


Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Biomédicas
2025

GMD Facultad Cs. Médicas
Biblioteca

TDM 2756

EFFECTOS DE LA INGESTA DE CAFEINA POR RATAS GESTANTES Y LACTANTES EN EL DESARROLLO DENTARIO Y MANDIBULAR DE SU PROGENIE

Od. Andrés Aravena

Director: Dr. Lucas R. Brun

Codirectora: Dra. Patricia Mandalunis

Laboratorio de Biología Ósea
Facultad de Ciencias Médicas
Universidad Nacional de Rosario



**Laboratorio de
Biología Ósea**

FCM Facultad de Ciencias
Médicas - UNR

INDICE

1	AGRADECIMIENTOS	3
2	Resumen	4
3	Abreviaturas.....	5
4	INTRODUCCIÓN.....	6
4.1	TEJIDO DENTARIO.....	6
	MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA DENTARIA.....	6
	HISTOLOGÍA DENTARIA.....	7
	ODONTOMORFOGENESIS	28
4.2	TEJIDO OSEO.....	31
	TEJIDO OSEO - GENERALIDADES	31
	MANDIBULA	38
	MANDIBULA DE LA RATA	39
4.3	CAFEÍNA	41
	CONSUMO DE CAFEINA	41
	FARMACOCINETICA y FARMACODINAMIA	43
	CAFEINA – ANTIOXIDANTE.....	45
	CAFEINA Y SALUD.....	45
	EFECTOS SOBRE EL HUESO Y EL BALANCE DE CALCIO	46
	EFECTOS EN EL DESARROLLO.....	49
	EFECTOS SOBRE EL TEJIDO MANDIBULAR Y DENTARIO.....	52
5	HIPOTESIS Y OBJETIVOS	54
6	MATERIALES Y MÉTODOS	55
6.1	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	55
6.2	TÉCNICAS	57
	ESTUDIO RADIOGRÁFICO	57
	RESISTENCIA ÓSEA	58
	HISTOMORFOMETRIA ESTÁTICA.....	60
	HISTOMORFOMETRIA DINÁMICA.....	64
	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.....	65
7	RESULTADOS	67
7.1	Estudio morfométrico mediante radiografías	67
7.2	Resistencia ósea	69
7.3	Histomorfometría Estática	69
	Cóndilo mandibular.....	69

	Odontoblastos y ameloblastos	70
	Predentina.....	70
	Cresta alveolar	71
7.4	Histomorfometría dinámica	72
8	DISCUSION	73
8.1	Estudio Radiográfico.....	74
8.2	Resistencia ósea	76
8.3	Histomorfometría.....	76
	Cóndilo mandibular.....	76
	Odontoblastos y ameloblastos	78
	Predentina.....	78
	Cresta alveolar	79
8.4	Histomorfometría dinámica	79
9	CONCLUSIONES.....	81
10	REFERENCIAS.....	82

1 AGRADECIMIENTOS

La importancia de agradecer radica en que todas las personas que a lo largo de los años me acompañaron, entiendan su importancia en este proceso que fue mi doctorado.

Quiero dedicar un especial agradecimiento a mi compañera de vida Virginia, quien desde el primer día de este camino en el mundo de la investigación, ¡hace más de 10 años ya! me acompañó, apoyó y llenó de amor. Este año no solamente “vio la luz” este doctorado, sino también nuestro hijo Rafael, nuestro Sol en la tierra. Gracias.

A mi familia, que de una manera u otra me inculcó el interés por la ciencia, la investigación y siempre me otorgó el espacio y los medios para poder perseguir esos caminos. Gracias.

A mis amigos, quienes siempre están, siempre inquietos, siempre curiosos. Ahora me van a poder decir Doctor de manera acertada. Gracias.

Al equipo del LBO, semillero de amistades y anécdotas. ¡Cuanto que aprendimos en este camino! Trabajo en equipo, ayuda mutua, asados, mates, fernet, congresos y tantas otras cosas. A este hermoso equipo, quiero legarles mis cajones, donde lean “Andres Aravena” ahora van a poder leer “LBO”. Gracias.

A mi director, Lucas, el mejor que uno podría pedir. Siempre dispuesto a resolver cualquier situación con sabiduría, pericia y de manera expeditiva. Con él aprendí ciencia y gestión, que bueno poder hacer una amistad tan valiosa.

Mi gratitud también va para mi codirectora, Patricia, que desde Buenos Aires me brindo consejos acertados e invaluables en cada tema investigado.

Finalmente agradezco a José y a Puche, portadores de la llave que abrió mi puerta de entrada a este mundo.

A todas y todos, mi más sincero agradecimiento. Este logro es tan suyo como mío, y espero que este camino siga siendo compartido en futuras aventuras.

2 RESUMEN

La cafeína (1,3,7-trimetilxantina) es un alcaloide derivado de xantinas e identificado en el café o mate siendo este último la fuente de ingreso (50%) más importante en Argentina, seguido por el café (36%). La cafeína atraviesa la placenta y es transportada por la leche materna. Debido a que se ha reportado que altas concentraciones de cafeína afectan negativamente el metabolismo mineral y osificación endocondral, nos propusimos como objetivo evaluar el efecto de la ingesta de cafeína por ratas gestantes sobre el desarrollo mandibular y dentario.

Materiales y métodos: Se llevo a cabo un estudio en ratas hembra de la línea Sprague-Dawley de 7 semanas de edad que se dividieron aleatoriamente en 3 grupos (n=4/grupo): 1. Agua (GC), 2. Cafeína (C, 25 mg/kg), 3. Cafeína+ (C+, 50 mg/kg). Los grupos con cafeína recibieron una solución de cafeína ad libitum, durante la preñez (21 días) y se continuó hasta el día 33 de vida de las crías. A las crías se les suministro 3 dosis de tetraciclina (10 mg/kg) a los días 14, 22 y 30 de vida. Al día 33 de vida se sacrificaron y se obtuvieron sus hemimandíbulas sobre las que se evaluó: A) estudio morfométrico y de densidad mineral mediante radiografías; B) estudio biomecánico de ensayo de flexión a tres puntos; C) histomorfometría estática de las piezas dentarias y del cóndilo mandibular; D) histomorfometría dinámica de piezas dentarias. La comparación entre los grupos se hizo mediante test de ANOVA y test de comparación múltiple de Tukey. Los datos se expresan como media±DS. Se consideró significativo a $p < 0.05$.

Resultados: A.1) No se hallaron diferencias significativas a nivel morfométrico. A.2) La densidad mineral a nivel del incisivo fue significativamente mayor en C+ vs GC (GC: 18.86 ± 6.07 , C: 21.99 ± 4.89 , C+: $25.16 \pm 4.25^*$; $p < 0.05$), sin diferencias a nivel del hueso mandibular. B) Se observó incremento significativo de la fuerza máxima soportada los grupos C y C+ vs el GC (GC: 24.6 ± 2.1 , C: $30.4 \pm 3.6^*$, C+: $30.1 \pm 5.6^*$; $p = 0.01$). La fuerza de fractura y la rigidez mostraron incremento significativo en el grupo C+ vs el GC (fuerza de fractura: GC: 21.9 ± 2.6 , C: 26.2 ± 4.6 , C+: $27.5 \pm 5.7^*$, $p = 0.04$; rigidez: GC: 39.5 ± 7.8 , C: 52.0 ± 22.8 , C+: $63.8 \pm 13.5^*$; $p = 0.01$). C.1) A nivel del cóndilo mandibular se halló un menor espesor del cartílago condilar en ambos grupos que recibieron cafeína vs GC. C.2) Se observó una mayor densidad celular de odontoblastos y ameloblastos en C+ vs el GC. D) Por histomorfometría dinámica se observó un incremento significativo en la aposición de tejido dentinario (μm) correspondiente al último intervalo administrado (día 30 a 38) en ambos grupos que recibieron cafeína vs el GC (GC: 813.8 ± 122 , C: $1698 \pm 117.4^*$, C+: $1555 \pm 128.1^*$; $p > 0.01$)

Conclusión: La administración de cafeína durante la gestación y lactancia en ratas parece tener efectos diferenciados en el desarrollo dentario y mandibular de sus crías. Mientras que la cafeína mejora varios parámetros dentarios, como la densidad mineral de los incisivos, la resistencia biomecánica y la proliferación celular en los tejidos dentarios, parece tener un efecto negativo en el cartílago condilar, región mandibular con un desarrollo de tipo endocondral.

3 ABREVIATURAS

UAD - Unión amelodentinaria

UAC - Unión amelocementaria

MEB - microscopía electrónica de barrido

BMP - proteínas morfogenéticas óseas

DS – Desvío estándar

TGF- β - factor de crecimiento transformante beta

BSP - proteínas de la matriz ósea

FGFs - factores de crecimiento fibroblásticos

Shh - proteínas Hedgehog

RUNX2 - factor de transcripción relacionado con Runt 2

IGF-1 y 2 - factores de crecimiento insulínico 1 y 2

FGF - factor de crecimiento de fibroblastos

PDGF - factor de crecimiento derivado de plaquetas

RANKL - ligando del receptor activador del factor nuclear kappa B

M-CSF - factor estimulante de colonia de macrófagos

TRAP - fosfatasa ácida resistente al tartrato

PTH - parathormona

ATM - articulación temporomandibular

XO - xantina oxidasa (XO)

NAT2 - N-acetil transferasa 2

cAMP - Adenosin monofosfato cíclico

AHA - altura vertical del hueso alveolar

MMA – Metilmetacrilato

DFR = Dentin formation rate

MAR - mineral apositional rate

ns - no significativo

4 INTRODUCCIÓN

4.1 TEJIDO DENTARIO

MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA DENTARIA

Desde el punto de vista anatómico, las piezas dentarias constan de una corona y una raíz, con el cuello dentario como la región que une ambas estructuras (Figura 1). La corona clínica es la porción visible del diente en la cavidad bucal, mientras que la raíz se inserta en el hueso alveolar, fijándose a este mediante el ligamento periodontal, un tejido conectivo fibroso que provee soporte y estabilidad. Aunque los dientes varían considerablemente en forma y tamaño, su estructura histológica es fundamentalmente similar. El eje estructural de cada diente está compuesto por la dentina, un tejido conectivo mineralizado de origen ectomesenquimático.¹

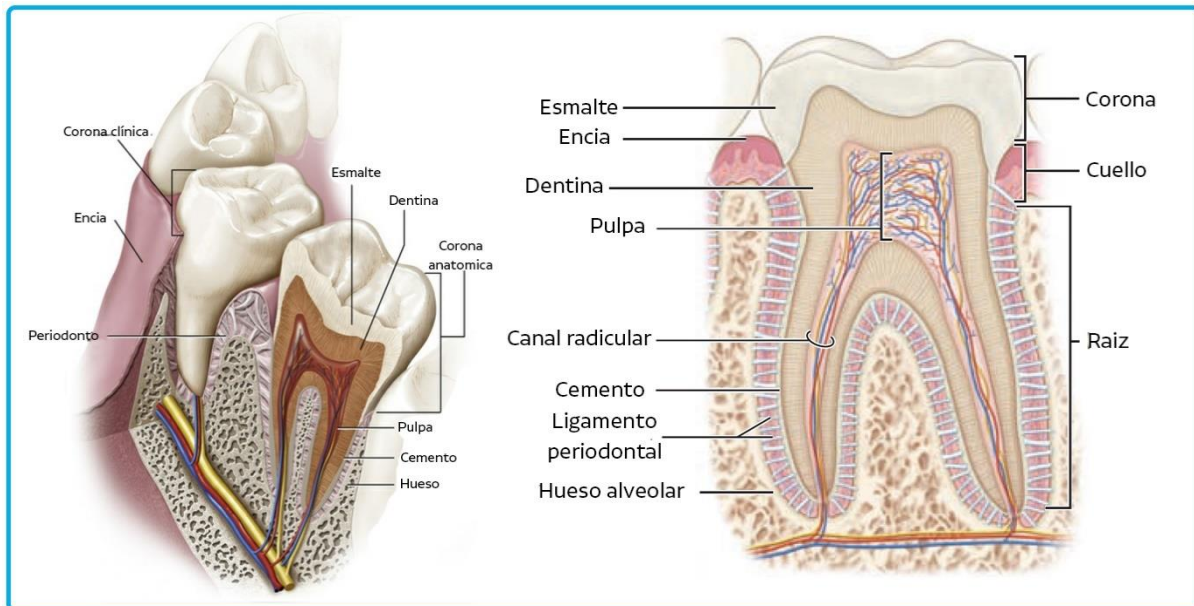


Figura 1. Pieza dentaria. Modificado de Cate, 2018 y Junqueira & Carneiro, 2013.

