

ARTÍCULOS ORIGINALES / Originals

LA EXPOSICIÓN PRENATAL A FLUORURO INDUCE CAMBIOS EN LA PORCIÓN CORONAL DE LA CRIPTA ÓSEA Y ALTERA LA ERUPCIÓN DENTAL EN CRÍAS LACTANTES

Victoria Interlandi*, Pablo Fontanetti*, Andrea Delgado, Rubén Ponce, Raquel Gallará, Viviana Centeno**

Cátedra "A" de Química Biológica, Facultad de Odontología. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.

Resumen

La erupción dental es un proceso estrictamente regulado y programado espacial y temporalmente. El objetivo del trabajo fue estudiar el efecto de la exposición prenatal a fluoruro de sodio (NaF) sobre los eventos morfológicos y celulares que ocurren en el hueso supracoronal del primer molar de crías de rata durante la etapa preeruptiva. Se emplearon crías (n=6-8 por grupo) provenientes de madres que bebieron crónicamente agua con diferentes concentraciones de F⁻ en forma de NaF durante la gestación y lactancia: control y NaF (50 mg/L). En cortes histológicos de la mandíbula de crías de 3 y 10 días se analizaron parámetros de histomorfometría estática en la zona supracoronal de la canastilla ósea a la altura del primer molar inferior: volumen óseo trabecular [BV/TV (%)], número de osteoclastos por milímetro (N.Oc/mm) y las variables indirectas: número de trabéculas [Tb.N (1/mm)], espesor [Tb.Th (μm)] y separación trabecular [Tb.Sp (μm)]. En crías de 15 días se midió el grado de erupción [TED (μm)] del primer molar inferior. Los resultados se analizaron con el test "t" de Student considerando diferencias significativas a p<0,05. El análisis histomor-

fométrico demostró un incremento en el BV/TV (%) del hueso supracoronal (p<0,01) asociado con disminución del N.Oc/mm (p<0,01) en crías de 3 y 10 días expuestas prenatalmente al F⁻. El grado de erupción dental fue menor en animales expuestos prenatalmente al F⁻ en comparación con los controles (p<0,01). En conclusión, los resultados observados en la mandíbula de crías expuestas durante la etapa prenatal y posnatal temprana al F⁻ sugieren un efecto disruptivo sobre la actividad resortiva necesaria para formación del canal eruptivo.

Palabras clave: fluoruro de sodio, etapa preeruptiva, erupción dental.

Abstract

PRENATAL FLUORIDE EXPOSURE INDUCES CHANGES IN THE CORONAL PORTION OF BONY CRYPT AND ALTERS DENTAL ERUPTION IN SUCKLING RATS

Tooth eruption is a tightly regulated and spatially and temporally programmed process. The aim of this study was to examine the effect of prenatal NaF exposure on the morphological and cellular

* Los autores participaron de igual manera en la concreción del trabajo.

** E-mail: viviana.centeno@unc.edu.ar, centenovivi@yahoo.es



events that occur in the supracoronal area of bony crypt of the first rat molar during the pre-eruptive stage. Offspring from two groups of rats were used (6-8 per group): Control and 50 mg/L NaF. The treatment was performed during pregnancy and lactation. Suckling pups were euthanized at 3-, 10- and 15-days-old by cervical dislocation. Mandibles were removed and histologically processed to obtain buccolingual sections stained with H&E. In sections of first mandibular molar of 3- and 10-days-old pups, the following static histomorphometric parameters were evaluated: trabecular bone volume [BV/TV (%)] and number of osteoclasts (N.Oc/mm). Also, indirect parameters were obtained: trabecular number [Tb.N (1/mm)], trabecular thickness [Tb.Th (μ m)], and trabecular separation [Tb.Sp (μ m)]. The degree

of tooth eruption [TED (μ m)] was determined. Results are expressed as mean \pm SE and analyzed by Student t-test. Histomorphometric analysis showed an increase in the BV/TV (%) of the bone crypt of 3- and 10- days-old pups exposed to NaF ($p < 0.01$); this increase was associated with a decrease in the N.Oc/mm ($p < 0.01$). TED of mandibular first molar was lower in prenatal NaF exposed group than in control group ($p < 0.01$). In conclusion, the increased BV/TV and the lower N.Oc observed in the bone crypt of 3- and 10- days-old pups from mothers treated with NaF suggested a disruptive effect triggered by F⁻ on the formation events of the eruptive pathway in the offspring.

Key words: sodium fluoride, pre-eruptive stage, dental eruption.

Introducción

El flúor (F) es un elemento considerado dentro del grupo de los “ultratraza” junto al aluminio (Al), el molibdeno (Mo) y el cobalto (Co). Este término referencia a aquellos elementos con un requerimiento dietario establecido, estimado o sospechado del orden de microgramos/día.¹ El agua de bebida representa la principal fuente de consumo humano del ion fluoruro (F⁻), tanto por el volumen ingerido como por la posible concentración del mineral en el agua de algunas regiones. En diferentes localidades de la Argentina se determinó que la concentración de F⁻ en el agua de bebida varía entre 1,35 y 7 mg/L.^{2,3} Datos de nuestro equipo de investigación, tomados en zonas del norte y noroeste de la provincia de Córdoba, mostraron un valor medio de 3,90 mg/día de ingesta total de F⁻ por persona, valor que duplica la dosis diaria recomendada (1,68 mg/día).³ Otras formas de consumo de F⁻ incluyen la sal, la leche, el té, los suplementos fluorados, las pastas dentales, los colutorios, cuyo contenido del halógeno varía ampliamente. Además, el uso incrementado de compuestos organofluo-

rados –que abarcan un amplio rango, como agroquímicos, pesticidas, fármacos y anestésicos entre otros– indica que, en la actualidad, el hombre puede estar expuesto al F⁻ a través de los alimentos, el agua de bebida y el aire que respira.⁴⁻⁶ Aunque muchos estudios aportaron información relevante sobre el metabolismo del F⁻ y sus efectos biológicos, existen datos controvertidos y muchos aspectos por dilucidar. Las acciones bifásicas y la estrecha ventana de toxicidad terapéutica del F⁻ hacen difícil la comprensión de los mecanismos moleculares desencadenados por este ion en diferentes tejidos, incluido el óseo.

