicas

Se realizó con el apoyo de los siguientes subsidios:

- CONICET 1885/07 “Estudio de la Influencia del ambiente prenatal sobre el desarrollo fetal/neonatal del reloj circadiano”.
- SECyT 05/J078 “Desarrollo de los ritmos circadianos en mamíferos: influencia del estrés prenatal. Aspectos conductuales, bioquímicos y moleculares”.
- UBACyT 20020120100190BA “Interacción entre células óseas y células hematopoyéticas en el proceso de regulación de la remodelación ósea”.
- UBACyT 20020090100210BA “Estudio del comportamiento de células óseas y células de la médula ósea en los procesos de modelación y remodelación óseas en diferentes condiciones experimentales”.



**TÉCNICAS DE COLORACIÓN**

• **Hematoxilina-Eosina (H&E)**

El procedimiento de coloración con H&E consiste básicamente de los siguientes pasos:

- Desparafinación de los cortes en xilol.
- Hidratación en baños decrecientes de alcohol, posteriormente agua corriente y por último agua destilada.
- Coloración con la solución de hematoxilina (Hematoxilina de Harris).
- Lavado en agua corriente.
- Coloración con una solución alcohólica de eosina.
- Deshidratación en baños crecientes de alcohol etílico.
- Aclaramiento empleando xilol.
- En estas condiciones los tejidos están preparados para realizar el montaje.

• **Técnica para la detección de la Fosfatasa Ácida Tartrato Resistente (TRAP)**

Los cortes histológicos, se desparafinan en xilol y luego se hidratan en Acetonas decrecientes y agua destilada. Posteriormente se realiza la marcación de TRAP. Para ello se preparan las siguientes soluciones:

**Solución 1:** 12 mg de Naphthol As-Bi phosphate (SIGMA).

750 microlitros de N' N dimetil Formamide (ICN).

**Solución 2:** 75 ml de TRIS a pH 5

24.2 gr de Buffer – Tris (tris hidroximetil aminometano).

19.6 gr de Anhídrido maleico.

1000 ml de agua destilada

**Solución 3:** Se mezclan la solución 1 y 2 . A ésta se le agrega luego:

105 mg Fast Red Violet LB (SIGMA) y se lleva a estufa de 37° C de 2 a 3 minutos.

**Solución 4 :** Al retirar la solución 3 de la estufa se le agregan 3,75 gr de Ácido Tartárico (SIGMA). Luego se filtra la solución y se incuban los preparados en la misma durante 1 hora.

Transcurrido ese tiempo se lava en agua corriente y se deja virar por 1 hora más. Finalmente se contrastan con Hematoxilina de Harris y se deshidratan en Acetona 50°- 100°- Xilol. Se montan con bálsamo de Canadá Natural.

Esta técnica de coloración permite visualizar los sitios con presencia de la enzima TRAP de color magenta y los núcleos de color violáceos.

**Publicación de resultados de la presente Tesis Doctoral**

**Artículos publicados en Revistas Científicas con referato:**

- Impairment of rat tooth eruption in pups born to mothers exposed to chronic stress during pregnancy. P.A. Fontanetti, R.C. De Lucca, P.M. Mandalunis, N.T. Vermouth. Archives of Oral Biology - November 2013 (Vol. 58, Issue 11, Pages 1643-1651, DOI: 10.1016/j.archoralbio.2013.08.003).
- Prenatal exposure to continuous constant light alters tibia endochondral ossification in rat pups. Fontanetti PA, Nervegna M, Vermouth NT, Mandalunis PM. Enviado a Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions (JMNI).

**Artículo en preparación:**

- Effect of two models of prenatal stress on mandibular growth in adult pups. P.A. Fontanetti, G.Flesia, N.T. Vermouth, P.M. Mandalunis, En preparación para ser enviado a Acta Odontológica Latinoamericana (AOL).
- Maternal melatonin ameliorates the impairment of tooth eruption in pups prenatally exposed to chronic constant light. P.A. Fontanetti, P.M. Mandalunis, N.T. Vermouth.

**Resúmenes publicados en Revistas Científicas:**

- Fontanetti PA, Vermouth NT. "Influence of prenatal chronic constant light or varied stress on the osteoclasts involved in tooth eruption process". J. Dental Research, Special Issue, pISSN N° 0022-0345, eISSN 1544-0591. URL: [http://iadr.confex.com/iadr/arg07/preliminaryprogram/abstract\\_114413.htm](http://iadr.confex.com/iadr/arg07/preliminaryprogram/abstract_114413.htm) 2007.
- Fontanetti PA, Choi Ed, Mandalunis PM, Vermouth NT. "Maternal melatonin ameliorates the decrease of osteoclasts involved in tooth eruption process of rats prenatally stressed". Bone 41 (2007) S1-S13. **ISSN:** 8756-3282 .
- Fontanetti PA, Mandalunis PM, Vermouth NT. "Respuesta del tejido óseo asociado a la erupción del primer molar en crías de rata nacidas de madres sometidas a luz

constante durante la preñez”. Actualizaciones en Osteología. Vol.7, No2.  
Mayo/Agosto 2011. ISSN 1669-8975 (Print) ISSN 1669-8983 (Online).

- Fontanetti PA, Mandalunis PM, Vermouth NT. “Implications of Prenatal Stress on Tooth Eruption and Tibia Development”. Journal of Dental Research. Setiembre 2011 ISSN 1544-0591. URL:  
<http://iadr.confex.com/iadr/chile11/webprogrampreliminary/Paper154295.html>. 2011
- Fontanetti PA, DeLucca R, Mandalunis PM, Vermouth NT. “Tooth Eruption and Endochondral Ossification in Prenatally Stressed Pups”. Journal of Dental Research. Octubre 2011 ISSN 1544-0591. URL:  
<http://iadr.confex.com/iadr/2012rio/webprogram/Paper160453.html>
- Fontanetti PA, DeLucca R, Mandalunis PM, Vermouth NT. “Correlación entre la actividad osteoclástica y la erupción dentaria en crías prenatalmente estresadas”. Libro de resúmenes III Jornadas de Investigación Científica en Odontología. Editorial Medios Audiovisuales de la Facultad de Odontología. ISBN: 978-950-33-0934-6. Noviembre 2011.
- Fontanetti PA, DeLucca R, Mandalunis PM, Vermouth NT. “Tooth Eruption and Endochondral Ossification in Prenatally Stressed Pups”. Journal of Dental Research. June 2012 ISSN 1544-0591. URL:  
<http://iadr.confex.com/iadr/2012rio/webprogram/Paper160453.html> . Junio 2012

#### **Presentaciones en Congresos Nacionales:**

- Fontanetti, PA; Choi, E; Vermouth, NT. “La Melatonina Materna restituye el descenso de los osteoclastos asociados a la erupción dentaria en ratas estresadas prenatalmente”. XXIV Jornadas de la Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. 15 al 18 de Agosto de 2007.
- Fontanetti PA, Vermouth NT. “Influencia de la luz constante o del estrés crónico variado prenatal sobre los osteoclastos involucrados en el proceso de erupción dentaria”. XL Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Odontológica. Mar del Plata. Argentina. 18 al 20 de Octubre 2007.