En la corona, la dentina está protegida, ya que se encuentra recubierta por esmalte, un tejido extremadamente duro de origen ectodérmico que actúa como primera barrera externa. En la región radicular, la dentina está recubierta por cemento, un tejido conectivo calcificado de origen ectomesenquimático.²

La unión entre esmalte y dentina se conoce como la unión amelodentinaria (UAD), mientras que la unión entre cemento y dentina se denomina unión cementodentinaria (UAC). Internamente, la dentina rodea una cavidad de forma similar a la del diente, conocida como

cavidad o cámara pulpar, que contiene la pulpa dentaria, un tejido conectivo. La pulpa y la dentina forman una unidad estructural y funcional llamada complejo dentino-pulpar.³

HISTOLOGÍA DENTARIA

COMPLEJO DENTINO-PULPAR: PULPA DENTAL

La pulpa dental forma parte del complejo dentino-pulpar (Figura 2), cuya estructura y función derivan de la papila dental, un tejido de origen ectomesenquimático.² Esta es la única porción blanda del diente y su morfología se adapta a la anatomía de cada pieza dental. En los dientes multirradiculares, como premolares y molares, la pulpa se divide en una porción coronaria y otra radicular. La región coronaria presenta un techo y un piso, desde el cual parten los conductos radiculares que se extienden hacia los forámenes apicales ubicados en el vértice distal de las raíces. Por otra parte, la pulpa radicular ocupa los conductos radiculares y en dientes unirradiculares se continúa sin límites definidos con la pulpa coronaria.¹

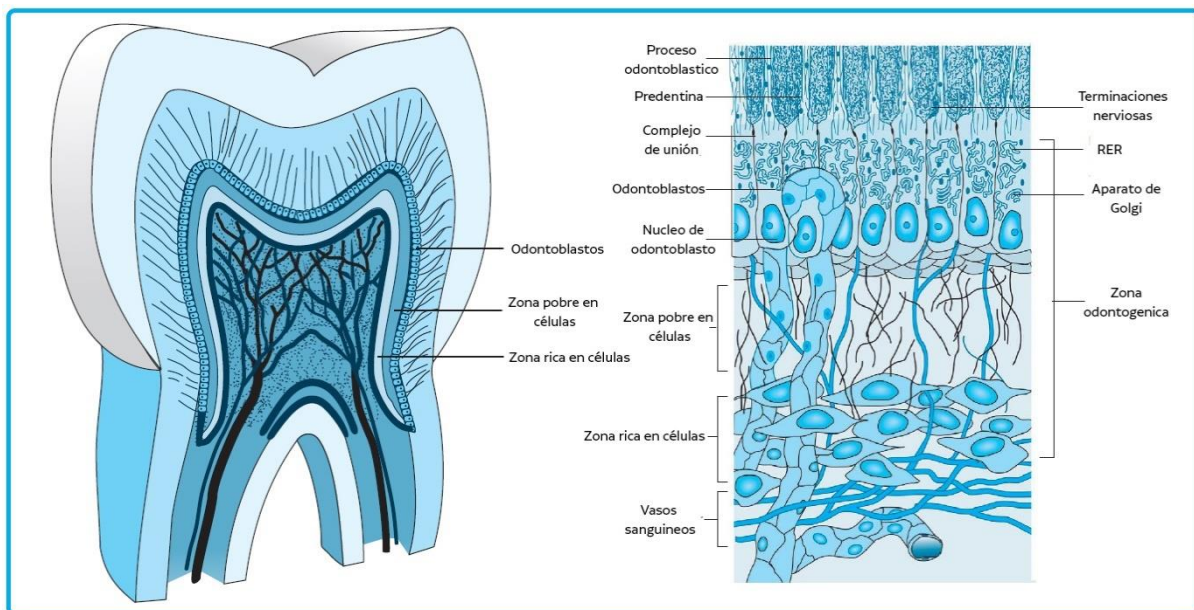


Figura 2. Complejo dentino-pulpar. Modificado de Kumar, 2019.

Con el avance de la edad, el tamaño de la cavidad pulpar se reduce debido a la deposición de dentina secundaria y, en respuesta a estímulos nocivos, la formación de dentina terciaria, la cual puede deformar la cavidad pulpar. Así, el complejo dentino-pulpar, estructural, embriológica y funcionalmente, actúa como una unidad biológica.

En cuanto a la organización celular, los cuerpos de los odontoblastos se sitúan en la interfaz entre la pulpa y la dentina, con sus prolongaciones, denominadas procesos odontoblásticos,

dentro de los túbulos dentinarios, atravesando el espesor de la dentina. Desde el punto de vista embriológico, tanto la pulpa como la dentina derivan de la papila dental, siendo los odontoblastos responsables de la formación y mantenimiento de la dentina y los fibroblastos de la formación y remodelación de la pulpa dental.⁴

COMPONENTES ESTRUCTURALES DE LA PULPA

La pulpa es un tejido conectivo, altamente vascularizado e innervado. En su periferia se encuentran los odontoblastos, células especializadas que producen diferentes tipos de dentina. La pulpa está compuesta por un 75% de agua y un 25% de materia orgánica, conformada por células y matriz extracelular, la cual incluye fibras y sustancia fundamental.⁵

Poblaciones celulares de la pulpa

Odontoblastos: Son las células que sintetizan la dentina que se ubican en la periferia de la pulpa, formando la capa odontoblástica. Estos muestran variaciones morfológicas relacionadas con su actividad secretora, siendo más altos y numerosos en la región coronaria que en la radicular.⁴ En la región coronaria alcanzan la cifra aproximada de 45000 por mm² y su número disminuye sensiblemente en la zona radicular. Los odontoblastos en plena actividad presentan un citoplasma basófilo, debido a un gran desarrollo del retículo endoplasmático granular (REG) asociado con la síntesis de matriz extracelular de la dentina (predentina), presentando forma de células cilíndricas altas (40 µm) con núcleos grandes de localización basal. Estas células son responsables de secretar los componentes de la matriz orgánica de la dentina, como glicoproteínas, proteoglicanos y colágeno (Figura 3).⁶

En la prolongación odontoblástica de un odontoblasto joven (activo), se observan vesículas secretoras y escasas organelas. El citoesqueleto constituido por microtúbulos y microfilamentos es el encargado de mantener la forma celular, especialmente a nivel de la prolongación (donde los filamentos se disponen linealmente) cuando la célula realiza los movimientos de retroceso en su actividad dentinogénica.

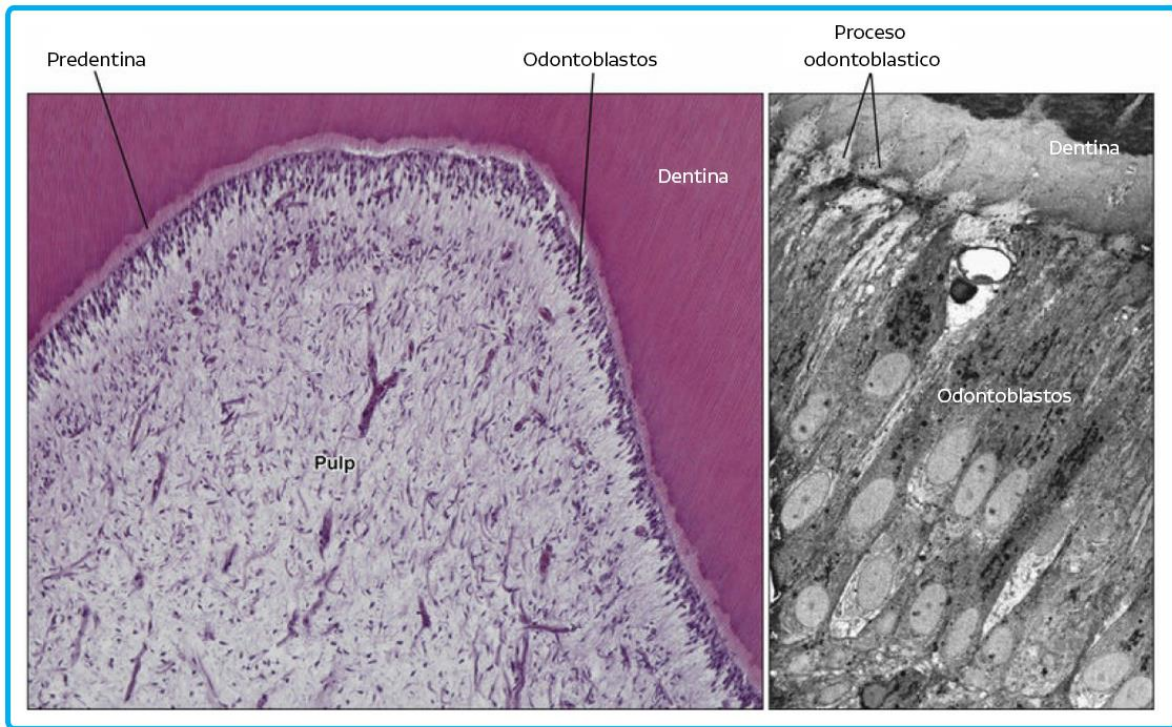


Figura 3. Corte histológico del complejo dentino-pulpar. Modificado de Cate, 2018.

Los odontoblastos se asocian unos a otros a través de sistemas de unión para formar la capa odontoblástica. El proceso odontoblástico es el responsable de transportar y liberar por un mecanismo de exocitosis los gránulos maduros al espacio extracelular. Los gránulos contienen glucosaminoglicanos, glicoproteínas y precursores del colágeno, componentes básicos de la matriz orgánica de la dentina (predentina) (Figura 4).

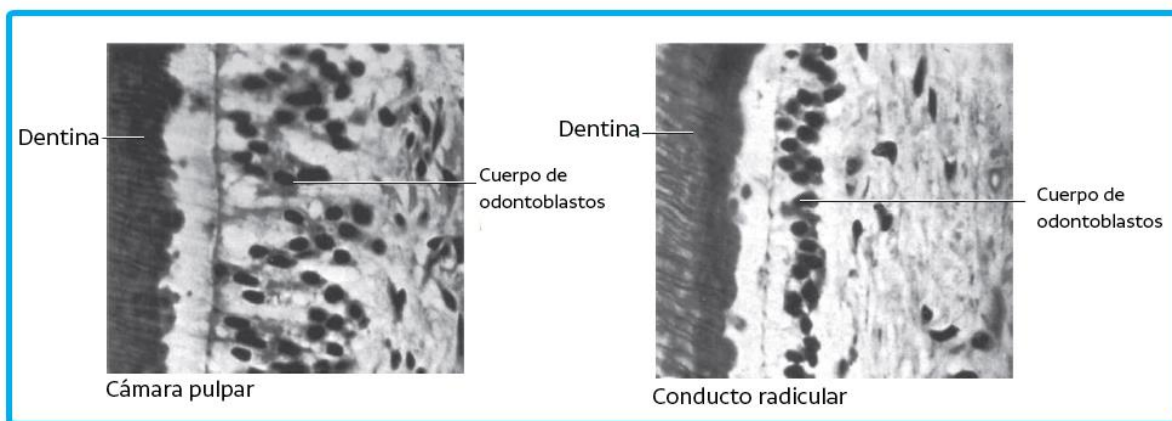


Figura 4. Dentina y odontoblastos. Corte histológico. Modificado de Kumar, 2019.

La prolongación citoplasmática en el interior del túbulo dentinario puede llegar hasta la conexión amelodentinaria, aunque en general, las prolongaciones ocupan solo el tercio

interno de la dentina. No obstante, no todos los túbulos poseen prolongaciones citoplasmáticas.

El odontoblasto maduro es una célula altamente diferenciada que ha perdido la capacidad de dividirse. Los nuevos odontoblastos que se originan en los procesos reparativos de la dentina lo hacen a expensas de las células ectomesenquimáticas o células madre de la pulpa dental.

Fibroblastos: Son las células más abundantes en el tejido pulpar, principalmente en la zona coronaria. Secretan los precursores de las fibras colágenas, reticulares y elásticas, como así también son los encargados de sintetizar y secretar componentes de la sustancia fundamental/amorfa. Los fibroblastos son los responsables del mantenimiento y renovación de la matriz extracelular. En la pulpa adulta los fibroblastos son menos activos.⁴

Células madre ectomesenquimáticas: Ubicadas en la región subodontoblástica y próximas a los capilares, estas células tienen la capacidad de diferenciarse en odontoblastos o fibroblastos en respuesta a estímulos reparativos. El número de estas células disminuye con la edad, lo cual trae aparejado una reducción en la capacidad de autodefensa y regeneración de la pulpa.⁶

Macrófagos y células dendríticas: Participan en los mecanismos de defensa de la pulpa, eliminando células muertas y microorganismos, y activando la respuesta inmunológica a través de la presentación de antígenos.⁷

Otras células del tejido pulpar: Se identifican linfocitos T, células plasmáticas y en ocasiones eosinófilos y mastocitos.

Fibras y sustancia fundamental

Fibras colágenas: Principalmente compuestas por colágeno tipo I, representan alrededor del 60% del colágeno pulpar. La matriz extracelular también contiene colágeno tipo III y VI.⁵

Fibras reticulares: Formadas por delgadas fibrillas de colágeno tipo III asociadas a fibronectina. Son fibras muy finas que se distribuyen de forma abundante en el tejido mesenquimático de la papila dental.⁵ Estas fibras se disponen al azar en el tejido pulpar, excepto a nivel de la región odontoblástica donde se insinúan entre las células y constituyen el plexo de Von Korff.²

Sustancia fundamental: Está compuesta por proteoglicanos, glicoproteínas y agua. El ácido hialurónico es un componente esencial en pulpas maduras, proporcionando viscosidad y cohesión a la sustancia fundamental.