La exposición crónica y elevada a F⁻ puede afectar negativamente la calidad de los tejidos mineralizados en formación y crecimiento así como la funcionalidad de los órganos que esos tejidos constituyen. Se conoce que la ingesta inadecuada o excesiva de F⁻ puede causar efectos adversos en niños.⁷ Una ingesta inadecuada, tal como ocurre cuando la concentración de F⁻ en el agua de bebida es $< 0,5$ mg/L, incrementa el riesgo de caries dental en niños.^{8,9} Sin embargo, cuando el consumo de

F⁻ está en el rango de 1,5 a 5,0 mg/L, el riesgo de fluorosis dental, tanto en dientes deciduos como en los permanentes, y de fluorosis esquelética se incrementa. El período de máxima susceptibilidad a los efectos tóxicos del F⁻ es el de los primeros 3 años de vida, especialmente entre los 6 y 24 meses.^{10,11} Además de la cantidad y la forma de ingesta, existen otros factores que pueden incrementar la susceptibilidad individual a la toxicidad del F⁻ incluyendo los desequilibrios ácido-base, la altitud de residencia, la disfunción renal, el “status” nutricional (deficiente en calcio, por ejemplo) y la genética individual.^{12,13} Es importante controlar la ingesta del F⁻ en los niños con el objetivo de minimizar el riesgo de fluorosis mientras se maximiza la prevención de la caries. A edad temprana, el 55% del F⁻ ingerido es retenido en comparación con los adultos en los que solo se retiene el 35%.¹⁴

Las acciones del F⁻ sobre el hueso pueden ser mediadas por su efecto físico-químico directo, formando parte de los cristales de fluorapatita,¹⁵ o como un agente anabólico óseo, regulando la actividad de los osteoblastos, e incrementando la masa ósea a través de un mecanismo aún no completamente conocido.^{16,17} Debido a su acción anabólica, numerosos trabajos realizados en roedores y en seres humanos evaluaron su potencial uso para el tratamiento de las patologías óseas; sin embargo, demostraron que el incremento en la masa ósea provocada por el fluoruro de sodio (NaF) no se correlaciona con la calidad y resistencia a la fractura del hueso neoformado.¹⁸ Aunque menos estudiado y controvertido, existe información acerca de la acción del F⁻ sobre la osteoclastogénesis, efecto que además es influenciado por las características genéticas del individuo.¹⁹ Algunos autores describieron que el F⁻ produce un efecto inhibitorio sobre la actividad de los osteoclastos,^{20,21} mientras que otros demostraron que altas dosis de F⁻ podrían incrementar la resorción del hueso.²²

La erupción dental es un evento complejo, programado y estrictamente regulado, espa-

cial y temporalmente, que comienza durante la gestación y continúa durante la vida posnatal.²³ El desarrollo de la dentición no se ha completado, aun cuando los tejidos mineralizados de la corona y la raíz del diente ya están formados; en los seres humanos, el proceso continúa durante los primeros años de vida desde que la pieza dental está alojada dentro de los maxilares (fase intraósea) hasta que perfora la mucosa, emerge en la cavidad bucal y alcanza la posición adecuada para la oclusión (fase supraósea).²⁴ Una etapa celular crítica en la erupción dental es el reclutamiento y la formación de osteoclastos activos, necesarios para la resorción de la cripta o canastilla ósea y para formar el canal de erupción a través del hueso alveolar. Las células mononucleares o precursoras de los osteoclastos deben ser reclutadas antes del inicio de la erupción dentro del folículo dental (FD), un saco de tejido conectivo que rodea el germen dental en desarrollo y principal regulador de la señalización que determina los eventos de formación y resorción del hueso alveolar durante el proceso eruptivo.²⁵ Algunos estudios demostraron que, en diferentes estados en los cuales se observa una disminución de la osteoclastogénesis o una función alterada de los osteoclastos, la erupción dental está retardada o, en algunos casos, completamente inhibida.^{26,27}

No hay datos concluyentes acerca del efecto del F⁻ sobre los osteoclastos y la osteoclastogénesis, ni tampoco se ha descrito el posible mecanismo desencadenado por el exceso de F⁻ sobre el proceso eruptivo dental. Es probable que la ingesta materna, excesiva y crónica de F⁻ durante el período de gestación y lactancia afecte, en las crías en desarrollo, el proceso de modelación del hueso alveolar que permite la formación del canal eruptivo. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la exposición prenatal a fluoruro sobre los eventos morfológicos y celulares que ocurren en la zona supracoronal de la cripta ósea que rodea al primer molar de crías lactantes, y su implicancia en el proceso de erupción dental.



Materiales y métodos

Animales y diseño experimental: se emplearon 6 ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) hembras de 45 días de edad, que fueron mantenidas bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12 h:12 h con libre disponibilidad de agua y comida (dieta comercial). Las hembras se dividieron al azar en dos grupos que recibieron agua con diferentes concentraciones de fluoruro (F⁻) en forma de NaF: el grupo control bebió agua de red que contiene 0,3 mg F⁻/L, mientras que el grupo tratado bebió agua con 23 mg/L de F⁻ correspondiente a 50 mg de NaF por litro (NaF 50 mg/L). El tratamiento se inició 4 semanas antes del apareamiento y continuó durante el período completo de gestación y lactancia. La ingesta de agua se registró periódicamente a lo largo del estudio. El día posterior al parto se ajustó el número de crías a 8 por cada hembra, para asegurar una lactancia normal y el crecimiento adecuado de las crías; se consideró a este día, el día 1 de vida posnatal. Crías de 3 (n=6-8), 10 (n=6-8) y 15 días (n=8) de edad fueron separadas cuidadosamente de sus madres. Bajo anestesia se obtuvo una muestra de orina (mediante punción vesical) de crías de 10 días de edad para evaluar el “status” de F⁻; la muestra de orina fue almacenada a -20 °C hasta el momento de la determinación. Poseutanasia, las mandíbulas completas de las crías de las diferentes edades indicadas fueron extraídas para su procesamiento histológico. Terminado el período experimental, las madres fueron sacrificadas y el incisivo inferior fue extraído para valorar el desarrollo de fluorosis dental.²⁸ Empleando una lupa estereoscópica se observó la apariencia heterogénea del esmalte evidenciado por la sucesión de bandas pigmentadas y no pigmentadas en los incisivos superiores de los animales con fluorosis.