- Fontanetti PA, Vermouth NT. "Influencia del estrés prenatal sobre los osteoclastos asociados a la erupción dentaria". I Jornadas de Investigación Científica de la Facultad de Odontología, UNC. 23 y 24 de Noviembre 2007.
- Fontanetti PA, Mandalunis PM, Vermouth NT. "Respuesta del tejido óseo asociado a la erupción del primer molar en crías de rata nacidas de madres sometidas a luz constante durante la preñez". XXVIII Reunión Anual de la Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral. Ciudad de Buenos Aires, Argentina. 25 al 27 de Agosto de 2011..
- Fontanetti PA, DeLucca R, Mandalunis PM, Vermouth NT. "Erupción Dentaria y Osificación Endocondral en crías de 15 días prenatalmente estresadas". XLIV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Odontológica. San Javier, Tucumán. 27 al 29 de Octubre de 2011.
- Fontanetti PA, DeLucca R, Mandalunis PM, Vermouth NT. "Correlación entre la actividad osteoclástica y la erupción dentaria en crías prenatalmente estresadas". III Jornadas de Investigación Científica en Odontología. Facultad de Odontología. UNC. Córdoba, Argentina. 17 al 19 de Noviembre de 2011.
- Fontanetti PA, Mandalunis PM, Vermouth NT. "Prenatal Adverse Environment Suffered by Mothers during Pregnancy may Impair Several Functions in their Pups". Workshop "Fronteras en Biociencias" organizado por el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de la Nación Argentina y el Instituto Max Planck de Alemania. Polo Científico Buenos Aires, Argentina. 22, 23, 24 y 25 de Abril de 2012.
- Fontanetti PA, Flesia G, Mandalunis PM, Vermouth NT. "Comparación de dos modelos de estrés prenatal sobre el crecimiento mandibular de rata". XLVI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Odontológica. Mar del Plata, Buenos Aires. 7 al 9 de Noviembre de 2013.

**Presentaciones en Congresos Internacionales:**

- Fontanetti PA, Mandalunis PM, Vermouth NT. "Implications of Prenatal Stress on Tooth Eruption and Tibia Development". IV Latin American Reunion – International Association of Dental Research. Santiago, Chile. 3 y 4 de octubre de 2011.

- Fontanetti PA, DeLuca R, Mandalunis PM, Vermouth NT. "Tooth Eruption and Endochondral Ossification in Prenatally Stressed Pups". 90th IADR/LAR General Session & Exhibition. Iguacu Falls, Brazil. June 20-23, 2012.

**Premios y Becas:**

- Premio IADR Divisional Travel Award para investigadores jóvenes "Edward Hatton" categoría Junior, por el trabajo "Tooth Eruption and Endochondral Ossification in 15 days old Prenatally Stressed Pups". Autores: Fontanetti PA, DeLuca R, Mandalunis PM, Vermouth NT. XLIV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Odontológica. San Javier, Tucumán. 27 al 29 de Octubre de 2011.
- Beca de Doctorado tipo I y tipo II otorgada por la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba. Resolución Rectoral N°: 2072/2010. Directora: Dra. Patricia Mandalunis (UBA). Codirectora: Nelia Vermouth (UNC). Desde el 1 de Agosto de 2010 hasta la actualidad.

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

SciVerse ScienceDirect

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/aob>

# Impairment of rat tooth eruption in pups born to mothers exposed to chronic stress during pregnancy

P.A. Fontanetti<sup>a,b</sup>, R.C. De Lucca<sup>c</sup>, P.M. Mandalunis<sup>c</sup>, N.T. Vermouth<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup>Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

<sup>b</sup>Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

<sup>c</sup>Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Buenos Aires, Argentina

## ARTICLE INFO

### Article history:

Accepted 2 August 2013

### Keywords:

Prenatal stress  
Constant light  
Bone histomorphometry  
Tooth eruption  
Bone volume  
Osteoclasts

## ABSTRACT

**Objective:** Tooth eruption is a multifactorial process in which bone tissue plays a prevailing role. In this study we evaluated the bone overlying the developing tooth germ and the degree of tooth eruption of the first mandibular molar in pups born to mothers subjected to constant light during pregnancy.

**Design:** Pregnant rats were divided into two groups: mothers chronically exposed to a 12:12 light/light cycle (LL) from day 10 to 20 of pregnancy and controls (C) maintained on a 12:12 h light/dark cycle. Pups from each group were euthanized at the age 3 or 15 days.

Buccolingually oriented sections of mandibles were stained with haematoxylin–eosin or for histochemical detection of tartrate resistant acid phosphatase (TRAP). The histomorphometric parameters evaluated were bone volume, number of osteoclasts, TRAP+ bone surface, number of TRAP+ and TRAP– osteoclasts per mm<sup>2</sup> and degree of tooth eruption (mm).

**Results:** It was found an increase in bone volume (LL: 58.14 ± 4.24 vs. C: 32.31 ± 2.16;  $p < 0.01$ ) and a decrease in the number of osteoclasts (LL: 3.5 ± 0.65 vs. C: 8.03 ± 1.31;  $p < 0.01$ ) and TRAP+ cells (LL: 0.84 ± 0.53 vs. C: 8.59 ± 1.26;  $p < 0.01$ ) in 3-day-old pups born to LL-exposed mothers. These observations are consistent with the decrease in the degree of tooth eruption observed in 15-day-old experimental pups (LL: −0.605 ± 0.05 vs. C: −0.342 ± 0.02;  $p < 0.0001$ ).

**Conclusion:** Our results suggest that chronic constant light applied as a pre-natal stressor impairs the resorptive capacity of osteoclasts involved in the formation of the eruption pathway and consequently the degree of tooth eruption.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Prenatal development in mammals appears to proceed largely under instruction and direction from the individual's genes. However, it has been extensively demonstrated that during

the course of prenatal development, it is also affected by influences external to the mother and associated to different susceptibility of the foetus to “prenatal programming” as a result of its genetic makeup.<sup>1</sup> A large body of human epidemiological data as well as experimental studies suggest that external factors operating in prenatal life strongly affect

\* Corresponding author at: Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Pabellón Argentina, 2<sup>do</sup>. Piso, Haya de la Torre s/n, Ciudad Universitaria, X5000 Córdoba, Argentina. Tel.: +54 3514333024.

E-mail addresses: [nvermo@odo.unc.edu.ar](mailto:nvermo@odo.unc.edu.ar), [nelia124@hotmail.com](mailto:nelia124@hotmail.com) (N.T. Vermouth).