ZONAS TOPOGRÁFICAS DE LA PULPA

Desde el punto de vista histológico, la pulpa dental presenta cuatro regiones bien diferenciadas. Estas zonas, desde la predentina (dentina sin mineralizar) hacia el interior de la pulpa, son:

- 1) Zona odontoblástica
- 2) Zona subodontoblástica u oligocelular de Weil
- 3) Zona rica en células
- 4) Zona central de la pulpa

Zona odontoblástica: Esta zona está formada por odontoblastos dispuestos en empalizada. Los cuerpos celulares de los odontoblastos están conectados entre sí por complejos de unión, destacándose las uniones ocluyentes y los desmosomas en la porción proximal, adyacente a la predentina. Estas uniones permiten mantener la integridad de la capa odontoblástica. Además, en las caras laterales de los odontoblastos predominan las uniones de hendidura o *gap junctions*, que regulan el intercambio de metabolitos entre estas células.⁴

Zona subodontoblástica u oligocelular de Weil: Con un espesor ~40 µm, esta zona se caracteriza por la baja cantidad de células. Es claramente visible en la región coronaria de los dientes, pero está ausente en la región radicular. En esta región se encuentra el plexo nervioso de Raschkow, que puede visualizarse mediante técnicas de impregnación argéntica. También se hallan células dendríticas que participan en la respuesta inmunitaria de la pulpa.

8

Zona rica en células: Esta región tiene una alta densidad celular, y es donde predominan células ectomesenquimáticas, también conocidas como células madre de la pulpa. Los fibroblastos de esta zona son responsables de la síntesis de fibras de Von Korff, que son esenciales para la estructura del tejido pulpar.

Zona central de la pulpa: La zona central de la pulpa está formada por tejido conectivo laxo. En esta región se observa una abundante presencia de vasos sanguíneos y fibras nerviosas. La población celular está principalmente constituida por fibroblastos, células

ectomesenquimáticas y macrófagos perivasculares, que juegan un papel crucial en el mantenimiento y reparación del tejido pulpar.⁹

COMPLEJO DENTINO-PULPAR: DENTINA

La dentina es el eje estructural del diente, constituyendo el tejido mineralizado que conforma la mayor parte del volumen de la pieza dentaria. En la porción coronaria, la dentina está recubierta por el esmalte, mientras que en la región radicular está tapizada por cemento. Internamente, la dentina delimita la cámara pulpar, la cual contiene a la pulpa dental, un tejido vital que interactúa íntimamente con la dentina a lo largo de la vida del diente.⁴

El espesor de la dentina varía según el tipo de diente. Es mayor en los bordes incisales o cuspídeos, y disminuye en la raíz. En dientes más viejos, el espesor aumenta debido a la formación de dentina secundaria, un fenómeno de crecimiento aposicional que se produce con el tiempo.¹

En cuanto a su estructura, la dentina presenta dos componentes esenciales: la matriz mineralizada y los túbulos dentinarios que la atraviesan. Estos túbulos alojan los procesos odontoblásticos, extensiones citoplasmáticas de los odontoblastos, las células responsables de la producción de la matriz colágena y la calcificación de la dentina.

La dentina está compuesta por un 70% de materia inorgánica mineralizada (principalmente cristales de hidroxiapatita), 18% de materia orgánica (principalmente fibras colágenas) y 12% de agua.

Los cuerpos de los odontoblastos están separados de la dentina mineralizada por una delgada capa de matriz orgánica no mineralizada denominada predentina. La dentina y la pulpa forman una unidad estructural y funcional, ya que la pulpa nutre y mantiene la vitalidad de la dentina, mientras que la dentina actúa como una barrera protectora para la pulpa. Ambas comparten un origen embrionario común, derivado del ectomesenquima de la papila dental, y juntas constituyen el complejo dentino-pulpar.⁹

ESTRUCTURA HISTOLOGICA DE LA DENTINA

Unidades estructurales básicas

Las principales unidades estructurales de la dentina son los túbulos dentinarios y la matriz intertubular, las cuales determinan sus propiedades mecánicas y biológicas.

Los túbulos dentinarios son estructuras cilíndricas delgadas que se extienden a lo largo del espesor de la dentina, desde la pulpa hasta la unión amelodentinaria o cementodentinaria. Estos túbulos se encuentran revestidos por dentina peritubular, una matriz altamente mineralizada que juega un papel crucial en la resistencia mecánica de la dentina. En su interior, los túbulos albergan la prolongación odontoblástica o proceso odontoblástico, y entre esta estructura y la pared tubular se encuentra el espacio periprocesal, ocupado por el fluido dentinario, responsable en parte de la vitalidad y sensibilidad de la dentina.¹⁰

Morfología general de los túbulos: curvaturas y ramificaciones

Los túbulos de la dentina coronaria siguen una trayectoria curvada en forma de S itálica, conocida como curvatura primaria, causada por el apiñamiento de los odontoblastos durante la formación de la dentina. El número de túbulos por milímetro cuadrado decrece desde la pulpa hacia las regiones más externas de la dentina, desde aproximadamente 45000-65000 por mm² cerca de la pulpa, hasta 15000-20000 por mm² en las regiones más alejadas de la pulpa.¹¹ El diámetro de los túbulos también varía siendo de mayor diámetro en la proximidad de la pulpa alcanzando hasta 5 µm de diámetro y de menor diámetros en la periferia, de 1,7 µm promedio.¹²

Pared de los túbulos dentinarios

Los túbulos están rodeados por dentina peritubular, un anillo mineralizado que se deposita de manera centrípeta dentro del túbulo y aumenta con la edad. Esta dentina peritubular es notable por su alto contenido mineral y ausencia de colágeno, diferenciándose de la dentina intertubular, que contiene más material orgánico. La mineralización de la dentina peritubular puede incluso obliterar los túbulos en el tiempo, un proceso conocido como esclerosis.

Contenido de los túbulos dentinarios

Los túbulos dentinarios contienen la prolongación odontoblástica, que es una extensión citoplasmática de los odontoblastos. Además, el espacio periprocesal está lleno de un fluido rico en sodio que mantiene la homeostasis de la dentina. En el espacio periprocesal penetran hasta cierta distancia, fibras nerviosas amielínicas provenientes de la pulpa.¹³

La matriz intertubular o dentina intertubular se distribuye entre las paredes de los túbulos dentinarios y su componente fundamental son las fibras de colágeno que constituyen una malla fibrilar entre la cual se depositan los cristales de hidroxapatita.¹⁴

CLASIFICACION HISTOTOPOGRAFICA DE LA DENTINA

La dentina puede clasificarse en tres zonas principales: la dentina del manto, la dentina circumpulpar y la predentina. Estas zonas se diferencian tanto en sus características histológicas como en su función durante el proceso de formación del diente.¹

Dentina del manto

La dentina del manto es la primera dentina en formarse, sintetizada por los odontoblastos recién diferenciados. Constituye una capa delgada situada bajo el esmalte en la corona y el cemento en la raíz. Su matriz orgánica está compuesta por fibras colágenas gruesas, denominadas fibras de Von Korff, que en la corona se orientan de manera paralela a los túbulos dentinarios y perpendicular a la unión amelodentinaria, mientras que en la raíz se disponen paralelas a la interfase cementodentinaria. La mineralización de esta dentina es distinta a la de la dentina circumpulpar, resultando en una menor calcificación. La dentina del manto también presenta un número elevado de túbulos debido a la presencia de ramificaciones terminales.¹⁰

Dentina circumpulpar

Posterior a la formación de la dentina del manto, se deposita la dentina circumpulpar, que constituye la mayor parte del volumen de la dentina. A diferencia de la dentina del manto, sus fibras colágenas son más finas y están dispuestas de manera irregular, formando una red densa. La mineralización en esta región es de tipo globular, lo que contrasta con la mineralización lineal de la dentina del manto.

Predentina

La predentina es una capa de dentina no mineralizada, localizada entre los odontoblastos de la pulpa y la dentina circumpulpar. Está compuesta por una matriz orgánica rica en proteínas sulfuradas, similar a la sustancia osteoide del hueso, y es fácilmente distinguible en cortes descalcificados teñidos con hematoxilina-eosina, debido a su acidófila/eosinofilia. Esta capa

se mantiene durante toda la vida, debido a la continua actividad, lenta, de los odontoblastos.¹⁵

DENTINOGENESIS

Generalidades

La dentinogénesis es el proceso mediante el cual la papila dental, a través de sus células especializadas llamadas odontoblastos, sintetiza una matriz orgánica que posteriormente se calcifica para formar la dentina. Este proceso puede dividirse en tres etapas:

- 1- Elaboración de la matriz orgánica, compuesta por fibras colágenas y un componente amorfo.
- 2- Maduración de la matriz.
- 3- Precipitación de sales minerales (mineralización).

La formación de la dentina comienza en el estadio de campana avanzada, iniciándose en el vértice de la papila dental que corresponde a las futuras cúspides o bordes incisales. La formación de la dentina radicular ocurre posteriormente, en sentido apical, bajo la influencia de la vaina epitelial de Hertwig.²

Ciclo vital de los odontoblastos

Los odontoblastos se diferencian a partir de células ectomesenquimáticas de la papila dental, bajo la influencia del epitelio interno del órgano del esmalte. Este ciclo puede dividirse en las siguientes etapas:

- 1- Células mesenquimáticas indiferenciadas.
- 2- Preodontoblastos.
- 3- Odontoblastos jóvenes.
- 4- Odontoblastos secretores.

La predentina, que elaboran los odontoblastos, está compuesta principalmente por colágeno de tipo I, V y VI. Una vez formada, el odontoblasto participa en su mineralización, transformándola en dentina del manto. Cuando la prolongación odontoblástica queda alojada en el túbulo dentinario de la matriz de la dentina recién formada el odontoblasto, que se desplaza centripetamente hacia el interior de la pulpa, recibe la denominación de odontoblasto maduro. Luego, aunque disminuye de volumen, contribuye durante el resto de su vida al mantenimiento de la matriz dentinaria.¹⁶

Formación de la dentina del manto

La dentina del manto es la primera en formarse y está compuesta por fibras colágenas gruesas dispuestas paralelamente entre sí y de manera perpendicular a la lámina basal, que más tarde se convertirá en la UAD. Una vez que esta predentina alcanza un espesor de aproximadamente 6 μm , comienza su mineralización.¹⁷

Simultáneamente con el primer depósito de la dentina del manto, los ameloblastos fagocitan la lámina basal y se establece una unión festoneada entre ambos tejidos.

Formación de la dentina circumpulpar

Una vez que se ha mineralizado la dentina del manto, los odontoblastos continúan secretando matriz orgánica, formando la dentina circumpulpar. La matriz extracelular de esta región está compuesta por fibras colágenas más delgadas, dispuestas de manera irregular, formando una red orientada de manera perpendicular a los túbulos dentinarios.

La mineralización sigue un patrón globular, donde se forman múltiples núcleos de cristalización globulares (llamados calcosferitos) que luego se fusionan.¹⁸ Si esta fusión no se completa, se genera la dentina interglobular. Al límite existente entre la predentina y la matriz dentinaria previamente mineralizada se le denomina frente de mineralización. La aposición rítmica de la matriz y las distintas etapas de la calcificación quedan registradas en las líneas incrementales de la dentina. Siempre persiste una capa de dentina no mineralizada (predentina) entre los odontoblastos y el frente de mineralización cuyo espesor oscila entre 10 y 40 μm .^{19,20}

Formación de la dentina radicular

La formación de la dentina radicular comienza después de completada la formación del esmalte y se encuentra avanzada la deposición de dentina coronaria. Los odontoblastos radiculares se diferencian bajo la inducción de la vaina epitelial de Hertwig, siguiendo procesos similares a los de la formación de la dentina coronaria, aunque con algunas diferencias en la disposición de las fibras colágenas, que son paralelas a la interfase dentina-cemento.²¹

ESMALTE

El esmalte cubre la dentina coronaria, ofreciendo una protección esencial al tejido conectivo subyacente que conforma el complejo dentino-pulpar. Es el tejido más duro del organismo, compuesto principalmente por prismas altamente mineralizados. Esta dureza se debe a su alto contenido de matriz inorgánica (95%) y bajo contenido de matriz orgánica (entre 0.36% y 2%). Los cristales de hidroxiapatita, compuestos por fosfato de calcio, representan el componente inorgánico del esmalte (Figura 5).²

Algunas de las características que hacen del esmalte un tejido único incluyen:

- Origen embriológico: El esmalte deriva del órgano del esmalte, de naturaleza ectodérmica.²²
- Matriz orgánica: La matriz orgánica del esmalte está formada por proteínas y polisacáridos, pero no contiene colágeno.
- Cristales de hidroxiapatita: densamente empaquetados y son más grandes que los presentes en otros tejidos mineralizados. Estos son susceptibles (solubles) a la acción de los ácidos.
- Células secretoras: Los ameloblastos, las encargadas de la secreción del esmalte, desaparecen tras la formación de este tejido durante la erupción dental. Tras la formación del esmalte los ameloblastos formarán, junto con el resto del órgano del esmalte, el epitelio dental reducido. En el momento de la erupción se fusionará este epitelio con el epitelio bucal, parte de este migrará hacia el cuello dentario para formar la primera adherencia epitelial. Esto significa que, una vez erupcionado, el esmalte no puede regenerarse ni formar nuevo tejido.
- Acelularidad: El esmalte maduro no contiene células ni prolongaciones celulares, por lo que no se considera un tejido en el sentido clásico, sino una sustancia extracelular altamente mineralizada.
- Respuesta a noxas: Frente a una noxa, el esmalte pierde sustancia y no puede repararse, aunque puede sufrir procesos de remineralización bajo ciertas condiciones.