El protocolo de trabajo con los animales fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Córdoba (CICUAL, 12/2015 FCM/UNC). Se realizaron todos los esfuerzos necesarios para reducir el número de animales empleado y minimizar su sufrimiento.

Determinación de los niveles de F⁻ en orina: la concentración del F⁻ urinario fue determinada mediante potenciometría directa empleando un electrodo de ion selectivo (Oakton Fluoride Combination Electrode Mod. 35802®) siguiendo el procedimiento descrito previamente.²⁹ Los valores de F⁻ fueron expresados como mg de F⁻/L.

Procesamiento histológico de las mandíbulas de las crías: inmediatamente después de la extracción de las mandíbulas completas, cada hemimandíbula fue fijada en una solución tamponada de formaldehído-PBS al 4% (pH 7,4) durante 24 horas. Posteriormente se descalcificaron en EDTA al 5% (pH 7,2) durante 35 días a temperatura ambiente. Antes de la inclusión de los tejidos en parafina, las hemimandíbulas se deshidrataron en soluciones alcohólicas crecientes hasta xilol. Se realizaron cortes seriados en sentido bucolingual de 6 µm de espesor a la altura mediocoronal del primer molar, usando un micrótopo (Leica®, Alemania) y luego se colorearon con hematoxilina y eosina (H&E). Se tomaron microfotografías de los cortes utilizando un microscopio con cámara digital acoplada Motic-BA 400® (MOTIC ASIA, Hong Kong). Sobre las imágenes digitalizadas de esos cortes se realizó el análisis de parámetros histomorfométricos estáticos, utilizando el *software* Image Pro Plus 6.1® (Media Cybernetics Inc., Estados Unidos).

Análisis histomorfométrico del hueso de la cripta: sobre las microfotografías de mandíbulas de crías de 3 y 10 días de edad se delimitó un área de la cripta ósea ubicada por encima del germen del primer molar inferior en erupción, denominada área supracoronal del hueso de la canastilla o cripta ósea. En esa zona, durante la fase intraósea de la erupción dental se forma el canal eruptivo a través de un proceso de resorción estrictamente regulado local y sistémicamente.²⁴ 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. Dentro del área supracoronar se obtuvo el porcentaje de superficie trabecular en relación con el área ósea considerada como total, el volumen óseo trabecular [BV/TV (%)]. Además, se calcularon los siguientes parámetros indirectos: número de trabéculas [Tb.N (1/mm)], espesor trabecular [Tb.Th (μm)] y separación trabecular [Tb.Sp (μm)].³⁰ El coeficiente de variación se calculó para determinar el error intraexaminador, el cual fue menor del 5%.

Determinación del número de osteoclastos en el hueso de la cripta (N.Oc/mm): la identificación y conteo de osteoclastos se realizó sobre los cortes teñidos con H&E en la zona supracoronar del hueso de la cripta ósea de crías de 3 y 10 días de edad, bajo la observación directa al microscopio óptico con una magnificación de 100x. El número de osteoclastos se evaluó a lo largo del frente de resorción, delimitado previamente. Se consideró osteoclastos a aquellas células gigantes de citoplasma acidófilo, en contacto con una superficie trabecular, con al menos dos núcleos. El número de osteoclastos se refirió a 1 mm para hacer posible las comparaciones de los distintos cortes entre los grupos.

Medición del grado de erupción dental [TED (μm): se empleó el método descrito por Fontanetti y col. (2013).²⁷ Dado 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 incluya al menos un punto óseo y un punto dentario. Sobre las microfotografías digitales de los cortes de las mandíbulas de crías de 15 días de edad se trazaron líneas paralelas considerando diferentes puntos anatomohistológicos del hueso y del elemento dentario en erupción. Se trazó una línea recta que una los límites amelocementarios vestibular (a) y lingual

(b) (Línea A). Luego, una línea recta paralela a la anterior que pase por el punto superior de la cresta ósea vestibular (d) (Línea B) y una línea paralela a la anterior que pase por la cresta ósea lingual (c) (Línea C). Las distancias a-d y b-c se utilizaron 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 (Figura 1).

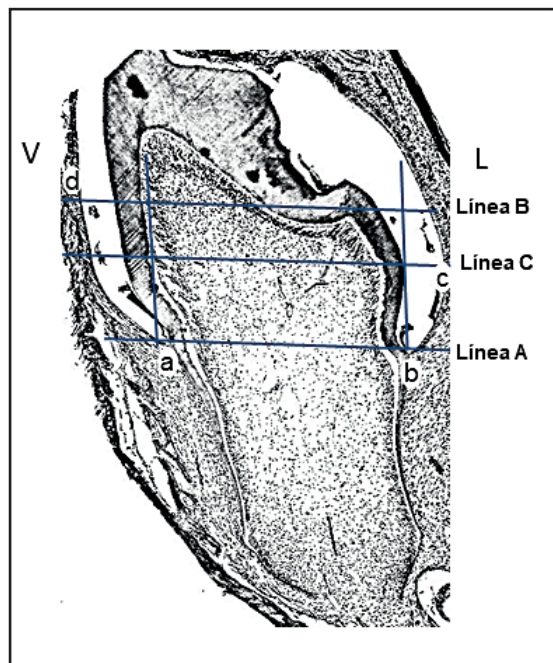


Figura 1. Imagen representativa de una sección bucolingual de mandíbula de cría. Para valorar el grado de erupción del primer molar mandibular se trazaron las siguientes líneas que se utilizaron para medir diferentes distancias entre puntos de referencia óseos y dentarios: Línea A, que une los límites amelocementario vestibular (a) y lingual (b). Línea B: una línea recta paralela a la línea A que pasa por el punto superior de la cresta ósea vestibular (d). Línea C: línea paralela a la anterior que pasa por la cresta ósea lingual (c). Las distancias a-d y b-c se utilizaron para la evaluación del grado de erupción dental por vestibular y lingual, respectivamente.