0003-9969/\$ – see front matter © 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2013.08.003>

developmental processes throughout life.<sup>2–4</sup> These environmental factors can influence the ontogenesis of organisms and could be crucial for establishing postnatal plasticity.<sup>5,6</sup> In line with this, it is known that mammals are synchronized with the environmental photoperiod, which entrains the main circadian clock located in the hypothalamic suprachiasmatic nuclei.<sup>7</sup> The latter nuclei integrate environmental signals, generating circadian rhythms synchronized to daily variations.<sup>8</sup> This complex process integrates and interrelates three physiological systems (nervous, immune, and endocrine), translating environmental information by means of neurotransmitters, cytokines and hormones.<sup>9–11</sup> This environmental information is transmitted by the mother to her foetus during early development, generating optimal maternal programming of offspring plasticity to postnatal life.<sup>12</sup>

Prenatal environment may become adverse under certain circumstances, such as poor placental function, maternal infection, or when mothers are subjected to stressing conditions. Thus, during foetal life, maternal exposure to chronic stress would seemingly act as a disruptive factor for optimal offspring development, and generate short- and long-term alterations in the temporal organization of neuroendocrine, biochemical, physiological, and behavioural processes.<sup>9–11</sup> In addition, prenatal stress is associated with the secretion of high concentrations of maternal glucocorticoids (GCs) by stimulation of the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis.<sup>9,13</sup> The increase in circulating maternal GCs is known to strongly influence maternal programming.<sup>11,14</sup>

Continuous constant light (LL) is used as a chronic stressor in a number of animal models.<sup>15–17</sup> This LL stressing stimulus desynchronizes the individual neurons of the principal circadian clock in adult rodents.<sup>18</sup> Besides, in rat pups, prenatal exposure to LL suppresses lactate and malate dehydrogenase enzymatic daily variations in testis and epididymis,<sup>19,20</sup> suppresses maternal plasma melatonin rhythm,<sup>21</sup> increases anxiety-like behaviour and decreases copulatory behaviour.<sup>10,22</sup>

In addition, Meek et al.<sup>23</sup> reported by means of macroscopic observation a delay in tooth eruption of 9-day-old mice pups born to stressed mothers. Tooth eruption is a multifactorial tightly regulated process which starts prenatally and is a programmed and localized event. It involves the movement of a tooth from its position inside the osseous crypt into the oral cavity, where it appears in a specific position, at an appointed time.<sup>24</sup> During the intraosseous phase of tooth eruption, at the ultrastructural level, bone resorption is carried out by mature osteoclasts in the bone overlying the developing tooth germ where the eruption pathway forms. At the same time, there is an increase in the number of osteoclasts on the alveolar bone surface, due to the fusion of mononuclear preosteoclast cells. In rats, the great influx of these cells into the dental follicle occurs on post-natal day 3, resulting in a peak of osteoclasts.<sup>25</sup> An osteoclast is a multinucleated cell that dissolves bone mineral and enzymatically degrades extracellular matrix proteins. Therefore, the maturation of osteoclasts and the regulation of resorption of the bone overlying the developing tooth are critical events that involve molecular signals synthesized by dental follicle cells.<sup>26</sup> Tooth eruption is a valuable model to study the physiology of bone remodelling given that the emergence of a tooth into the oral cavity

involves bone turnover events such as bone formation and bone resorption.

Despite the fact that prenatal adverse events have complex influences on development of rat pups, the effects of prenatal LL stress on bone modelling and remodelling are poorly known. The present study is the first to report data on the influence of constant light applied as a chronic prenatal stressor during the second half of gestation on the osteoclasts involved in the formation of the tooth eruption pathway of the first mandibular molar in 3-day-old rats, and on the degree of tooth eruption in 15-day-old rats.

---

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Three months old female Wistar rats weighing 250–300 g were used. The Animal protocol was approved by the local Bioethics Committee of School of Dentistry, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, and is in keeping with the National Institutes of Health Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals and the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (Council of Europe N° 123, Strasbourg 1985). We made all possible efforts to minimize both the suffering and the number of animals used.

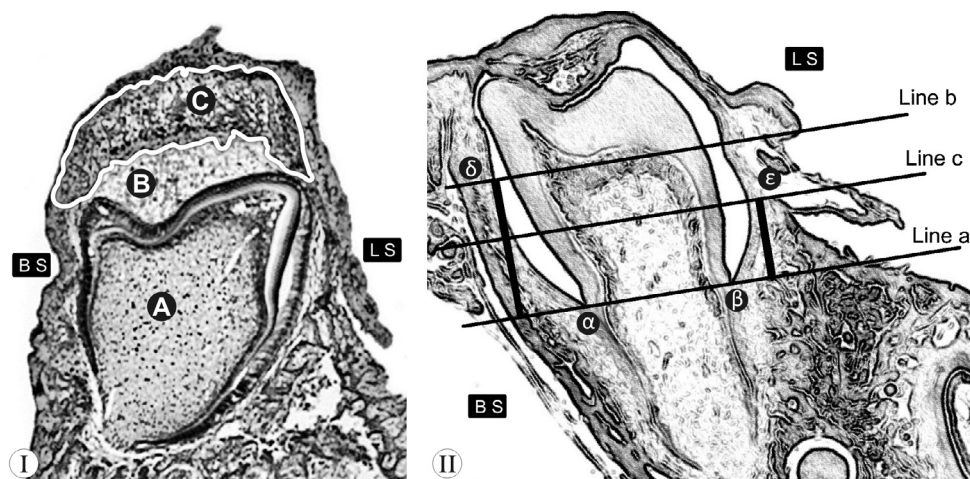
The animals were maintained on a 12:12 light/dark cycle (lights on at 07:00 a.m.) under controlled temperature ( $23 \pm 1$  °C) and were fed laboratory chow and water ad libitum. Estrous cycle was determined daily by examination of vaginal smears, and females were mated with males on the night of ovulation. The onset of pregnancy was confirmed by the presence of spermatozoa in vaginal smears on the following morning, considered day 0 of gestation.

On day 10 of gestation, 16 mothers were assigned to the following groups: Group LL, which included 8 mothers chronically exposed to a 12:12 light/light cycle (LL) of cool white light at 100 lux during 11 consecutive days (between days 10 and 20 of gestation); and Group C including 8 mothers maintained on a 12:12 light/dark cycle, which served as control (C). This constant light model was validated in previous studies performed at our laboratory demonstrating that constant light initiated on day 10 of gestation interrupts maternal foetal synchronization, which begins between days 11 and 12 of gestation.<sup>27</sup> Food ingestion of pregnant rats was measured daily during prenatal stress. After delivery, the litter was adjusted to eight pups per mother. Two or three male pups of each mother were selected so that each group (LL and C) included 12 pups. All the pups were weighed on post-natal days 3, 5, and 15 and euthanized on post-natal days 3 or 15 in order to perform histomorphometric analysis.

### 2.2. Histological and histomorphometrical analyses

After euthanasia, pup mandibles were resected, fixed in 10% phosphate-buffered saline-formaldehyde for 24 h, decalcified in EDTA (pH 7.2) for 30 days, dehydrated in acetone and xylol solutions, and embedded in paraffin at 58–60 °C for 4 h. Serial buccolingually oriented sections, approximately 7–8 µm thick,





**Fig. 1 – (I) Representative illustration of a buccolingual section of 3-day-old control pup mandible. A: first mandibular molar; B: stellate reticulum; C: Bone overlying the developing tooth germ. All histomorphometric parameters were measured in the bone overlying the developing tooth germ of the first mandibular molar of 3-day-old pups (contoured area). Total bone volume was calculated by adding cancellous bone tissue plus mesenchymal tissue found in the studied area. (II) The degree of tooth eruption of the first mandibular molar was measured on microphotographs of buccolingual sections stained with H&E. Line “a” was drawn from the lingual ( $\alpha$ ) to the buccal ( $\beta$ ) cement enamel junction. Line “b” was drawn parallel to line “a” and through the upper point of the buccal alveolar bone crest ( $\delta$ ). The distance between lines “a” and “b” was considered a measure of the degree of buccal tooth eruption (DBTE). Line “c” was drawn parallel to lines “a” and “b” and through the upper point of the lingual alveolar bone crest ( $\epsilon$ ). The distance between lines “a” and “c” was considered a measure of the degree of lingual tooth eruption (DLTE). All tooth eruption measurements were expressed as negative values. Thus, the greater the distance, the lesser the degree of tooth eruption (BS: buccal side; LS: lingual side).**

were obtained and stained with haematoxylin and eosin (H&E) or for histochemical detection of tartrate resistant acid phosphatase enzyme (TRAP).<sup>28</sup> The latter is a protein expressed by osteoclasts, preosteoclasts, and dendritic cells. Sections were photographed at  $2.5\times$  and  $4\times$ , digitalized, and histomorphometrically evaluated<sup>29</sup> using an Image Pro Plus 6.1 computer software (Media Cybernetics Inc; EE.UU., 2006). The best three sections, in terms of quality and buccolingual orientation, obtained from each animal were selected, and measurements were performed twice on each section. The obtained values were averaged to calculate the mean for each animal. A total of twelve pups were evaluated in each group (LL and C).