El esmalte en los dientes erupcionados está cubierto inicialmente por una película primaria, que es el último producto de secreción de los ameloblastos, ofreciendo protección. Esta

película desaparece con la entrada en oclusión y es reemplazada por una película secundaria de origen salival, conocida como película adquirida, sobre la cual se forma el biofilm.

En su superficie interna, el esmalte está en contacto con la dentina a través de la UAD, en el área cervical, el espesor del esmalte es mínimo, y se relaciona tanto con el cemento como con la encía mediante la unión dentogingival.²³

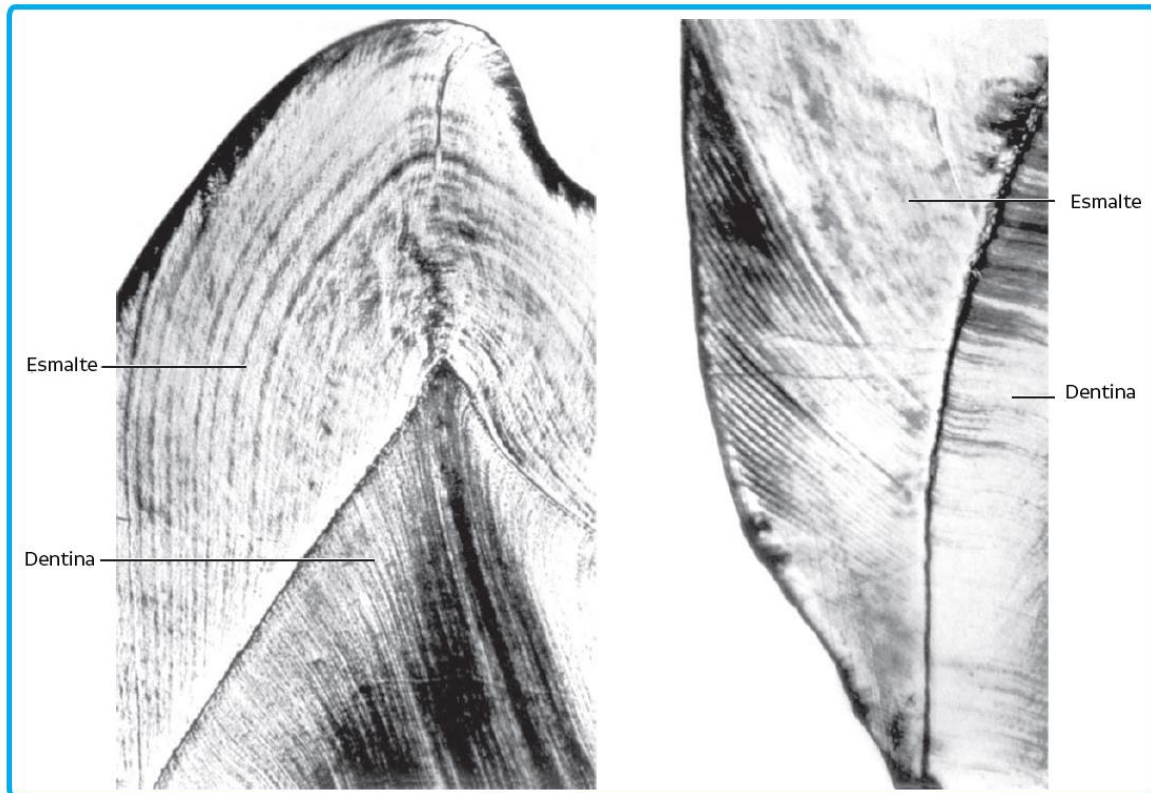


Figura 5. Microfotografía de corte del esmalte. Modificado de Kumar, 2019.

ESTRUCTURA HISTOLOGICA DEL ESMALTE

El esmalte dental se compone de la unidad estructural básica denominada "prisma del esmalte" y de varias unidades estructurales secundarias que se originan a partir de esta.¹

Unidad estructural básica del esmalte

Los prismas del esmalte, formados por cristales de hidroxapatita, constituyen la mayor parte de la estructura del esmalte prismático. Este esmalte se extiende desde la UAD hasta la superficie externa del esmalte. En las regiones periféricas de la corona y a nivel de la UAD, se encuentra una zona de esmalte aprismático, donde la disposición de los cristales no configura prismas discernibles.

Esmalte prismático

La morfología de los prismas se caracteriza por estructuras longitudinales de aproximadamente 4 μm de diámetro, que se extienden desde la UAD hasta la superficie del esmalte. Su longitud excede el espesor del esmalte debido a su disposición sinuosa, y su diámetro varía entre 4 y 10 μm .¹ Cuando se observan mediante microscopía óptica, los prismas del esmalte aparecen como bandas delgadas y paralelas en cortes longitudinales, mientras que en cortes transversales se presentan con una morfología hexagonal u ovoidal, similar a escamas de pescado.²⁴

En estudios con microscopía electrónica de barrido (MEB), los prismas exhiben una disposición irregularmente paralela en cortes longitudinales, mientras que en cortes transversales presentan la clásica morfología de "ojo de cerradura", permitiendo identificar la cabeza (en forma de cúpula) y la cola del prisma.²⁵ Los prismas están estrechamente interrelacionados, de modo que las cabezas de los prismas se ubican entre las colas de los prismas adyacentes. El material orgánico, aunque escaso, rodea los prismas y se dispone principalmente en la periferia, formando la denominada vaina del prisma. En cortes longitudinales bajo MEB, se puede observar una segmentación transversal de los prismas, marcada por líneas más densas que se disponen a intervalos de 4 μm , lo que refleja los descansos rítmicos en el proceso de deposición de la matriz orgánica durante la amelogénesis.²⁶

Esmalte aprismático

El esmalte aprismático se refiere a la porción del esmalte que carece de prismas definidos. Este material, con un espesor aproximado de 30 μm , se encuentra en la superficie externa del esmalte prismático y está presente en todos los dientes primarios. En los dientes permanentes, se localiza en aproximadamente el 70% de los casos, principalmente en las regiones cervicales, fisuras y microfisuras, con una menor presencia en las superficies cuspídeas.¹

AMELOGENESIS

Generalidades

La amelogénesis es el proceso por el cual se forma el esmalte dental, y se divide en dos etapas principales: primero, la elaboración de una matriz orgánica extracelular, y segundo, la mineralización casi inmediata de esta matriz, la cual comprende dos fases: a) la formación, nucleación y elongación de los cristales de hidroxiapatita, y b) la remoción de la matriz orgánica seguida por la maduración del cristal.¹

Los ameloblastos, que son las células encargadas de este proceso, se diferencian a partir del epitelio interno del órgano del esmalte y alcanzan un alto grado de especialización durante el desarrollo dental. La diferenciación de los ameloblastos está condicionada por la presencia de dentina, lo que explica que este proceso comience en el extremo cuspídeo del diente en formación y se propague en dirección hacia las asas cervicales, hasta que todas las células del epitelio interno se diferencien en ameloblastos (Figura 6).²⁷

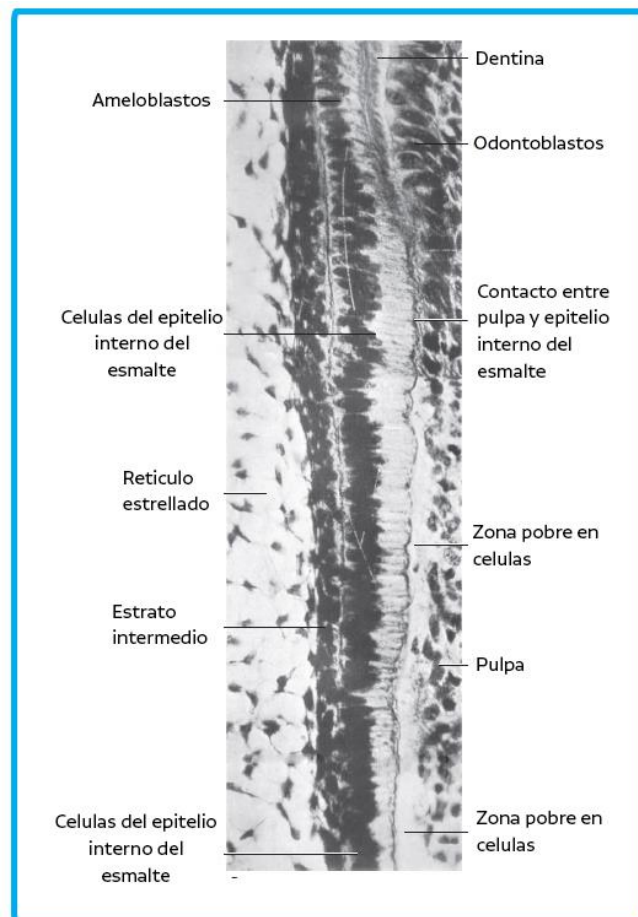


Figura 6. Corte histológico de ameloblastos. Modificado de Kumar, 2019.

Ciclo vital de los ameloblastos

El ciclo vital de los ameloblastos se divide en las siguientes etapas:

- 1- Etapa morfogénica (preameloblasto).
- 2- Etapa de organización o diferenciación (ameloblasto joven).
- 3- Etapa formativa o de secreción (ameloblasto activo, secretor o maduro).
- 4- Etapa de maduración.
- 5- Etapa de protección.
- 6- Etapa desmolítica.

1. Etapa Morfogénica

Durante la etapa morfogénica, las células del epitelio interno del órgano del esmalte interactúan con las células ectomesenquimáticas de la papila dental, determinando la forma de la CAD y de la corona dental. Los preameloblastos, en este periodo, son células cilíndricas bajas con un núcleo centralmente ubicado. El epitelio interno del órgano del esmalte está separado del tejido conectivo de la papila por una lámina basal delgada, llamada lámina basal ameloblástica.²⁸

Durante esta etapa, comienza la expresión y secreción de proteínas esenciales como la tuftelina, la sialofosfoproteína dentinaria y la ATPasa dependiente de calcio, lo que marca el inicio de la formación del esmalte.²⁹

2. Etapa de organización (ameloblasto joven)

Esta etapa coincide con el período de campana del desarrollo dental. Las células del epitelio interno del esmalte inducen mediante la producción de TGF- β a las células mesenquimáticas adyacentes a diferenciarse en odontoblastos. Los ameloblastos en esta fase cambian de forma: se alargan, polarizan sus organelas hacia el extremo distal y se alinean estrechamente entre sí mediante complejos de unión. Esta etapa coincide con el inicio de la secreción de dentina por los odontoblastos, lo que provoca una inversión en la corriente de nutrición de los ameloblastos, quienes pasan a depender de los capilares del saco dentario en lugar de la papila dental.¹

3. Etapa formativa o de secreción (ameloblasto activo)

En esta etapa, los ameloblastos pierden la capacidad de dividirse por mitosis. Son células cilíndricas de aproximadamente 60 μm de altura, con un citoplasma fuertemente basófilo y un núcleo ubicado en el polo distal, opuesto a la futura UAD. Los ameloblastos secretores

contienen vesículas conocidas como cuerpos ameloblásticos o adamantinos, que son formaciones granulares precursoras de la matriz orgánica del esmalte. Estas vesículas se liberan contra la dentina recién formada, permitiendo la secreción de proteínas del esmalte y la aparición casi simultánea de cristales inorgánicos.

En el proceso de secreción, los cristales de hidroxiapatita del esmalte recién formado se interdigitan con los cristales de la dentina subyacente. El ameloblasto desarrolla una proyección cónica conocida como proceso de Tomes, responsable de la organización de los prismas del esmalte y de la disposición de los cristales dentro de ellos.^{1,30}

4. Etapa de maduración

La maduración ocurre después de que se ha formado la mayor parte del espesor de la matriz del esmalte en las áreas oclusales o incisales. Durante esta fase, los ameloblastos disminuyen ligeramente su tamaño y el proceso de Tomes desaparece. En su lugar, aparecen microvellosidades e invaginaciones tubulares en el polo proximal de los ameloblastos, similares a las estructuras observadas en los osteoclastos, lo que sugiere que estas células tienen funciones absorptivas en esta etapa.

Estas invaginaciones permiten la eliminación del agua y de gran parte de la matriz orgánica del esmalte, facilitando el aumento del componente inorgánico, principalmente cristales de hidroxiapatita. De esta manera, el esmalte adquiere su configuración madura, con un mayor porcentaje de mineralización que en las fases previas.³¹

5. Periodo de protección

Cuando el esmalte ha alcanzado su mineralización completa, los ameloblastos entran en una fase de regresión. Estas capas celulares se fusionan para formar el epitelio reducido del esmalte, cuya principal función es proteger el esmalte recién formado y mineralizado del tejido conectivo subyacente hasta el momento de la erupción del diente.