Análisis estadístico: todos los resultados se expresaron como media \pm error estándar (EE). La normalidad y la homogeneidad de varianzas se evaluaron mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la de Levene, respectivamente. Los datos fueron analizados mediante el test “t” de Student. En todos los casos las diferencias se consideraron significativas a $p < 0,05$. Todos los análisis se realizaron mediante el programa InfoStat® (versión 2017).

Resultados

No hubo diferencias significativas en el consumo diario de agua ni en la ganancia de peso corporal entre los grupos de madres (madres control (g): $276,75 \pm 7,88$; madres tratadas con NaF 50 mg/L: $277,80 \pm 16,24$). El esmalte del incisivo inferior de las madres control mostró una coloración normal, mientras que el esmalte de las madres que bebieron F⁻ presentó el patrón de coloración típico de la fluorosis dental. Estos resultados confirman que las hembras expuestas crónicamente a una alta concentración de F⁻ en el agua de bebida desarrollan fluo-

rosis. La exposición crónica de las hembras en los 30 días previos al apareamiento y durante el período completo de gestación y lactancia no tuvo efecto sobre el total de crías de la camada.

No se observaron diferencias significativas en la ganancia de peso corporal de las crías controles y las expuestas prenatalmente al F⁻ (datos no mostrados). Sin embargo, los niveles de F⁻ en la orina ($\mu\text{g/mL}$) de las crías de 10 días de edad fue mayor en comparación con lo observado en las crías de madres control (crías de 10 días: control, $0,78 \pm 0,05$ vs. NaF 50 mg/L, $2,46 \pm 0,41$; $p < 0,01$ vs. control) indicando el metabolismo alterado del F⁻ debido a la exposición prenatal al halógeno.

El grado de erupción [TED, (μm)] del primer molar, analizado en crías de 15 días de edad posnatal, fue menor en las crías del grupo tratado prenatalmente con NaF en comparación con el grupo control (tabla vestibular: control, $-1131,87 \pm 23,03$ vs. NaF 50 mg/L, $-1219,75 \pm 14,93$; tabla lingual: control, $-899,06 \pm 21,43$ vs. NaF 50 mg/L, $-1061,84 \pm 17,01$; $p < 0,05$ vs. control) (Figura 2).

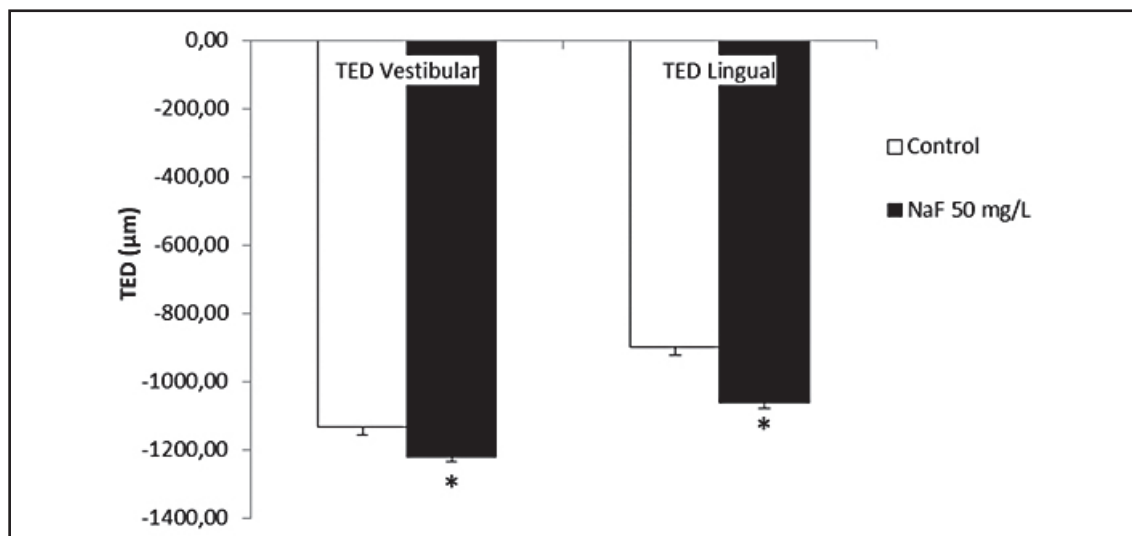


Figura 2. Grado de erupción (TED) del primer molar inferior en crías de rata de 15 días de edad. Los valores representan la media \pm EE de 8 animales por grupo. El TED (expresado en μm) se midió en el lado vestibular y lingual de mandíbulas de ratas controles y NaF 50 mg/L de 15 días de edad. * $p < 0,05$ vs. Control, test “t” de Student.

El análisis histomorfométrico de la zona supracoronal de la canastilla ósea que rodea el germen dental del primer molar inferior mostró mayor volumen óseo, [BV/TV (%)] en el grupo de crías provenientes de madres tratadas con F⁻ en comparación con sus controles, a ambas edades estudiadas (crías de 3 días de edad: control, 35,99 ± 1,04 vs. NaF 50 mg/L, 51,59 ± 2,13; p<0,01 vs. control; crías de 10 días de edad: control, 39,09 ± 1,12 vs. NaF 50 mg/L, 48,11 ± 2,88; p<0,05 vs. control). El incremento en este parámetro se asoció a un

mayor número [Tb.N (1/mm)] y espesor [Tb.Th (µm)] de trabéculas y a una menor separación trabecular [Tb.Sp (µm)] (Figura 3).

El número de células clásticas fue significativamente menor en las crías que recibieron F⁻ vía materna, tanto a los 3 como a los 10 días de vida posnatal, en comparación con lo observado en sus controles de la misma edad (crías de 3 días de edad: control, 16,99 ± 1,73 vs. NaF 50 mg/L, 8,72 ± 1,13; p<0,01 vs. control; crías de 10 días de edad: control, 16,20 ± 1,75 vs. NaF 50 mg/L, 7,26 ± 1,01; p<0,01 vs. control) (Figura 4).