The following histomorphometric determinations were performed on microphotographs of H&E stained sections of the bone overlying the developing tooth germ of the first mandibular molar of 3-day-old pups (Fig. 1.I).

1. BV/TV (%): bone volume was expressed as cancellous bone to total volume ratio. Total volume was calculated by adding cancellous bone tissue plus mesenchymal tissue.
2. N.Oc/mm<sup>2</sup>: number of osteoclasts with 2 or more nuclei per mm<sup>2</sup>.
3. N.Nc/Oc: number of nuclei in each osteoclast located in the studied area.

The following histomorphometric parameters were determined on TRAP stained sections of the studied area:

1. TRAP+/BS (%): TRAP+ bone surface/total bone surface.
2. N.Oc TRAP+/mm<sup>2</sup>: number of TRAP+ osteoclasts/mm<sup>2</sup>.
3. N.Oc TRAP–/mm<sup>2</sup>: number of TRAP– osteoclasts/mm<sup>2</sup>.

To allow for comparison, the sections were obtained from the same region of the bone overlying the developing tooth germ of the first mandibular molar. Using a stereoscopic microscope, the embedded specimens were sectioned upon visualization of the following anatomical structures: triangular shaped first molar, open apex and oval shaped continuously growing tooth.

### 2.3. Degree of tooth eruption

The degree of tooth eruption (DTE) of the first mandibular molar on the buccal and lingual sides was measured on microphotographs of buccolingually oriented sections stained with H&E. We employed a modified histomorphometric method described by Villarino et al.<sup>36</sup> Buccal and lingual cement enamel junctions were used as reference points for the lines drawn to determine tooth eruption as described below (Fig. 1.II):

Line “a” was drawn from the lingual ( $\alpha$ ) to the buccal ( $\beta$ ) cement enamel junction.

Line “b” was drawn parallel to line “a” and through the upper point of the buccal alveolar bone crest ( $\delta$ ).

Line “c” was drawn parallel to lines “a” and “b” and through the upper point of the lingual alveolar bone crest ( $\epsilon$ ).

The distance between lines “a” and “b” was considered a measure of the degree of buccal tooth eruption (DBTE). The distance between lines “a” and “c” was considered a measure of the degree of lingual tooth eruption (DLTE). All tooth eruption measurements were expressed as negative values. Thus, the greater the distance, the lesser the degree of tooth eruption.

**Table 1 – Effects of maternal exposure to constant light on pup body weight at the age of 3, 5 and 15 days. Results are given as mean  $\pm$  SEM. Number of animals in parentheses.**

Body weight (g)	Age 3 days	Age 5 days	Age 15 days
Control	8.92 $\pm$ 0.11 (16)	15.73 $\pm$ 0.46 (14)	30.66 $\pm$ 0.32 (12)
LL	7.55 $\pm$ 0.12 (16)*	12.71 $\pm$ 0.49 (14)*	25.53 $\pm$ 0.47 (12)*

\* Significantly different from control:  $p < 0.01$ .

The coefficient of variation was calculated to determine intra-examiner error, and was found to be less than 5% in all measured parameters. Student's *t*-test for independent samples was used for statistical analysis. A *p*-value of less than 0.05 was considered statistically significant. All data are presented as mean  $\pm$  standard error.

### 3. Results

Pregnant mothers exposed to constant light seemed to have more anxiety-like behaviour compared to control dams. No differences in the number of foetuses or in the signs of foetal resorption were observed between groups. Food intake increased in both groups between days 10 and 21; no significant differences in food intake were observed between groups at any time.

Body weight of pups born to control dams was 17% higher than that of 3, 5, and 15-day-old pups; the difference was statistically significant (Table 1).

#### 3.1. Histomorphometric analysis

According to the results of the histomorphometric analysis of bone overlying the developing tooth germ of the first mandibular molar of 3-day-old pups, bone volume (BV/TV%) was  $58.14 \pm 4.24$  in the LL group and  $32.31 \pm 2.16$  in the control group ( $p < 0.01$ ), indicating an approximate 80% increase in prenatally stressed pups (Fig. 2A–C). In agreement with the above finding, a significant decrease in the number of

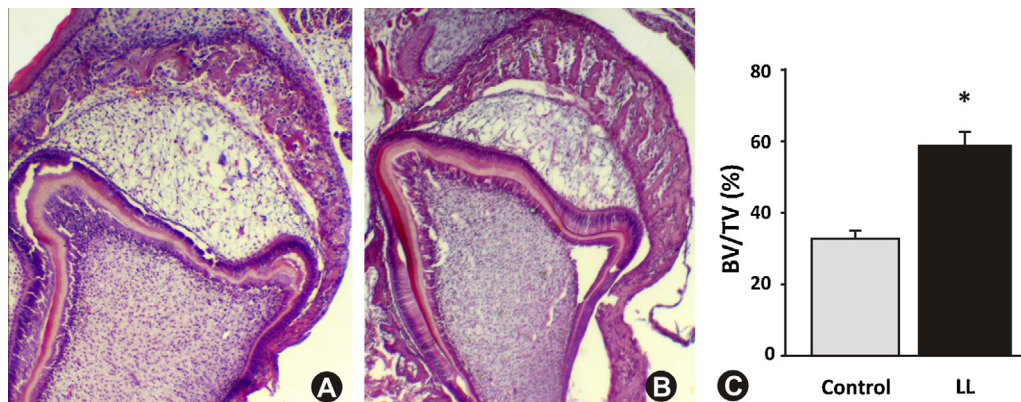
osteoclasts (N.Oc/mm<sup>2</sup>) (LL:  $3.5 \pm 0.65$  vs. C:  $8.03 \pm 1.31$ ;  $p < 0.01$ ) (Fig. 3A–C) and in the number of nuclei per osteoclast (N.Nc/Oc) (LL:  $2.31 \pm 0.19$  vs. C:  $3.42 \pm 0.17$ ;  $p < 0.01$ ) was observed in pups born to LL dams (Fig. 3D).