Antes de completar su función, los ameloblastos secretan la cutícula primaria, también conocida como la membrana de Nasmyth, que recubre la superficie del esmalte en desarrollo y desempeña un papel protector temporal.

6. Etapa desmólitica

La última fase de la vida de los ameloblastos es la etapa desmólitica, durante la cual el epitelio reducido del esmalte prolifera e induce la atrofia del tejido conectivo que lo separa del epitelio bucal. Este proceso facilita la fusión entre ambos epitelios, lo que permite que el diente en desarrollo pueda erupcionar a través de la encía sin generar una respuesta inflamatoria significativa.¹

Formación y maduración de la matriz

Secreción de la matriz orgánica

Durante la etapa avanzada de campana, la primera capa de predentina induce la diferenciación de los ameloblastos secretores, lo que lleva a la secreción del componente orgánico del esmalte. Los procesos de síntesis y secreción de la matriz en los ameloblastos son similares a los observados en otras células secretoras:

- a) Síntesis de sustancias de bajo peso molecular en el retículo endoplasmático rugoso.
- b) Concentración de estas sustancias en el complejo de Golgi.
- c) Formación de gránulos secretorios, conocidos como cuerpos adamantinos.
- d) Fusión de los cuerpos adamantinos y formación de vesículas apicales.
- e) Secreción por exocitosis de los cuerpos adamantinos o ameloblásticos.

La secreción de la matriz por los ameloblastos ocurre a un ritmo de aproximadamente 4 μ m diarios y el desplazamiento del ameloblasto hacia la periferia es continuo a medida que se secreta la matriz. Sin embargo, esta secreción es rítmica, lo que da lugar a la formación de estrías transversales en los prismas del esmalte, conocidas como las líneas de Retzius.³²

Componentes de la matriz orgánica

Inicialmente, se depositan la tuftelina y la sialofosfoproteína dentinaria en la UAD, marcando el comienzo del proceso de mineralización.^{29, 31} Posteriormente, los ameloblastos segregan las amelogeninas, que constituyen el 90% de la materia orgánica del esmalte en desarrollo. A medida que el esmalte se forma, se añaden proteínas como la enamulina y la ameloblastina, junto con enzimas proteolíticas clave como las metaloproteinasas. Otras enzimas presentes en la matriz orgánica incluyen la fosfatasa alcalina, la ATPasa dependiente del calcio y la anhidrasa carbónica, que también juegan un papel en la regulación del proceso de mineralización.¹

En el esmalte recién formado, el contenido proteico es alto, alcanzando aproximadamente un 20%. Sin embargo, en el esmalte maduro, este contenido disminuye significativamente a un 0,36% a medida que los componentes orgánicos son eliminados por las proteasas durante la maduración.¹⁵

Mineralización de la matriz orgánica

La mineralización inicial del esmalte ocurre en la UAD, donde se depositan los primeros cristales de hidroxiapatita. Estos cristales crecen longitudinalmente debido a la adición de iones en sus extremos terminales. Tanto la sialoproteína dentinaria como la tuftelina juegan un papel crucial en la nucleación y el crecimiento de estos cristales, facilitando su adhesión al componente mineral.

La maduración de la matriz, la cual consiste en la eliminación del componente orgánico es facilitada por la actividad enzimática de las metaloproteinasas y las proteasas de serina. Este proceso controlado permite el crecimiento continuo de los cristales a medida que el esmalte se mineraliza. Además, el estrato intermedio selecciona el paso de iones hacia los ameloblastos, proceso que está regulado por factores hormonales y vitamínicos. Deficiencias en vitaminas o alteraciones endocrinas pueden causar anomalías en la estructura del esmalte, afectando su formación y mineralización.¹

CEMENTO

El cemento es un tejido conectivo especializado, mineralizado y avascular que recubre las raíces anatómicas de los dientes. Está en continuidad con el ligamento periodontal en su superficie externa y con la dentina en su superficie interna. Su color es amarillo pálido, y su estructura es más suave y permeable que la dentina. El grosor del cemento varía desde 10-15 μm en la porción cervical hasta 200 μm en la porción apical.²

Composición

El componente inorgánico del cemento conforma un 45-50% en volumen, mayormente compuesto por cristales de hidroxiapatita. La matriz orgánica representa aproximadamente un 33% del cemento, mientras que el agua constituye alrededor de un 22%. La matriz orgánica está compuesta principalmente por colágeno tipo I, con menores cantidades de colágeno tipo III, V, VI y XII. También se encuentran proteínas no colágenas, como la sialoproteína,

osteopontina, sialoproteína dentinaria, fibronectina y tenascina. La proteína de unión derivada del cemento es exclusiva del cemento y actúa como molécula de adhesión (Figura 7).³³

Formación

La formación de dentina y cemento en la raíz de un diente en desarrollo está condicionada por la vaina radicular de Hertwig. Esta estructura epitelial se extiende en dirección apical y, en su extremo distal, origina el diafragma epitelial. A medida que la vaina envuelve la papila dental en expansión, induce a las células de su periferia a diferenciarse en odontoblastos, que secretan la matriz orgánica de la dentina radicular. Cuando la predentina alcanza un espesor de 4 a 5 μm , inicia su mineralización. Al avanzar este proceso, se interrumpe el aporte nutricional de la papila a las células epiteliales, lo que provoca la fragmentación de la vaina radicular y la formación de una red fenestrada. Los restos de estas células epiteliales persisten en el adulto como los restos epiteliales de Malassez.

La ruptura de la vaina involucra la degeneración de la lámina basal en la cara cementaria; al volverse discontinua, es sustituida por una capa de material amorfo con finas fibrillas orientadas al azar, las cuales participarán en la formación de la zona hialina entre el cemento y la dentina. A través de los poros de esta red epitelial, migran células ectomesénquimáticas indiferenciadas procedentes del folículo dentario, que se sitúan en íntima aposición a la capa hialina de la superficie radicular. Estas células aumentan su volumen y desarrollan los orgánulos característicos de las células productoras de proteína, diferenciándose en cementoblastos, que depositan la matriz orgánica del cemento.²

La mineralización del cemento, al igual que la de otros tejidos duros, es un proceso altamente regulado. Proteínas como las morfogenéticas óseas (BMPs), prostaglandinas, osteopontina y la proteína de la matriz ósea (BSP) intervienen en la diferenciación de los cementoblastos,

mientras que factores como la osteocalcina, la osteopontina y la fosfatasa alcalina modulan la cristalización mineral del cemento.

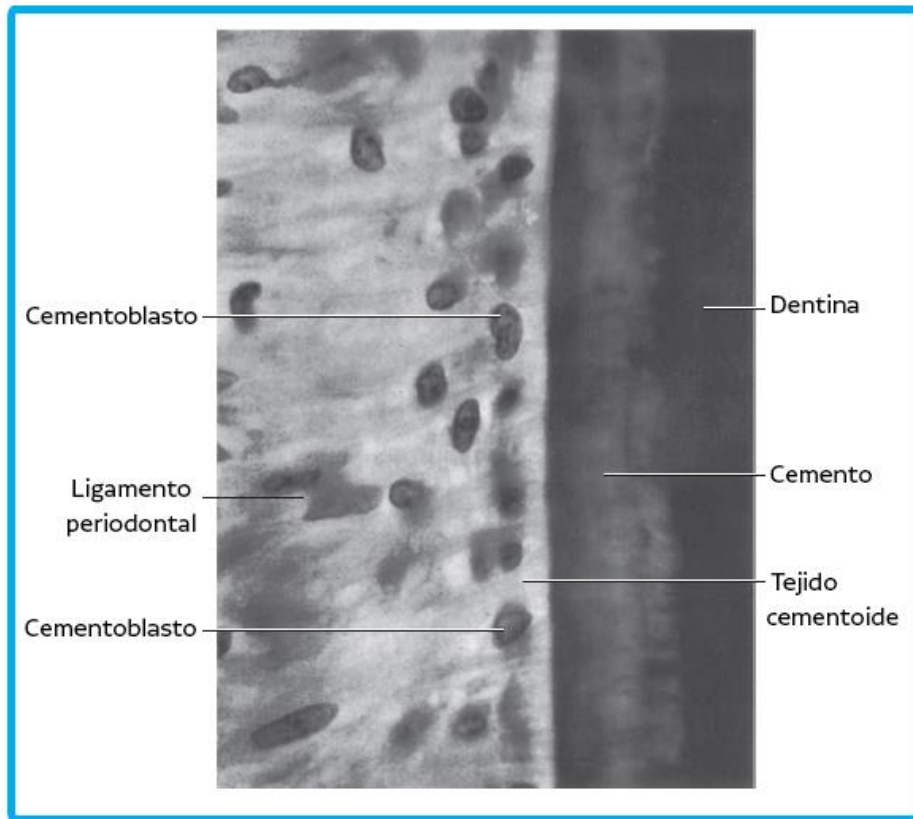


Figura 7. Corte histológico de cemento. Modificado de Kumar, 2019.

Estructura

El cemento se clasifica en dos tipos principales: cemento acelular (sin cementocitos) y cemento celular (con cementocitos). Las fibras extrínsecas del cemento, conocidas como fibras de Sharpey, son las porciones insertadas de las fibras principales del ligamento periodontal, mientras que las fibras producidas por los cementoblastos se denominan fibras intrínsecas. Los cementocitos, atrapados en el cemento celular, son similares a los osteocitos en su ubicación dentro de lagunas y la presencia de canalículos, aunque los canalículos en los cementocitos están orientados hacia el ligamento periodontal. La unión entre el cemento y la dentina en la raíz se denomina conexión cementodentinaria, y las líneas incrementales del cemento se llaman líneas de Salter.¹

Función

La función principal del cemento es proporcionar una superficie para la fijación de las fibras del ligamento periodontal, facilitando la inserción del diente en el alveolo. La formación continua de cemento mantiene el ancho del ligamento periodontal, contribuyendo a la estabilidad dental. A diferencia del hueso, el cemento es avascular, lo que le otorga una mayor resistencia a la reabsorción, factor crucial en los movimientos ortodónticos. El cemento se deposita de manera lenta y constante a lo largo de la vida, sin experimentar remodelación ni presentar características laminares ni espacios medulares.

PERIODONTO

El periodonto es el conjunto de tejidos que forman el sistema de soporte y protección del diente, crucial para su función dentro del aparato masticatorio. El periodonto de inserción está compuesto por el cemento, el ligamento periodontal y el hueso alveolar.³⁴ El cemento es el tejido conectivo mineralizado que recubre las raíces de los dientes y se encuentra en contacto directo con la dentina radicular. Aunque su función principal es proporcionar una superficie de anclaje para las fibras del ligamento periodontal, también forma parte estructural de la pieza dentaria

El hueso alveolar es la porción del hueso maxilar o mandibular que forma y rodea los alveolos dentales. Este hueso es una estructura odontodependiente, lo que significa que su formación y mantenimiento dependen de la presencia del diente. Cuando un diente se pierde, el hueso alveolar sufre un proceso de resorción, lo que disminuye su altura y volumen. Está compuesto por una fina capa de hueso compacto que se denomina lámina cribosa o hueso alveolar propio en la pared interna, mientras que la pared externa se denomina lámina perióstica, también de tejido óseo compacto. Entre ambas láminas se encuentra tejido óseo esponjoso, y la unión de las láminas compactas da lugar a la cresta alveolar, que es la primera área en sufrir resorción ósea en caso de enfermedad periodontal.³⁵

El ligamento periodontal es un tejido conectivo fibroso que une el cemento del diente con el hueso alveolar. Este tejido es fundamental para soportar las fuerzas generadas durante la masticación y para mantener el diente en su posición dentro del alveolo. Las fibras que lo conforman, principalmente colágenas, están organizadas de forma oblicua entre el hueso y el cemento. Esta disposición permite que las fibras soporten tensiones mecánicas, al tiempo que

mantienen su integridad funcional a través de una continua remodelación de las fibras individuales.¹

El periodonto de protección se compone de la encía y la unión dentogingival, que cubren y protegen el periodonto de inserción del medio externo. La encía rodea el cuello del diente y se une a él mediante la unión dentogingival, creando una barrera que previene la entrada de agentes patógenos al periodonto de inserción.

ODONTOMORFOGENESIS

El desarrollo de los dientes comienza a partir de brotes epiteliales que se ubican de manera precisa en la mandíbula y el maxilar. Dos capas germinativas principales están involucradas en la formación de los dientes: el epitelio ectodérmico, que da origen al esmalte, y el ectomesénquima, responsable de formar los demás tejidos, como el complejo dentinopulpar, el cemento, el ligamento periodontal y el hueso alveolar. Este proceso se basa en la interacción epitelio-mesénquima, una relación crucial que regula el desarrollo de las piezas dentarias.

La morfogénesis, que abarca la formación y desarrollo de las coronas y raíces dentales, es el resultado de la división celular, su desplazamiento y la organización de las poblaciones celulares epiteliales y mesenquimatosas. El proceso inicia con la formación de la lámina dental, que se origina del ectodermo que reviste la cavidad bucal primitiva. Esta lámina da lugar a dos estructuras: la lámina vestibular y la lámina dentaria.