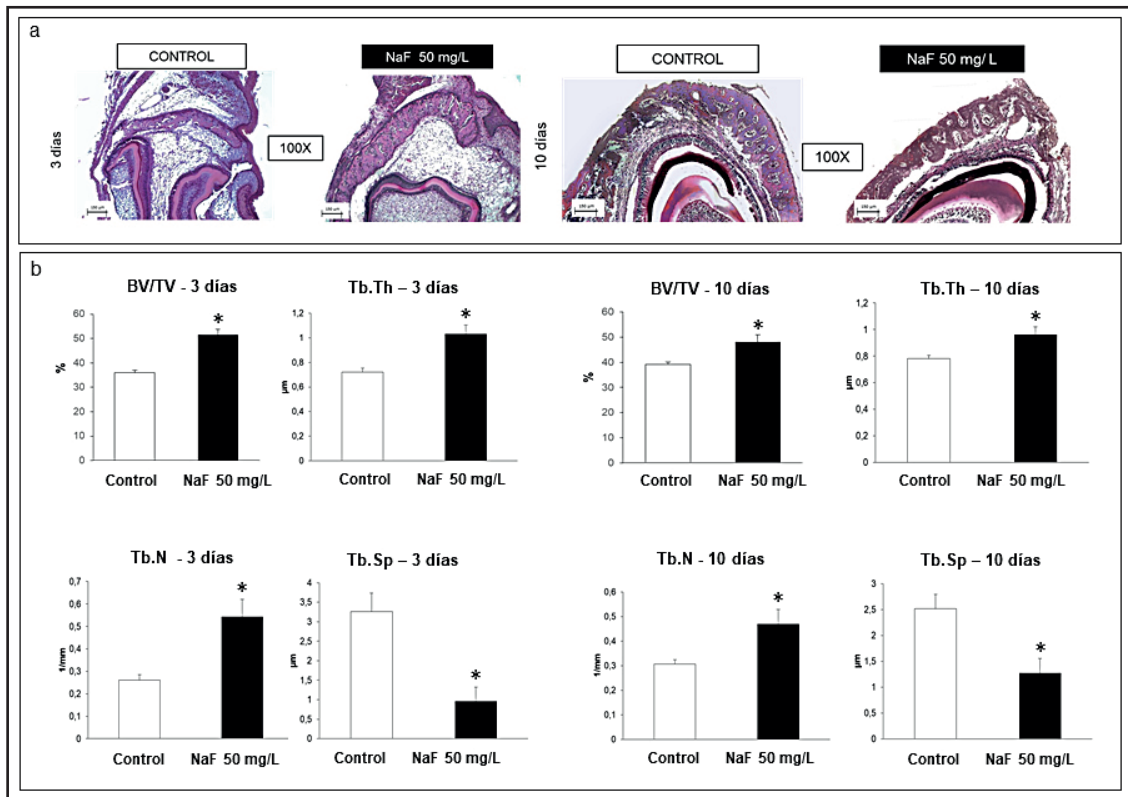


Figura 3. Análisis histomorfométrico del área supracoronal de la cripta ósea en crías de rata de 3 y 10 días de edad. **a)** Microfotografías representativas de secciones bucolinguales de mandíbula de crías de rata donde se observa la porción supracoronal del hueso de la cripta que rodea al germen del primer molar inferior de crías control y NaF 50 mg/L. Coloración H&E. Magnificación 100x. **b)** Los gráficos de barras representan la media ± EE de 6-8 animales por grupo de los siguientes parámetros histomorfométricos medidos en la porción supracoronal del hueso de la cripta de ratas control y NaF 50 mg/L: volumen óseo [BV/TV (%)], espesor trabecular [Tb.Th (µm)], número de trabéculas [Tb.N (1/mm)] y separación trabecular [Tb.Sp (µm)]. *p<0,05 vs. control, test "t" de Student.

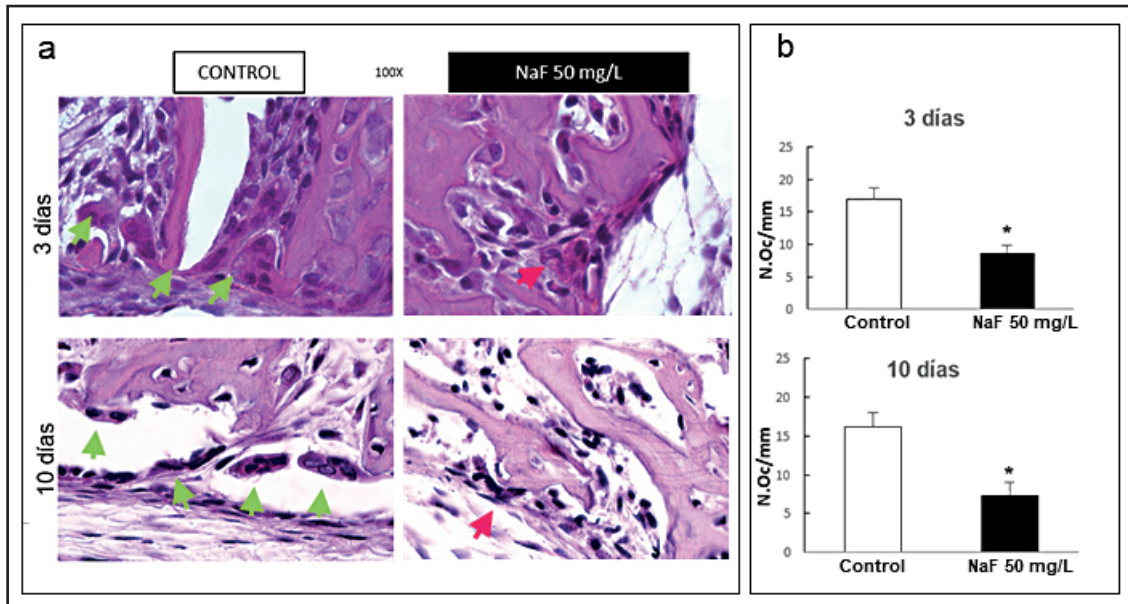


Figura 4. Número de osteoclastos (N.Oc/mm) medidos en el área supracoronal de la cripta ósea de crías de 3 y 10 días de edad. **a)** Microfotografías representativas de secciones buco-linguales de mandíbula de crías de 3 y 10 días de edad donde se observa el área supracoronal de la cripta que rodea al germen del primer molar inferior en crías control y NaF 50 mg/L. Las flechas señalan la presencia de osteoclastos. Coloración H&E. Magnificación 100x. **b)** Gráfico de barras que representa la media \pm EE de 6-8 animales por grupo del número de osteoclastos (N.Oc/mm). * $p < 0,05$ vs. control, test “t” de Student.