A decrease in TRAP+ bone surface (%TRAP+/BS) was observed in sections corresponding to experimental 3-day-old pups as compared to their age-matched controls (LL:  $8.89 \pm 1.75$  vs. C:  $52.63 \pm 3.76$ ;  $p < 0.01$ ) (Fig. 4A–C). Likewise, a significant decrease in the number of TRAP+ osteoclasts (N.Oc TRAP+/mm<sup>2</sup>) was observed in experimental pups (LL:  $0.84 \pm 0.53$  vs. C:  $8.59 \pm 1.26$ ;  $p < 0.01$ ) (Fig. 4A, B and D). In addition, pups born to stressed dams showed a significant increase in the number of TRAP– osteoclasts (N.Oc TRAP–/mm<sup>2</sup>) compared to controls (LL:  $2.8 \pm 0.66$  vs. C:  $0.76 \pm 0.36$ ;  $p < 0.01$ ) (Fig. 4A, B and E).

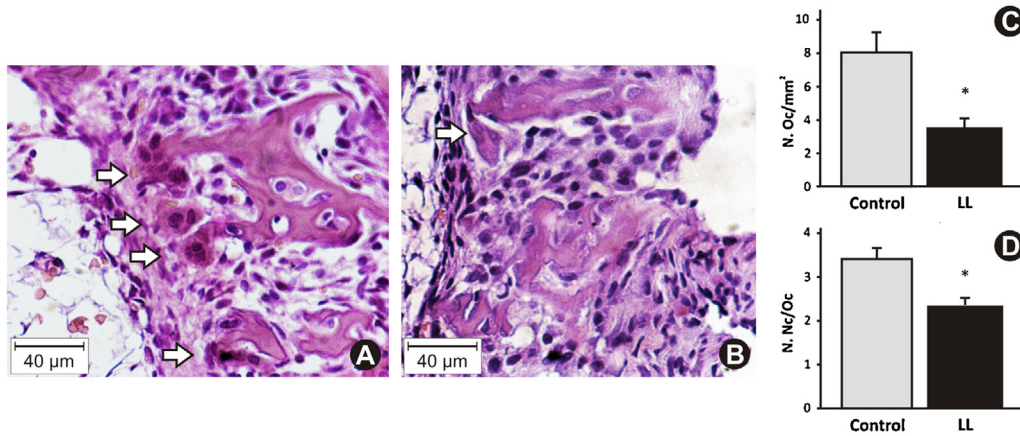
Although a negative correlation in the number of TRAP+ and TRAP– osteoclasts was observed between the two groups of pups, the total number of osteoclasts, i.e. TRAP+ plus TRAP– osteoclasts, was still significantly lower in prenatally stressed pups. The latter result is consistent with the data obtained from H&E stained sections.

#### 3.2. Degree of tooth eruption

H&E stained sections corresponding to 15-day-old pups born to stressed mothers showed significantly decreased DTE on the buccal (LL:  $-0.972 \pm 0.04$  vs. C:  $-0.726 \pm 0.04$ ;  $p < 0.0001$ ) and lingual (LL:  $-0.605 \pm 0.05$  mm vs. C:  $-0.342 \pm 0.02$  mm;  $p < 0.0001$ ) sides (Fig. 5A–C). Thus, both values showed a marked delay in tooth eruption in experimental pups.



**Fig. 2 – Microphotographs showing a marked increase in the volume of bone overlying the developing tooth germ of the first mandibular molar in 3-day-old prenatally stressed pup (B) compared to controls (A). Original magnification: 4 $\times$ . The bar chart (C) shows bone volume; empty bars correspond to control pups and solid bars to pups born to LL mothers ( $n = 12$  pups per group; \* $p < 0.01$ ).**

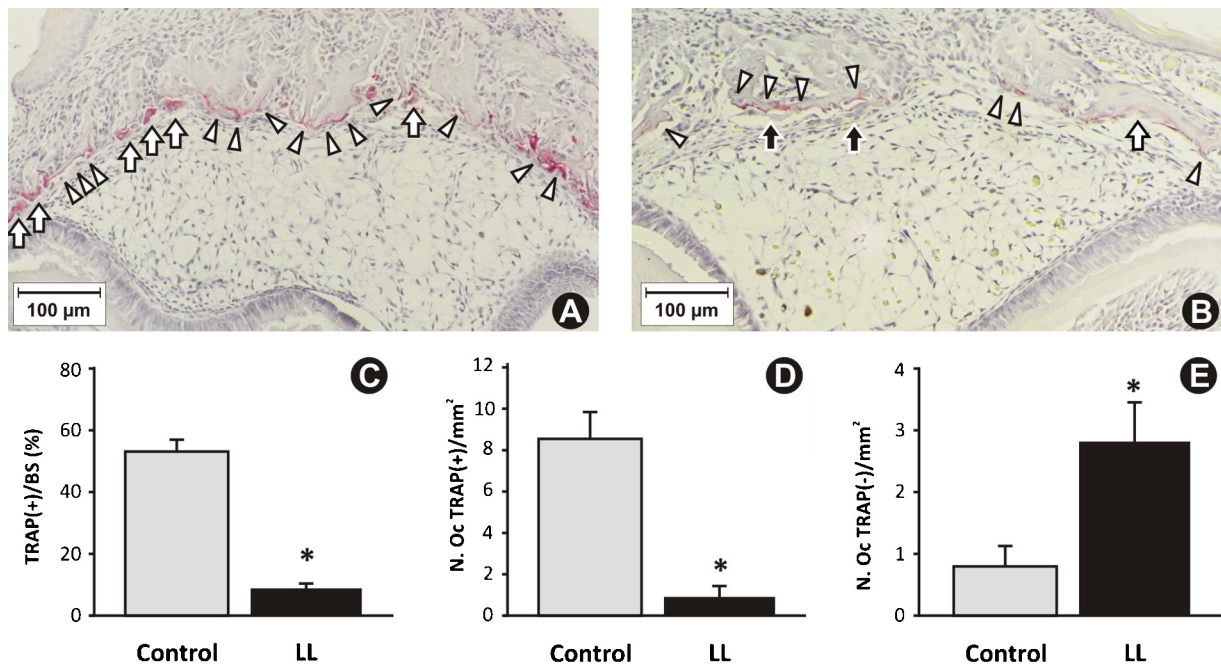


**Fig. 3 – Microphotograph of a section corresponding to a control (A) and to a prenatally stressed pup (B). Original magnification: 40×. Note the significant decrease in the number of osteoclasts (C) and in the number of nuclei per osteoclast (D) in pups born to LL mothers compared to the controls (A); \* $p < 0.01$  (empty bars correspond to Controls and solid bars to pups born to LL mothers;  $n = 12$  per group).**