El desarrollo de los gérmenes dentales atraviesa varias etapas bien definidas, que se conocen según su morfología como: estadio de brote o yema, estadio de casquete, estadio de campana y finalmente el estadio de folículo dentario (Figura 8). Durante este proceso, se lleva a cabo la histogénesis o citodiferenciación, que da lugar a la formación de los distintos tejidos dentales: el esmalte, la dentina, la pulpa y el cemento radicular.¹⁵

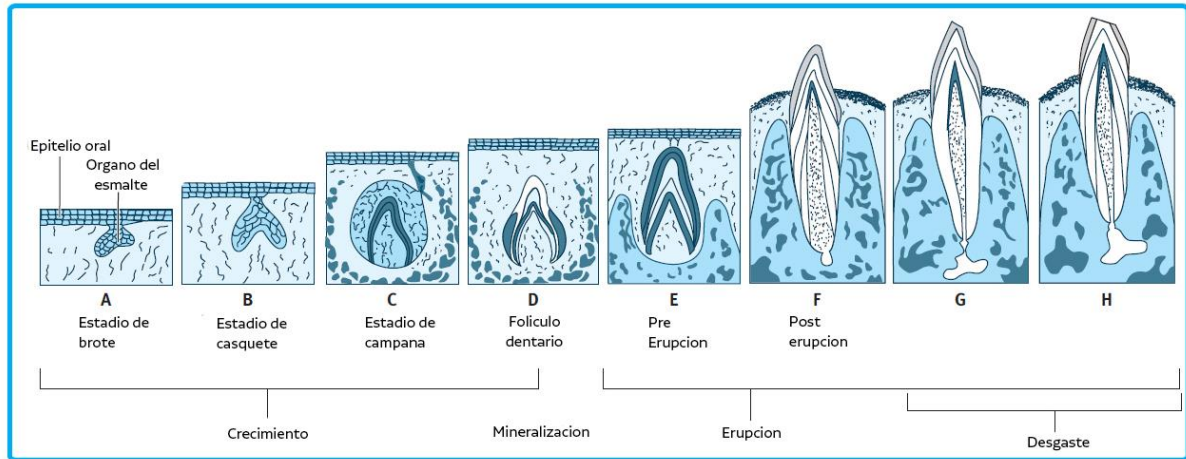


Figura 8. Embriología dentaria. Modificado de Kumar, 2019.

Cada parte del germen dental dará lugar a diferentes estructuras del diente:

Órgano del esmalte: de origen ectodérmico, es el responsable de la formación del esmalte y el epitelio dental reducido.

Papila dental: de origen ectomesenquimático, se diferenciará en el órgano dentino-pulpar (Figura 9).

Saco dentario: también de origen ectomesenquimático, dará lugar al periodonto de inserción, que incluye el cemento, el ligamento periodontal y el hueso alveolar.

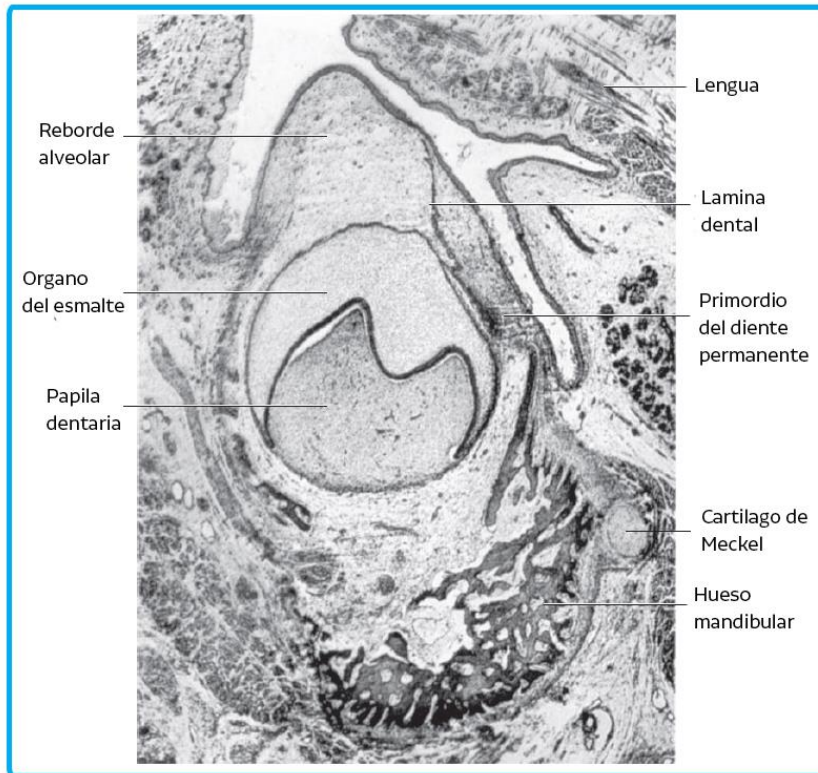


Figura 9. Pieza dental en desarrollo. Modificado de Kumar, 2019.

A lo largo del desarrollo dental, múltiples moléculas y factores de crecimiento regulan cada etapa de este proceso. Entre los más importantes se encuentran BMPs, los factores de crecimiento fibroblásticos (FGFs), las proteínas Hedgehog (Shh) y las proteínas Wnt. Estos componentes juegan un papel clave en la interacción epitelio-mesénquima y en la regulación de genes como *Msx-1*, *Msx-2*, *Lef1*, *Pax9* y *Barx1*, que son esenciales para el desarrollo morfogénico de las piezas dentarias (Figura 10).²

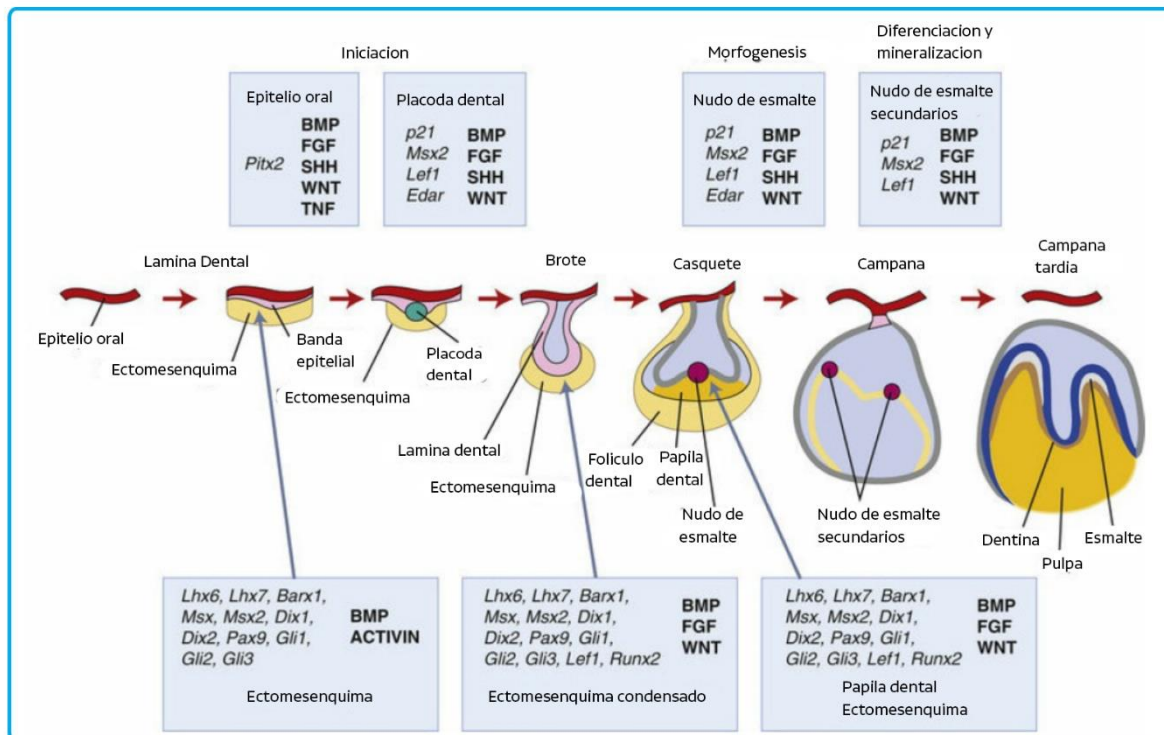


Figura 10. Señales moleculares durante el desarrollo de las coronas dentarias. Factores de transcripción (cursiva) y moléculas (negrita) que participan en el proceso. Modificado de Junqueira & Carneiro, 2013.

4.2 TEJIDO OSEO

TEJIDO OSEO - GENERALIDADES

El hueso es un tejido conectivo mineralizado relativamente flexible y resistente a la compresión. La propiedad de plasticidad le permite remodelarse según las demandas funcionales que se le imponen.³⁶

Clasificación de los huesos

Los huesos se clasifican como largos, cortos, planos e irregulares según su forma. También se denominan maduros, inmaduros, compactos y esponjosos según la estructura microscópica.³⁷ Según su desarrollo, los huesos se clasifican como endocondrales e intramembranosos.³⁸

Composición e histología de los huesos

El componente mineral del hueso está compuesto principalmente por cristales de hidroxiapatita. El componente orgánico está compuesto mayormente por colágeno tipo I, seguido de colágeno tipo V y proteínas no colágenas. Osteocalcina, osteopontina, proteína sialoproteica y osteonectina son las principales proteínas no colágenas presentes en el hueso.³⁹

Todos los huesos están formados por un hueso compacto externo y trabecular/esponjoso interno donde se ubica la médula ósea. La parte externa del hueso compacto está rodeada por el periostio. La superficie interna del hueso compacto y esponjoso está cubierta por el endostio (Figura 11).

El osteón/sistema de Havers es la unidad estructural básica del hueso, compuesta por un canal de Havers central rodeado por láminas concéntricas (Figura 11). Las láminas circunferenciales están presentes en las superficies periostal y endostal en capas paralelas. Los sistemas de Havers adyacentes están conectados por los canales de Volkmann. Se observan líneas de descanso que aparecen regularmente, que indican el período de descanso en su aposición, y líneas de reversión que aparecen irregularmente, que indican la transición entre la resorción y la formación ósea.⁴⁰

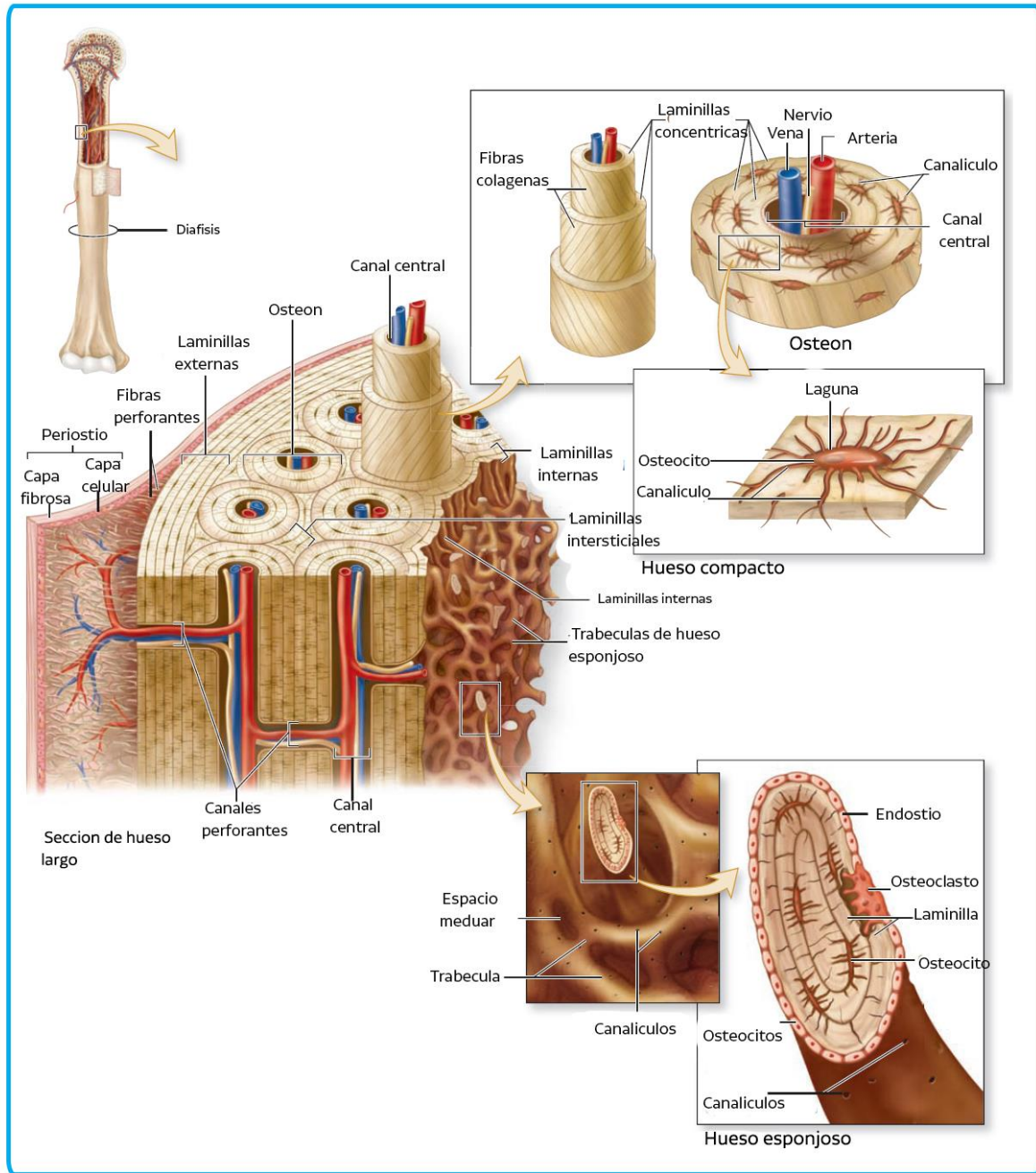


Figura 11. Esquema de hueso. Modificado de Junqueira & Carneiro, 2013.