Discusión

El objetivo del estudio fue analizar el efecto de la exposición materna a F⁻ durante el período de gestación y lactancia sobre la erupción del primer molar de crías lactantes y los cambios morfológicos y celulares que ocurren en la zona supracoronal (oclusal) de la cripta del hueso alveolar para controlar la formación del canal eruptivo. Los resultados obtenidos muestran que la dosis de F⁻ recibida por las crías en crecimiento, vía leche materna y/o placenta, provocó un incremento en el volumen trabecular de la porción oclusal de la cripta ósea, tanto en la etapa preeruptiva temprana (día 3 de vida) como en la tardía (día 10). Dado que en este estadio el primer molar de las crías de rata aún no ha erupcionado en la cavidad bucal, las distancias medidas en las secciones de la mandí-

bula para valorar el grado de erupción se expresan como valores negativos. De esta manera, mayores distancias indicaron menor grado de erupción. Este efecto producido por el fluoruro puede ser el resultado de una alteración en el modelado óseo que promueve el movimiento del diente en desarrollo dentro de la cripta a través del canal eruptivo formado, causando un retardo en la aparición del primer molar en la cavidad bucal de las crías lactantes.

El mecanismo o fuerza conductora que impulsa el movimiento del diente a lo largo del canal eruptivo podría ser un aumento del volumen óseo en la base de la cripta. Previamente demostramos que la exposición prenatal a F⁻ fue capaz de provocar un incremento en el volumen trabecular de la porción basal del hueso de la cripta en las crías de ratas durante

la etapa preeruptiva.³¹ Tales resultados confirmaron el efecto anabólico, ampliamente descrito, provocado por el F⁻ sobre la capacidad osteogénica de los osteoblastos, así como los mecanismos de señalización activados por este tipo celular.³² Es probable, que la activación de las señales osteogénicas inducidas por el F⁻ interfieran con los mecanismos normales de reclutamiento de otras células óseas, causando alteraciones en el desarrollo mandibular normal y en el mecanismo de erupción dental. En el primer molar inferior de rata, el pico máximo de osteoclastogénesis se observa en el día 3 de vida posnatal mientras que un pico de actividad menor se observa al día 10 previo a la erupción del diente que ocurre entre los días 17 y 18. Por ello, el número de osteoclastos se evaluó en crías de 3 y 10 días en la zona supracoronal de la cripta ósea del germen del primer molar mandibular y fue significativamente menor en las crías que recibieron F⁻ vía materna, tanto a los 3 como a los 10 días de vida posnatal. No existen hasta el momento datos concluyentes acerca del efecto producido por el F⁻ sobre la osteoclastogénesis ni la función de los osteoclastos; algunos resultados mostraron que las dosis elevadas de F⁻ incrementaron la actividad de la fosfatasa ácida tartrato-resistente (TRAP), un biomarcador de linaje osteoclasto, evidenciando la inducción de la capacidad resorptiva de los osteoclastos.^{22,33} En contraposición, otros encontraron que el F⁻ redujo el número de osteoclastos y disminuyó su habilidad para resorber el hueso.^{20,34} El reclutamiento, la diferenciación y la actividad de los osteoclastos son eventos críticos para la resorción de la cripta y la formación del canal eruptivo.³⁵ En diferentes estados en los cuales se observa una disminución de la osteoclastogénesis o una función alterada de los osteoclastos, la erupción dental resulta retardada o, en algunos casos, completamente inhibida.^{27,36} El folículo dental (FD) cumple funciones esenciales para el desarrollo de la erupción; el requerimiento del FD fue evidenciado por estudios en diferentes modelos animales donde su remoción previa al inicio del proceso

eruptivo derivó en ausencia de erupción. El FD se localiza entre el hueso alveolar y el diente, lo que le permite regular los eventos celulares críticos para la erupción los que dependen de complejos mecanismos de señalización, de tipo autocrinos y paracrinos.³⁷ Las células del FD activan y reclutan a las células mononucleares, precursoras de osteoclastos y proveen el medio en el cual estas células se fusionan para formar los osteoclastos maduros.²⁵ Muchos de los genes (y sus productos) involucrados en el control de la formación, diferenciación y activación de los osteoclastos se localizan primariamente en el FD y en el retículo estelar; entre ellos: el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α), la interleuquina 1a (IL-1a), la proteína morfogenética ósea tipo 2 (BMP-2), el factor estimulador de colonias 1 (CSF-1), la osteoprotegerina (OPG), el ligando del receptor activador para el factor nuclear kB (RANKL), el péptido relacionado con la PTH (PTHrP), entre otros.^{35,38}

Existen evidencias de que PTHrP es sintetizada y se expresa en distintos tipos celulares.³⁹ El efecto que PTHrP ejerce en las células del FD activando y reclutando osteoclastos acelera la erupción dental.⁴⁰ Sun y col. demostraron que PTHrP incrementó la expresión del factor de diferenciación osteoclasto en las células del FD promoviendo la resorción ósea para crear el canal eruptivo.⁴¹ Estudios realizados en ratas mostraron que la máxima expresión génica de PTHrP ocurre entre los días 7 y 9 de vida posnatal y tal incremento se correlaciona con el segundo pico de osteoclastogénesis alrededor del día 10. Asimismo, demostraron que la señal de PTHrP en el FD desencadena un evento proosteoclastogénico capaz de inducir la expresión de VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular) en el FD, lo que deriva en la activación de RANK.⁴² Ensayos *in vitro* mostraron que PTHrP incrementó el ratio de expresión de RANKL/OPG en las células del FD.³⁷ La expresión de PTHrP es inhibida por la exposición crónica a dosis altas de F⁻ (100 mg /L).⁴³ Sería posible especular que la disminución en el número de células clásticas desencadenado por



la exposición crónica a F⁻ durante la etapa prenatal podría involucrar un efecto anticlastogénico mediado por la señal de PTHrP disminuida. Sería de interés analizar el efecto desencadenado por el F⁻ sobre la expresión de PTHrP y las moléculas inducidas por su señalización en las diferentes etapas del proceso eruptivo.