#### 4. Discussion

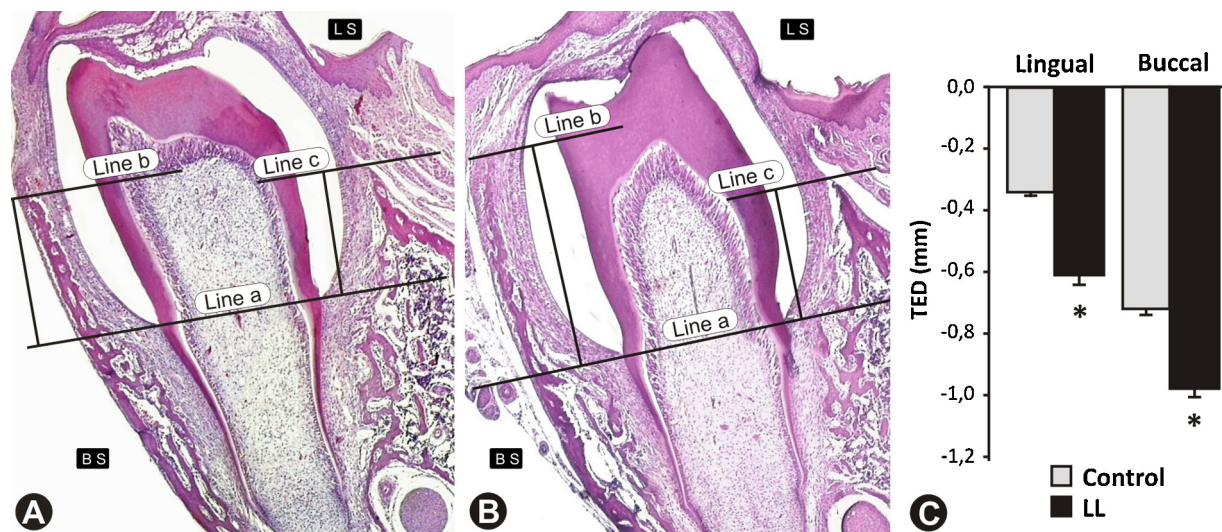
To the best of our knowledge, this is the first “in vivo” study aiming to explore the association between adverse prenatal conditions and certain aspects of bone modelling events involved in the tooth eruption process in rats. The results of the present study show that exposure of pregnant rats to

constant light from day 10 to day 20 of gestation increased bone volume in the bone overlying the developing tooth germ of the first mandibular molar of their pups. At the same time, osteoclast recruitment and the number of nuclei per osteoclast were significantly lower in 3-day-old pups born to stressed mothers. The latter was associated with a significant decrease in the degree of tooth eruption in 15-day-old experimental pups. Our findings suggest a decrease in bone



**Fig. 4 – Representative microphotograph of a TRAP stained section of bone overlying the developing tooth germ of the first mandibular molar of a control (A) and a prenatally stressed (B) pup. Original magnification: 10×. Arrowheads: TRAP+ bone surface; white arrows: TRAP+ osteoclasts; black arrows: TRAP– osteoclasts. A substantial decrease in TRAP+ bone surface (C) and a significantly lower number of TRAP+ osteoclasts (D) was observed in pups born to LL mothers compared to controls, \* $p < 0.01$ . At the same time the number of TRAP– osteoclasts (E) was significantly higher in pups born to LL mothers; \* $p < 0.01$  ( $n = 12$  per group; empty bars: controls; solid bars: pups born to LL mothers).**





**Fig. 5** – Representative microphotograph of an H&E stained section of a 15-day-old pup born to LL mother (B) and a control pup (A). Original magnification: 4 $\times$ . The distance between lines “a” and “b” and between lines “a” and “c” was considered a measure of the degree of buccal and lingual tooth eruption respectively. The degree of tooth eruption on both the buccal and lingual sides (C) was significantly lower in pups born to LL mothers compared to controls; \* $p < 0.0001$  (empty bars: controls; solid bars: pups born to LL mothers;  $n = 12$  per group; BS: buccal side, LS: lingual side).

resorption, which is a crucial event in the formation of the eruption pathway through the bone overlying the developing tooth germ of the first mandibular molar.

It is known that the molecular events that promote the resorption process are closely regulated and involve many systemic and local factors, including growth factors, hormones, transcription factors, enzymes and transporters.<sup>30</sup> Among the molecular signals synthesized by the dental follicle, expression of both chemoattractant molecules Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) and Colony Stimulating Factor-1 (CSF-1) peaks in normal rats at the age of 3 days. This peak is consistent with the burst of osteoclastogenesis observed in the dental follicle at that stage.<sup>26</sup> Osteoclastogenesis is also promoted by the receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL), that binds to the receptor activator of nuclear factor-kappa B (RANK) present in mononuclear pre-osteoclasts.<sup>31</sup> RANK-RANKL binding not only activates a variety of downstream signalling pathways required for osteoclast development, but also cross-talks with other pathways and fine-tunes bone homeostasis both in normal physiology and disease. These complex signals for osteoclast maturation are crucial to the formation of the eruption pathway.<sup>24</sup> In this work, the increase in bone volume found in 3-day-old pups born to stressed mothers suggests an inhibitory effect of exposure to constant light on pup osteoclastogenesis and, consequently, on the bone resorption process (Fig. 2).

The number of osteoclasts on sections stained for detection of TRAP was consistent with the number of osteoclasts found on H&E stained sections (Figs. 3 and 4). TRAP is synthesized as latent proenzyme and activated by proteolytic cleavage; it is released into Howship’s lacunae during resorption and it is expressed by osteoclasts, macrophages, and dendritic cells.<sup>32</sup> According to the literature, the number of TRAP positive cells in the dental follicle of normal rats peaks on postnatal day 3 and then decreases steadily until post-natal day 16.<sup>25</sup> In the

present study, the lower number of TRAP+ osteoclasts found in 3-day-old pups born to stressed mothers is directly associated with a significant decrease in TRAP+ bone surface in the bone overlying the developing tooth germ of the first mandibular molar. A significant increase in TRAP- osteoclasts was also observed (Fig. 4). It is not easy to explain why the number of TRAP- osteoclasts increased in the pups born to LL mothers. Even though TRAP enzyme is an indicator of osteoclast phenotype, it could be assumed that osteoclast activity may be decreased in those cells that are TRAP negative. Of particular interest is that TRAP activity is low in cultures of dendritic cells when these are immature, but it increases 5-fold on cell maturation.<sup>33</sup> In addition, studies in mice lacking TRAP as a result of targeted gene disruption showed decreased bone modelling, abundant TRAP- osteoclasts, and increased mineralization in long bones of older animals, reflecting mild osteopetrosis caused by reduced osteoclast activity.<sup>32</sup> In agreement with Hayman’s findings, our results would seem to indicate that osteoclastogenesis is partially inhibited in pups born to LL exposed mothers. It could be posited that deregulation of osteoclastogenesis may lead to a high number of non-functioning osteoclasts, thus resulting in a decrease in bone resorption. The relationship between osteoclasts and tooth eruption was demonstrated in rat models of osteopetrosis.<sup>34</sup> In this genetic disease, osteoclast differentiation and maturation is affected by a dysplastic bone disorder characterized by a general increase in bone mass. Consequently, the lack of osteoclast formation generates a delay in, or complete failure of, the tooth eruption process.<sup>24</sup> Moreover, it has been shown that bisphosphonate treatment inhibits osteoclast activity and also significantly delays tooth eruption.<sup>35</sup> In addition, it is well documented that the process of tooth eruption is delayed or inhibited in other pathologies, such as diabetes,<sup>36</sup> or in intoxications. In previous studies performed at our laboratory, intoxication with chromium<sup>37</sup> or

uranium<sup>38</sup> was found to delay tooth eruption in rats. The results of the present study showed a 1.55-fold decrease in the DTE of the first lower molar in 15-day-old pups born to mothers exposed to constant light (LL) compared to control pups (Fig. 5).