Células del hueso

Las células en el hueso son: células de recubrimiento óseo, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. Los osteoblastos son células cúbicas que tienen todas las organelas para la síntesis de proteínas. Los osteoblastos secretan los componentes orgánicos de la matriz ósea. Un factor de transcripción esencial para la diferenciación de los osteoblastos es RUNX2. La actividad de los osteoblastos está regulada por hormonas como la PTH, 1,25(OH)₂D₃

(vitamina D), hormona del crecimiento e insulina. Otros factores son BMPs, factores de crecimiento insulínico 1 y 2 (IGF-1 y 2), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Después de completar la función, los osteoblastos permanecen en la superficie como células de revestimiento o quedan atrapados dentro de la matriz, convirtiéndose en osteocitos.⁴¹

Los osteocitos tienen un sistema interconectado a través de canaliculos con los osteoblastos que los cubren y los osteocitos vecinos, manteniendo así la vitalidad e integridad del hueso. Los osteoclastos son las células que resorben el hueso derivadas de células hemopoyéticas de la línea monocito-macrófago. Aparecen como células gigantes multinucleadas y ocupan cavidades en la superficie del hueso llamadas lagunas de Howship. Desarrollan un borde festoneado asociado a una zona carente de organelas y membrana plasmática lisa llamada zona de sellado en los bordes de la superficie de resorción del hueso. RANKL y factor estimulante de colonia de macrófagos (M-CSF) secretados por los osteoblastos y las células estromales son necesarios para la formación de los osteoclastos. La interacción entre RANKL y RANK en la superficie de los precursores de osteoclastos es necesaria para la diferenciación de la célula.⁴²

Los factores que regulan la actividad de los osteoclastos son el estrógeno, la PTH, la 1,25(OH)2D3 (vitamina D) y la calcitonina (Figura 12).

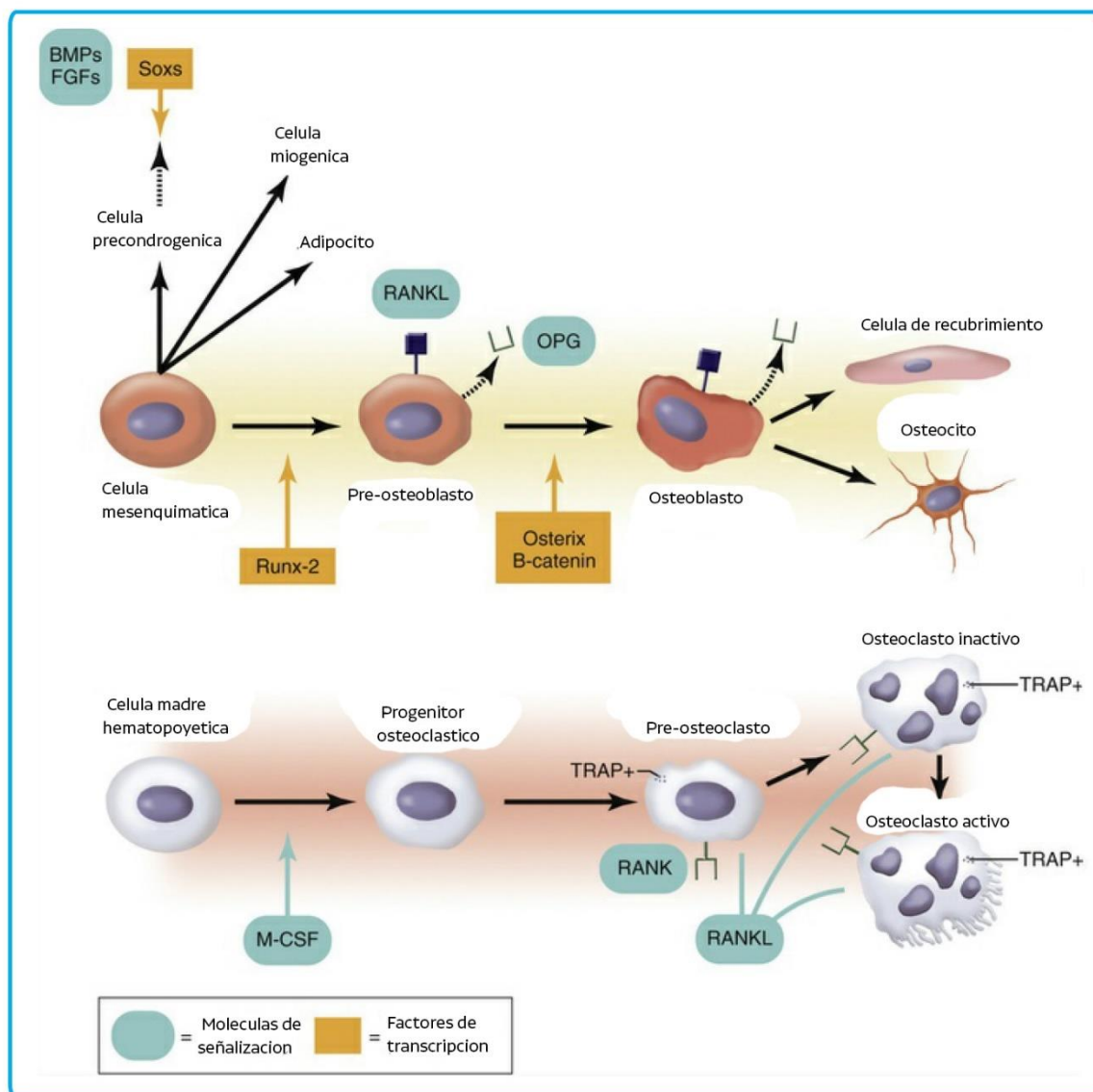


Figura 12. Origen de las células óseas. Modificado de Cate, 2018.

Formación del hueso

La formación ósea puede ser intramembranosa o endocondral. En la formación intramembranosa, el hueso se forma directamente dentro de una membrana vascular y fibrosa. La formación ósea endocondral está precedida por la formación de un modelo cartilaginoso hialino que es reemplazado por hueso.

En la formación ósea intramembranosa, las espículas óseas que se forman inicialmente crecen y se unen para formar trabéculas, que se extienden en dirección radial rodeando los vasos sanguíneos. Este hueso inmaduro se llama hueso reticular o primario. Tiene fibras de colágeno entrelazadas y una densidad mineral más baja en comparación con el hueso maduro

llamado hueso laminar, que tiene un arreglo ordenado de fibras de colágeno y un mayor contenido mineral (Figura 13).⁴³

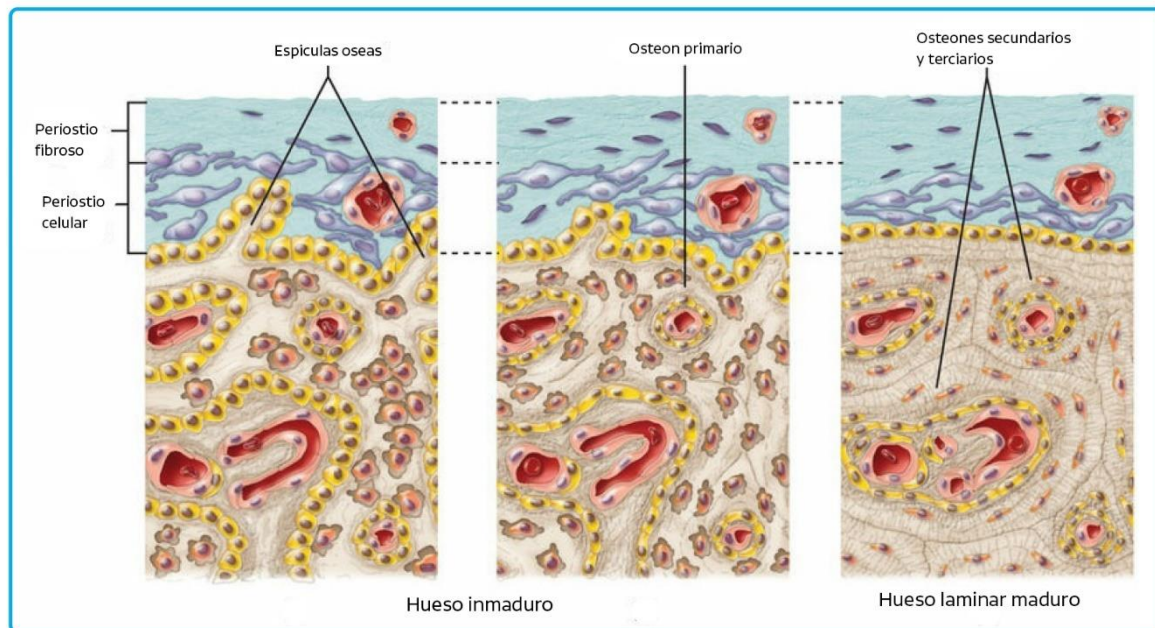


Figura 13. Osificación intramembranosa. Modificado de Cate, 2018.

En la formación ósea endocondral (Figura 14), el cartílago crece mediante el crecimiento intersticial y de aposición. Los capilares crecen en el cartílago y la capa celular interna del pericondrio cambia su comportamiento hacia periostio donde células osteoprogenitoras se diferencian en osteoblastos que forman hueso, formando el “manguito óseo”. Posteriormente vasos sanguíneos del periostio (brote perióstico) ingresan al interior del cartílago arrastrando consigo células osteoprogenitoras y formando el centro de osificación primaria. La cavidad medular se produce por la resorción osteoclástica y luego se forman los centros de osificación secundarios donde persistirá en los extremos restos de cartílago hialino en la superficie de la epífisis y cartílago metafisiario (cartílago de crecimiento). La calcificación ósea se explica mediante tres teorías principales: nucleación de cristales, vesículas de matriz y actividad de la fosfatasa alcalina. En este proceso intervienen fosfoproteínas como la osteonectina, que facilitan la cristalización del mineral dentro de la matriz ósea.⁴⁴

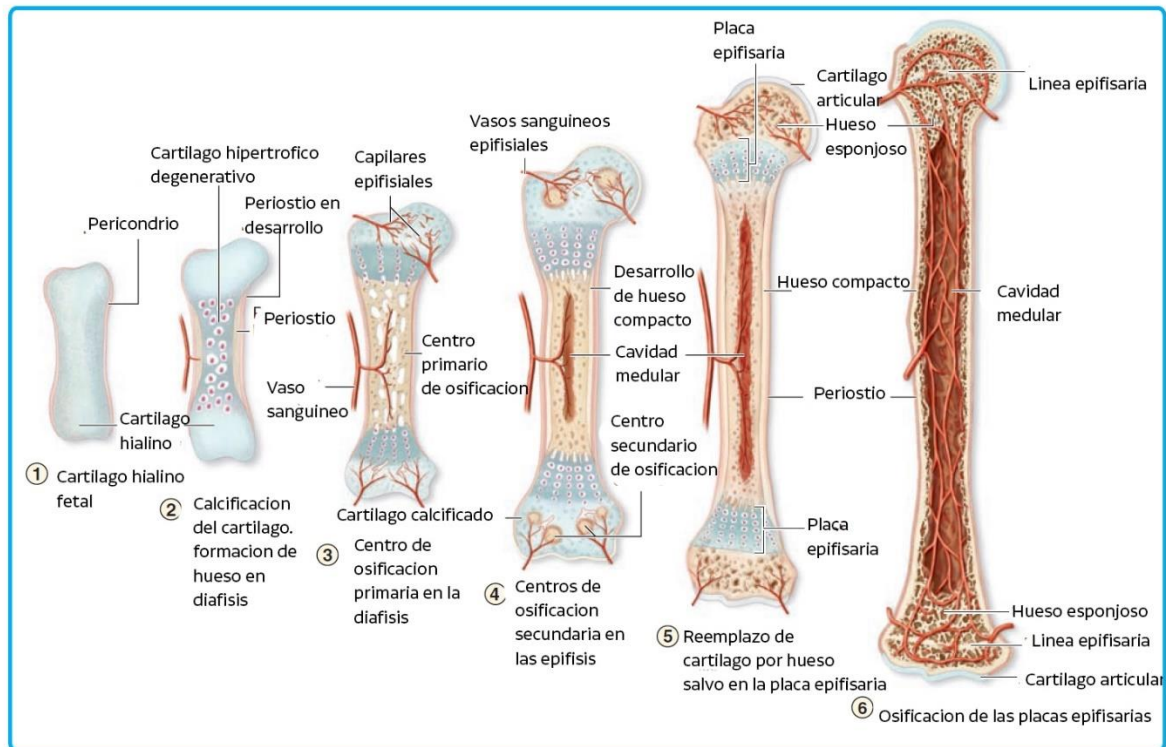


Figura 14. Osificación endocondral. Modificado de Junqueira & Carneiro, 2013.