Los niveles de F⁻ en plasma de las crías expuestas prenatalmente no pudieron ser detectados, probablemente debido a que su concentración era inferior al límite de detección empleado para medirlo; sin embargo, el "status" de F⁻ de las crías fue corroborado mediante su determinación en orina. Los niveles séricos de F⁻ son determinados no solo por la ingesta del flúor dietario (fundamentalmente representado por la concentración del F⁻ en el agua de bebida), sino también por otros factores, como la tasa de remodelación ósea. En tal sentido, se conoce que los niveles de F⁻ retenidos en el hueso se incrementan con la edad, aun cuando los niveles de ingesta del halógeno sean relativamente bajos.⁴⁴ Aproximadamente el 60% del F⁻ movilizado durante la resorción es redepositado en el esqueleto, probablemente por reincorporarse "in situ" sin abandonar el microambiente de la unidad de remodelación;⁴⁵ de esta manera, en situaciones de elevada remodelación, como ocurre durante la etapa preeruptiva, las células óseas pueden estar expuestas a niveles de F⁻ en su entorno inmediato que son significativamente más elevadas que los niveles de F⁻ sistémicos; en estas condiciones, las concentraciones locales elevadas del ion podrían disparar señales que modifiquen

los eventos celulares propios de cada etapa del desarrollo y crecimiento con un impacto sobre los aspectos funcionales.

En conjunto, los datos sugieren que los efectos desencadenados por la exposición materna crónica a F⁻ durante la etapa de gestación y lactancia producen, en las crías, un efecto disruptivo en los procesos de formación/resorción ósea que ocurren durante el período de desarrollo del hueso mandibular y que acompaña al proceso eruptivo provocando el retraso en la emergencia del molar inferior en la cavidad bucal. Los resultados de este trabajo apoyan la idea de que el efecto desencadenado por el F⁻ en la etapa preeruptiva sea la inhibición de las señales que controlan la osteoclastogénesis, cuya consecuencia directa es el retardo en la erupción. Aportar información sobre el/los mecanismo/s molecular/es por el/los cual/es el F⁻ afecta el desarrollo y crecimiento del hueso maxilar durante la etapa prenatal y posnatal temprana tiene relevancia para la salud general y en particular para la odontológica.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Luis Croharé por su asistencia técnica. Este trabajo fue financiado por SECyT-Universidad Nacional de Córdoba (UNC) N° 411/2018 (Viviana Centeno).

Conflicto de intereses: los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Recibido: mayo 2020

Aceptado: julio 2020

Referencias

1. Nielsen FH. Ultratrace elements in nutrition: current knowledge and speculation. *J Trace Elem Exp Med* 1998; 11:251-74.
2. de la Sota M, Puche R, Rigalli A, Fernández LM, Benassati S, Boland R. Changes in bone mass and in glucose homeostasis in subjects with

- high spontaneous fluoride intake. *Medicina (B Aires)* 1997; 57(4):417-20.
3. Gallará RV, Piazza LA, Piñas ME, Barteik ME, Centeno VA y col. *Rev Fac Odontol Univ Nac (Córdoba)* 2017; 27(1):35-42.
 4. Nielsen FH. Micronutrients in Parenteral Nutrition: Boron, Silicon, and Fluoride. *Gastroenterology* 2009; 137: S55-60.
 5. Sampaio FC, Levy SM. Systemic fluoride. In: Lussi A, Huysmans M, Weber HP (eds). *Monographs in Oral Science*. Basel, Switzerland: Karger; 2011. Chap. 22, pp. 133-45.
 6. García MG, Borgino L. Fluoride in the context of the environment. In: Preedy V(ed). *The Royal Society of Chemistry. Fluorine: Chemistry, analysis, function and effects*. Cambridge, United Kingdom, 2015. Chap. 6, p. 3-18.
 7. Rasool A, Farooqi A, Xiao T, et al. A Review of Global Outlook on Fluoride Contamination in Groundwater with Prominence on the Pakistan Current Situation. *Environ Geochem Health* 2018; 40:1265-81.
 8. Aslani H, Zarei M, Taghipour H, Khashabi E, Ghanbari H, Ejlali A. Monitoring, mapping and health risk assessment of Fluoride in drinking water supplies in rural areas of Maku and Poldasht, Iran. *Environ Geochem Health* 2019; 41:2281-94.
 9. Kirkeskov L, Henrik Bøggild E, von Halldan Sckerl F, Carlsen A, Larsen MJ, Poulsen S. The association between fluoride in drinking water and dental caries in danish children. *Community Dent Oral Epidemiol* 2010; 38:206-12.
 10. Hong L, Levy SM, Broffit B, Warren JJ, Kanellis MJ, Wefel JS, Dawson D. Timing of fluoride intake in relation to development of fluorosis on maxillary central incisors. *Community Dent Oral Epidemiol* 2006; 34:299-309.
 11. Evans RW, Darvell BW. Refining the estimate of critical period for susceptibility to enamel fluorosis in human maxillary central incisors. *J Public Health Dent* 1995; 55:238-49.
 12. DenBesten P, Li W. Chronic fluoride toxicity: dental fluorosis. In: Lussi A, Huysmans M, Weber HP (eds). *Erosive Tooth Wear*. Basel, Switzerland: Karger. *Monogr Oral Sci*; 2011. Chap. 22, pp. 81-96.
 13. Everett ET. Fluoride's effects on the formation of teeth and bones, and the influence of genetics. *J Dent Res* 2011; 90:552-60.
 14. Villa A, Anabalon M, Zohouri V, Maguire A, Franco AM, Rugg-Gunn A. Relationships between fluoride intake, urinary fluoride excretion and fluoride retention in children and adults: an analysis of available data. *Caries Res* 2010; 44:60-8.
 15. Qu H, Wei M. The effect of fluoride contents in fluoridated hydroxyapatite on osteoblast behavior. *Acta Biomater Res* 2006; 2:113-19.
 16. Pan L, Shi X, Liu S, Guo X, Zhao M, Cai R, Sun G. Fluoride promotes osteoblastic differentiation through canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Toxicology Lett* 2014; 225:34-42.
 17. Qu WJ, Zhong DB, Wu PF, Wang JF, Han B. Sodium fluoride modulates caprine osteoblast proliferation and differentiation. *J Bone Miner Metabol* 2008; 26:328-34.
 18. Murray T, Ste-Marie L. Prevention and management of osteoporosis: consensus statements from the scientific advisory board of the osteoporosis Society of Canada. Fluoride therapy for osteoporosis. *Can Med Assoc J* 1996; 155:949-54.
 19. Yan D, Gurumurthy A, Wright M, Pfaller W, Lobo E, Everett E. Genetic background influences fluoride's effects on osteoclastogenesis. *Bone* 2007; 41:1036-44.
 20. Pei J, Li B, Gao Y, Wei Y, Zhou L, Yao H, Wang J, Sun D. Fluoride decreased osteoclastic bone resorption through the inhibition of NFATc1 gene expression. *Environ Toxicol* 2014; 29:588-95.
 21. Fina BL, Brance ML, Brun LR, Rigalli A. Fluoride inhibits in vitro and in vivo oxygen consumption and induces oxidative stress. *Fluoride* 2012; 45(4):325-30.
 22. Junrui P, Bingyun L, Yanhui G, Xu J, Darko GM, Dianjun S. Relationship between fluoride exposure and osteoclast markers during RANKL-induced osteoclast differentiation. *Environ Toxicol Pharmacol* 2016; 46:241-45.
 23. Wise GE. Cellular and molecular basis of tooth eruption. *Orthod Craniofac Res* 2009; 12:67-73.