One of the body's responses to stress is the secretion of high concentrations of GCs by stimulation of the HPA axis.<sup>39</sup> In stressed pregnant rodents, there is an elevated concentration of corticosterone, which crosses the placenta into the foetal circulation. In rats, the presence of placental enzyme 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (11 $\beta$ -HSD2) acts as "barrier" to GCs within the maternal circulation. This enzyme catalyzes the conversion of corticosterone into inert 11-keto forms, regulating the serum GCs concentration that reaches the foetus and protecting it from relatively high levels of maternal corticosterone.<sup>40</sup> Under stressful conditions, over stimulation of the HPA axis could lead to deficient enzyme activity<sup>41</sup> and may underlie deleterious short- and long-term effects, including intrauterine growth retardation and reduced birth weight<sup>9,14</sup> which are strong predictors of chronic disease later in life.<sup>42</sup> The rat model of maternal stress used here indirectly proves the deleterious effect of increased corticosterone levels on foetal circulation. Our results showed significant differences in body weight between experimental and control pups. Determinations performed on postnatal days 3, 5, and 15 showed pups born to mothers exposed to constant light had significantly lower body weight as compared to control pups (Table 1).

Although it is known that GCs affect bone remodelling, their action on osteoclasts remains controversial. Whereas some authors have associated GCs to an increase in bone resorption,<sup>43,44</sup> others have found GCs to be associated with an inhibition of bone resorption, by means of a decrease in the number of osteoclasts and preosteoclasts,<sup>45</sup> the promotion of osteoclast apoptosis<sup>46</sup> or exerting an inhibitory effect on the colony stimulating factor, an essential signal during osteoclastogenesis.<sup>47</sup> The findings presented here are in line with the latter authors, who found GCs to inhibit bone resorption. Our results show a decrease in the number of mature osteoclasts and preosteoclasts, which would lead to an increase in bone volume in the bone overlying the developing tooth germ of the first mandibular molar of pups born to stressed mothers (Figs. 2 and 3).

On the other hand, it is known that chronic exposure of pregnant rats to constant light, a powerful maternal stressor, suppresses the maternal melatonin rhythm,<sup>21</sup> and disrupts maternal circadian clock programming.<sup>22,48</sup> In line with this, Otha et al.<sup>18</sup> demonstrated in rodents that chronic constant light acts as a stress stimulus, desynchronizing clock neurons but not compromising their ability to generate circadian rhythms. Cellular synchrony among clock neurons is disrupted. In addition, in a previous work we demonstrated that maternal circadian programming initiates between days 11 and 12 of gestation.<sup>27</sup> The results of the present study are in agreement with our previous findings regarding the effects of prenatal exposure to constant light initiated on day 10 of gestation on enzymatic activity, anxiety-like and sexual behaviour.<sup>22</sup> Furthermore, they support the idea that this adverse stimulus may desynchronize the maternal circadian clock during the embryonic stage and in turn, impairs the entrainment of the foetal clock. As a result, prenatal exposure

to constant light could lead to a systemic foetal pattern of disruption and might subsequently affect lower molar eruption in rat pups. Further studies should be carried out in order to elucidate the possible effects of prenatal constant light on other cells involved in the process of tooth development and eruption, such as migratory cells passing through the dental follicle connective tissue, which are thought to contribute to tooth organogenesis.<sup>49</sup>

In conclusion, the present study suggests an association between prenatal exposure to constant light and a decrease in osteoclast-mediated bone resorption which is a crucial event in the formation of the eruption pathway through the bone overlying the developing tooth germ. The latter would explain the decrease in the degree of tooth eruption of the first mandibular molar observed in 15-day-old experimental pups. Our findings support the hypothesis that the synchronization of the pup circadian system function is crucial to the physiological processes of bone resorption and tooth eruption during early development. Further studies should be carried out in order to elucidate the molecular mechanisms involved in prenatal stress-associated delay in tooth eruption and the possible treatment to prevent it.

---

## Funding

CONICET PIP N° 6397, SECyT-Cba 05/J077 (Dr. Nelia T. Vermouth). UBACyT 20020090100210 (Dr. Patricia M. Mandalunis).

---

## Competing interests

The authors report no conflict of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

---

## Ethical approval

The Animal protocol was approved by the local Bioethics Committee of School of Dentistry, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, and is in keeping with the National Institutes of Health Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals.

---

## Acknowledgements

The authors acknowledge the collaboration of histology laboratory technicians Mariela Lacave and Carolina Acuña, Department of Histology and Embryology, School of Dentistry, University of Buenos Aires and technician Daniel Bagué from National University of Córdoba. N.T. Vermouth is a Career Investigator of CONICET.