24. Wise GE, Frazier-Bowers S, D'Souza RN. Cellular, molecular, and genetic determinants of tooth eruption. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13:323-34.
25. Wise GE, King GJ. Mechanisms of tooth eruption and orthodontic tooth movement. *J Dent Res* 2008; 87:414-34.
26. Brasdachia-Correa V, Moreira M, Arana-Chávez V. Reduced RANKL expression impedes osteoclast activation and tooth eruption in alendronate-treated rats. *Cell Tissue Res* 2013; 353:79-86.
27. Fontanetti PA, De Lucca RC, Mandalunis PM, Vermouth NT. Impairment of rat tooth eruption in pups born to mothers exposed to chronic stress during pregnancy. *Arch Oral Biol* 2013; 58:1643-51.
28. Saiani R, Porto I, Marcantonio E Jr, Cury J, Barbosa de Sousa E, Gerlach R. Morphological characterization of rat incisor fluorotic lesions. *Arch Oral Biol* 2009; 5:1008-15.
29. Rigalli A, Alloatti R, Puche RC. Measurement of total and diffusible serum fluoride. *J Clin Lab Anal* 1999; 13:151-7.
30. Dempster DW, Compston J, Drezner M, et al. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 2013; 28:2-17.
31. Interlandi V, Fontanetti PA, Ponce RH, Gallará RV, Centeno VA. Chronic exposure to fluoride during gestation and lactation increases mandibular bone volume of suckling rats. *Biol Trace Elem Res* 2018; 185:395-403.
32. Turner CH, Garetto LP, Dunipace AJ, Zhang W, Wilson ME, Grynypas MD, et al. Fluoride treatment increased serum IGF-1, bone turnover, and bone mass, but not bone strength, in rabbits. *Calcif Tissue Int* 1997; 61:77-83.
33. Debiński A, Nowicka, G. Effect of Sodium Fluoride on Ectopic Induction of Bone Tissue. *Ann Acad Med Stetin* 2004; 50:23-7.
34. Okuda A, Kanehisa J, Heersche JN. The effects of sodium fluoride on the resorptive activity of isolated osteoclasts. *J Bone Miner Res* 1990; 5:S115-S120.
35. Wise GE, He H, Gutiérrez DL, Ring S, Yao S. Requirement of alveolar bone formation for eruption of rat molars. *Eur J Oral Sci* 2011; 119:333-8.
36. Marks SC, Cahill DR. Regional control by the dental follicle of alterations in alveolar bone metabolism during tooth eruption. *J Oral Pathol* 1987; 16:164-9.
37. Takahashia A, Nagataa M, Guptaa A, et al. Autocrine regulation of mesenchymal progenitor cell fates orchestrates tooth eruption. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2019; 116:575-80.
38. Nancy A. Physiologic tooth movement: eruption and shedding. In: Nanci A (ed). *Ten Cate's Oral Histology: development, structure and function*. St Louis, Missouri: Elsevier; 2013. pp. 233-52.
39. Watson PH, Fraher LJ, Hendy GN, et al. Nuclear localization of the type 1 PTH/PTHrP receptor in rat tissues. *J Bone Miner Res* 2000; 15:1033-44.
40. Zhang J, Liao L, Li Y, Xu Y, Guo W, Tian W, Zou S. Parathyroid hormone-related peptide (1-34) promotes tooth eruption and inhibits osteogenesis of dental follicle cells during tooth development. *J Cell Physiol* 2019; 234:11900-11.
41. Sun H, Li Q, Zhang Y, et al. Regulation of OPG and RANKL expressed by human dental follicle cells in osteoclastogenesis. *Cell Tissue Res* 2015; 362:399-405.
42. Yao S, Pan F, Wise GE. Chronological gene expression of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) in the stellate reticulum of the rat: implications for tooth eruption. *Arch Oral Biol* 2007; 5:228-32.
43. Wang Y, Duan X, Zhao Z, et al. Fluoride affects calcium homeostasis by regulating PTH, PTHrP and CaR expression. *Biol Trace Elem Res* 2015; 165:159-66.
44. Hodge HC, Smith FA. Fluoride. In: Bronner F, Coburn JW (eds). *Disorders of Mineral Metabolism*. Vol. 1 New York: Academic Press; 1981. pp. 440-83.
45. Guo MK, Nopakun J, Messer H, Ophang R, Singer L. Retention of Skeletal Fluoride during bone turnover in rats. *J Nutr* 1988; 118:362-6.