---

## REFERENCES

1. Boyce WT, Ellis BJ. Biological sensitivity to context: I. An evolutionary-developmental theory of the origins and

- functions of stress reactivity. *Dev Psychopathol* 2005;17(2): 271–301.
2. Gluckman PD, Cutfield W, Hofman P, Hanson MA. The fetal, neonatal, and infant environments—the long-term consequences for disease risk. *Early Hum Dev* 2005;81(1):51–9.
  3. Weinstock M. Alterations induced by gestational stress in brain morphology and behaviour of the offspring. *Prog Neurobiol* 2001;65(5):427–51.
  4. Welberg LA, Seckl JR. Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of the brain. *J Neuroendocrinol* 2001;13(2):113–28.
  5. Pluess M, Belsky J. Prenatal programming of postnatal plasticity? *Dev Psychopathol* 2011;23(1):29–38.
  6. Selye H. Forty years of stress research: principal remaining problems and misconceptions. *Can Med Assoc J* 1976;115(1):53–6.
  7. Reppert SM. Maternal entrainment of the developing circadian system. *Ann N Y Acad Sci* 1985;453:162–9.
  8. Meijer JH, Rietveld WJ. Neurophysiology of the suprachiasmatic circadian pacemaker in rodents. *Physiol Rev* 1989;69(3):671–707.
  9. Maccari S, Darnaudey M, Morley-Fletcher S, Zuena AR, Cinque C, Van Reeth O. Prenatal stress and long-term consequences: implications of glucocorticoid hormones. *Neurosci Biobehav Rev* 2003;27(1–2):119–27.
  10. Gerardin DCC, Pereira OCM, Kempinas WG, Florio JC, Moreira EG, Bernardi MM. Sexual behavior, neuroendocrine, and neurochemical aspects in male rats exposed prenatally to stress. *Physiol Behav* 2005;84(1):97–104.
  11. Viltart O, Vanbesien-Mailliot CCA. Impact of prenatal stress on neuroendocrine programming. *ScientificWorldJournal* 2007;7:1493–537.
  12. Gluckman PD, Hanson MA, Cooper C, Thornburg KL. Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. *N Engl J Med* 2008;359(1):61–73.
  13. Kapoor A, Dunn E, Kostaki A, Andrews MH, Matthews SG. Fetal programming of hypothalamo–pituitary–adrenal function: prenatal stress and glucocorticoids. *J Physiol (Lond)* 2006;572(Pt. 1):31–44.
  14. Seckl JR. Prenatal glucocorticoids and long-term programming. *Eur J Endocrinol* 2004;151(Suppl. 3):U49–62.
  15. Vernikos-Danellis J, Winget CM, Hetherington NW. Diurnal rhythm of the pituitary–adrenocortical response to stress: effect of constant light and constant darkness. *Life Sci Space Res* 1970;8:240–6.
  16. Semenchenko GV, Anisimov VN, Yashin AI. Stressors and antistressors: how do they influence life span in HER-2/neu transgenic mice? *Exp Gerontol* 2004;39(10):1499–511.
  17. Alterman A, Mathison R, Coronel CE, Stroppa MM, Finkelberg AB, Gallara RV. Functional and proteomic analysis of submandibular saliva in rats exposed to chronic stress by immobilization or constant light. *Arch Oral Biol* 2012;57(6):663–9.
  18. Ohta H, Yamazaki S, McMahon DG. Constant light desynchronizes mammalian clock neurons. *Nat Neurosci* 2005;8(3):267–9.
  19. Ponce RH, Carriazo CS, Vermouth NT. Lactate dehydrogenase activity of rat epididymis and spermatozoa: effect of constant light. *Eur J Histochem* 2001;45(2):141–50.
  20. Vermouth NT, Carriazo CS, Gallara RV, Carpentieri AR, Bellavia SL. Maternal coordination of the daily rhythm of malate dehydrogenase activity in testes from young rats: effect of maternal sympathetic denervation of the pineal gland and administration of melatonin. *Chronobiol Int* 1995;12(1):8–18.
  21. Mendez N, Abarzua-Catalan L, Vilches N, Galdames HA, Spichiger C, Richter HG, et al. Timed maternal melatonin treatment reverses circadian disruption of the fetal adrenal clock imposed by exposure to constant light. *PLoS ONE* 2012;7(8):e42713.
  22. Cisternas CD, Compagnucci MV, Conti NR, Ponce RH, Vermouth NT. Protective effect of maternal prenatal melatonin administration on rat pups born to mothers submitted to constant light during gestation. *Braz J Med Biol Res* 2010;43(9):874–82.
  23. Meek LR, Burda KM, Paster E. Effects of prenatal stress on development in mice: maturation and learning. *Physiol Behav* 2000;71(5):543–9.
  24. Wise GE, Frazier-Bowers S, D’Souza RN. Cellular, molecular, and genetic determinants of tooth eruption. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002;13(4):323–34.
  25. Wise GE, Fan W. Changes in the tartrate-resistant acid phosphatase cell population in dental follicles and bony crypts of rat molars during tooth eruption. *J Dent Res* 1989;68(2):150–6.
  26. Wise GE, Huang H, Que BG. Gene expression of potential tooth eruption molecules in the dental follicle of the mouse. *Eur J Oral Sci* 1999;107(6):482–6.
  27. Bellavia SL, Carpentieri AR, Vermouth NT. Prenatal entrainment of rat testicular malate dehydrogenase activity circadian rhythm. *Biol Rhythm Res* 1996;27(3):302–13.
  28. Cole AA, Walters LM. Tartrate-resistant acid phosphatase in bone and cartilage following decalcification and cold-embedding in plastic. *J Histochem Cytochem* 1987;35(2): 203–6.
  29. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 1987;2(6):595–610.
  30. Hadjidakis DJ, Androulakis II. Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1092:385–96.
  31. Yao S, Ring S, Henk WG, Wise GE. In vivo expression of RANKL in the rat dental follicle as determined by laser capture microdissection. *Arch Oral Biol* 2004;49(6): 451–6.
  32. Hayman AR, Cox TM. Tartrate-resistant acid phosphatase knockout mice. *J Bone Miner Res* 2003;18(10):1905–7.
  33. Hayman AR, Bune AJ, Bradley JR, Rashbass J, Cox TM. Osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase (Acp 5): its localization to dendritic cells and diverse murine tissues. *J Histochem Cytochem* 2000;48(2):219–28.
  34. Helfrich MH. Osteoclast diseases and dental abnormalities. *Arch Oral Biol* 2005;50(2):115–22.
  35. Grier 4th RL, Wise GE. Inhibition of tooth eruption in the rat by a bisphosphonate. *J Dent Res* 1998;77(1):8–15.
  36. Villarino ME, Goya JADE, Lucca RC, Ubios AM. Alterations of tooth eruption and growth in pups suckling from diabetic dams. *Pediatr Res* 2005;58(4):695–9.
  37. De Lucca RC, Dutrey PL, Villarino ME, Ubios AM. Effect of different doses of hexavalent chromium on mandibular growth and tooth eruption in juvenile Wistar rats. *Exp Toxicol Pathol* 2009;61(4):347–52.
  38. Pujadas Bigi MM, Lemlich L, Mandalunis PM, Ubios AM. Exposure to oral uranyl nitrate delays tooth eruption and development. *Health Phys* 2003;84(2):163–9.
  39. Weinstock M, Poltyrev T, Schorer-Apelbaum D, Men D, McCarty R. Effect of prenatal stress on plasma corticosterone and catecholamines in response to footshock in rats. *Physiol Behav* 1998;64(4):439–44.
  40. Waddell BJ, Benediktsson R, Brown RW, Seckl JR. Tissue-specific messenger ribonucleic acid expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 and the glucocorticoid receptor within rat placenta suggests exquisite local control of glucocorticoid action. *Endocrinology* 1998;139(4):1517–23.

41. Mairesse J, Lesage J, Breton C, Bréant B, Hahn T, Darnaudéry M, et al. Maternal stress alters endocrine function of the feto-placental unit in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;**292**(6):E1526–33.
42. Osmond C, Barker DJ. Fetal, infant, and childhood growth are predictors of coronary heart disease, diabetes, and hypertension in adult men and women. *Environ Health Perspect* 2000;**108**(Suppl. 3):545–53.
43. Dalle Carbonare L, Bertoldo F, Valenti MT, Zenari S, Zanatta M, Sella S, et al. Histomorphometric analysis of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Micron* 2005;**36**(7–8):645–52.
44. Elvy Suhana MR, Fariyah HS, Faizah O, Nazrun AS, Norazlina M, Norliza M, et al. Effect of 11 $\beta$ -HSD1 dehydrogenase activity on bone histomorphometry of glucocorticoid-induced osteoporotic male Sprague-Dawley rats. *Singapore Med J* 2011;**52**(11):786–93.
45. Wang Y, Ohtsuka-Isoya M, Shao P, Sakamoto S, Shinoda H. Effects of methylprednisolone on bone formation and resorption in rats. *Jpn J Pharmacol* 2002;**90**(3):236–46.
46. Dempster DW, Moonga BS, Stein LS, Horbert WR, Antakly T. Glucocorticoids inhibit bone resorption by isolated rat osteoclasts by enhancing apoptosis. *J Endocrinol* 1997;**154**(3):397–406.
47. Kim H-J, Zhao H, Kitaura H, Bhattacharyya S, Brewer JA, Muglia LJ, et al. Glucocorticoids suppress bone formation via the osteoclast. *J Clin Invest* 2006;**116**(8):2152–60.
48. Bellavía SL, Carpentieri AR, Vaqué AM, Macchione AF, Vermouth NT. Pup circadian rhythm entrainment—effect of maternal ganglionectomy or pinealectomy. *Physiol Behav* 2006;**89**(3):342–9.
49. Diekwisch TGH. Pathways and fate of migratory cells during late tooth organogenesis. *Connect Tissue Res* 2002;**43**(2–3):245–56.