Resorción

La resorción ósea es llevada a cabo por los osteoclastos, siendo la enzima fosfatasa ácida tartrato resistente clave en ese proceso. El ácido clorhídrico liberado por el osteoclasto disuelve la apatita y la matriz orgánica es eliminada por enzimas proteolíticas como la catepsina-K. Las partículas orgánicas e inorgánicas libres son endocitadas por el osteoclasto, empaquetadas en vesículas con membrana y liberadas por exocitosis. TRAP ayuda en la regulación de la adhesión del osteoclasto al hueso, su migración a sitios adyacentes y también se fusiona con el material resorbido dentro del osteoclasto para su disposición posterior.⁴⁵

Remodelación ósea

Para mantener la estabilidad e integridad del hueso, este sufre constantemente remodelación. Alrededor del 10% del material óseo se renueva cada año. Este proceso es llevado a cabo por los osteoclastos y osteoblastos. Luego de que cesa la actividad de los osteoclastos, los osteoblastos depositan hueso formando nuevos sistemas de Havers. La PTH, la 1,25(OH)2D3 (vitamina D), y factores de crecimiento son mediadores importantes de la remodelación ósea.⁴⁶

MANDIBULA

La mandíbula es un hueso facial que forma la parte inferior de la estructura ósea de la cabeza, se encuentra debajo de la maxila (hueso superior de la mandíbula) y constituye la base de la boca. Tiene forma de arco, con dos ramas que se extienden hacia atrás desde el cuerpo principal del hueso, formando las articulaciones temporomandibulares. La mandíbula alberga los dientes inferiores en sus alvéolos dentales.³⁷

Está compuesta por mayor cantidad de hueso compacto para soportar más peso y fuerza, como el cuerpo de la mandíbula, y mayor cantidad de hueso esponjoso en las áreas menos estresadas, como las ramas.⁴⁷

La mandíbula se articula con el hueso temporal del cráneo a través de las articulaciones temporomandibulares (ATM). Esta articulación permite movimientos de apertura y cierre de la boca, así como movimientos de lado a lado y hacia adelante.⁴⁸

Presenta principalmente una osificación directa/intramembranosa. Este tipo de osificación es más evidente durante la infancia y la adolescencia, cuando la mandíbula está en proceso de desarrollo y crecimiento para adaptarse al tamaño y la forma de la cabeza en crecimiento.

El cóndilo de la mandíbula es una estructura anatómica que forma parte de la articulación temporomandibular, que conecta la mandíbula con el cráneo. Los cóndilos mandibulares son las protuberancias óseas redondeadas en la parte superior de las ramas de la mandíbula. Están situados justo delante del proceso coronoides y son fundamentales para la función de la mandíbula, ya que articulan con las cavidades glenoideas del hueso temporal para permitir el movimiento de la mandíbula.⁴⁹

Los cóndilos mandibulares están recubiertos por una capa de cartílago articular que ayuda a amortiguar y facilitar el movimiento de la mandíbula.

Los cóndilos mandibulares presentan un tipo de crecimiento endocondral, donde el cartílago en el extremo del cóndilo se convierte en hueso nuevo, lo que contribuye al aumento en su longitud y tamaño. Este crecimiento puede continuar hasta la edad adulta temprana, momento en el cual se completa la mayor parte del desarrollo facial.

HUESO ALVEOLAR

El hueso alveolar es parte de los huesos de los maxilares y se relaciona directamente con las piezas dentarias. Se clasifica como hueso alveolar propiamente dicho y hueso alveolar de soporte.

El hueso alveolar propiamente dicho está compuesto por hueso compacto que se denomina también lámina cribosa. En la lámina cribosa, se insertan las fibras del ligamento periodontal denominadas fibras de Sharpey. Se denomina también placa cribiforme porque muchos vasos y nervios lo penetran. Radiográficamente, también se le llama lámina dura debido a su mayor radiodensidad debido al aumento del grosor óseo.¹

El hueso alveolar de soporte consta de placas corticales y hueso esponjoso. La disposición de las trabéculas en el hueso esponjoso es de dos tipos: un tipo I dispuesto regularmente y un tipo II dispuesto irregularmente.

La plasticidad del hueso permite el movimiento ortodóntico. El hueso se reabsorbe en el lado de presión y se deposita en el lado de tensión.⁵⁰

MANDIBULA DE LA RATA

La rata es uno de los modelos animales más comunes en la investigación biomédica debido a su bajo costo y fácil manejo. Sus características anatómicas y fisiológicas permiten extrapolar los hallazgos de sus estudios a humanos, brindando una base comparativa valiosa para comprender las patologías y tratamientos que afectan estructuras anatómicas similares en ambos. La mandíbula de la rata (Figura 15) ha sido ampliamente empleada en investigaciones sobre regeneración ósea, implantología y desarrollo de biomateriales, pues sus patrones de crecimiento y remodelación ósea tienen paralelismos relevantes con los del ser humano.^{51 52} Además, la mandíbula de la rata es un modelo eficaz para estudiar el impacto de variables como el estado nutricional, envejecimiento y desgaste oclusal en el sistema masticatorio, siendo una referencia confiable para evaluar la salud ósea y dental en estudios preclínicos.⁵³

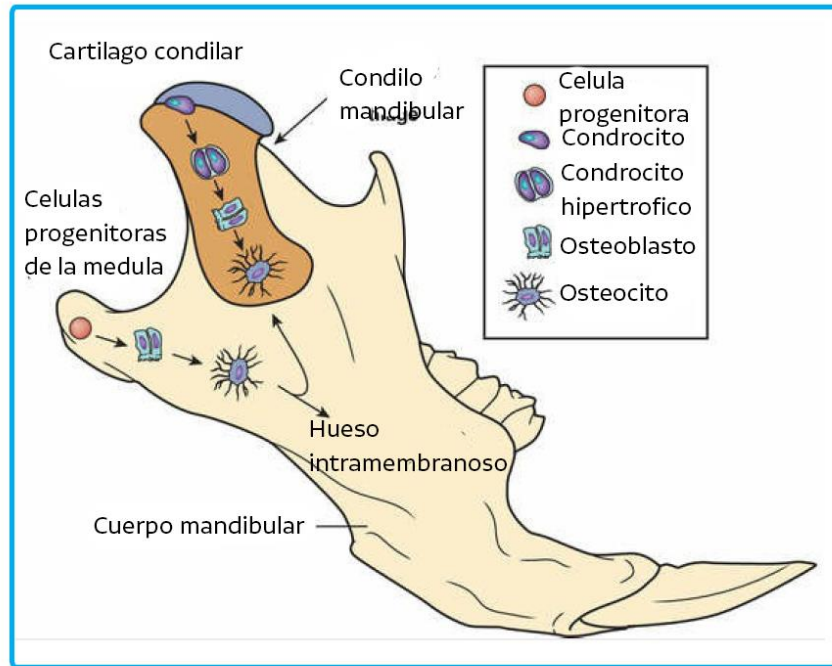


Figura 15. Mandíbula de la rata y sus dos tipos de osificación. Modificado de Cate, 2018.

En el caso de la mandíbula humana, se trata de un hueso único, en forma de U, que proporciona soporte estructural y funcional a la cavidad oral y a la articulación temporomandibular, que conecta la mandíbula con el cráneo y facilita la movilidad de la boca.⁵⁴ A diferencia de la estructura mandibular humana, que es una única pieza resultante de la fusión embrionaria de dos mitades, la mandíbula de la rata está dividida en dos partes independientes, lo que permite hablar de una “mandíbula derecha” y una “mandíbula izquierda”. Esta disposición anatómica es una de las características que diferencia la mandíbula de la rata de la del humano, junto con la morfología del proceso condilar y la disposición dental.^{55,56}

Cada segmento mandibular de la rata presenta un incisivo grande que crece continuamente, y tres molares, en contraste con los dientes permanentes del humano. El diastema entre el incisivo y los molares en la rata, así como la localización posterior del foramen mentoniano, son particularidades anatómicas significativas en el modelo roedor (Figura 16). Estas estructuras permiten a la rata una función masticatoria adaptada a su dieta y comportamiento, lo que, en combinación con otras similitudes en el desarrollo y remodelación ósea, facilita su uso en estudios odontológicos y médicos.^{57,58}

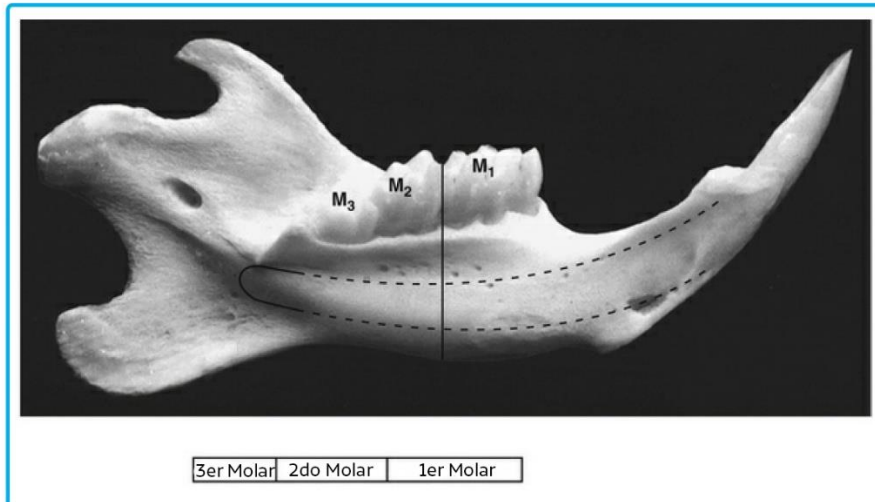


Figura 16. Mandíbula de la rata y sus molares. Modificado de Cate, 2018.

4.3 CAFEÍNA

La cafeína (1,3,7-trimethylxanthine) es un alcaloide derivado de xantinas e identificado en el café, mate, té, gaseosas, bebidas energizantes, chocolates, entre otros, ampliamente consumido en la dieta humana (Figura 17). Produce un amplio rango de efectos fisiológicos, incluidos la estimulación del sistema nervioso central, hiperactividad, aumento del estado de alerta, diuresis, y estimulación del músculo cardiaco.

Los granos de café contienen antioxidantes como ácido clorogénico, ácidos fenólicos, polifenoles y alcaloides.⁵⁹



Figura 17. Granos de café y molécula de cafeína

CONSUMO DE CAFEINA

La cafeína se encuentra de forma natural en plantas como *Coffea arabica*, *Coffea robusta*, *Thea sinensis*, *Theobroma cacao*, *Cola acuminata* e *Ilex paraguariensis* (yerba mate), y está

presente en una amplia variedad de bebidas, incluyendo café, té, mate, refrescos carbonatados y bebidas energéticas (**iError! No se encuentra el origen de la referencia.**).

Las ingestas de 20-200 mg día están asociadas con efectos 'positivos' en el estado de ánimo, como alerta, eficiencia, energía, concentración y motivación para trabajar. Cantidades moderadas de cafeína (200-500 mg día) pueden provocar dolores de cabeza, temblores, nerviosismo e irritabilidad. El cafeinismo es un síndrome relacionado con el consumo excesivo de cafeína descrito con ingestas diarias de más de 1000 mg de cafeína. Presenta efectos cardiovasculares, gastrointestinales y neuropsiquiátricos típicos.⁶⁰

La ingesta de bebidas con cafeína está ampliamente distribuida entre la población argentina. El 98% de los niños y adolescentes (de 2 a 20 años) y casi el 100% de los adultos consumen cafeína de diferentes fuentes. La ingesta media de cafeína para adultos es de 288 mg/día (4,4 mg/kg/día). La ingesta de cafeína entre adultos es mayor en comparación con los datos reportados para países como Estados Unidos: 193 mg/día.

A pesar de que el café tiene los valores más altos de cafeína, el mate es el principal contribuyente a la ingesta total de cafeína entre la población adulta argentina. Aproximadamente el 75% de la población consume la infusión, y su consumo representa el 50% de la ingesta total de cafeína, seguido por el café con el 36%.

La ingesta media de cafeína para niños de 2 a 10 años es de 35 mg al día (1,3 mg/kg/día), para niños de 11 a 15 años es de 120 mg al día (2,3 mg/kg/día), y para adolescentes (16-20 años) es de 240 mg al día (4,1 mg/kg/día).⁶¹

El mate es una bebida popular entre los niños y adolescentes argentinos; el 42% del grupo de edad de 11 a 20 años suele tomar la infusión diariamente. El mate también es la principal fuente de cafeína entre los niños de 11 a 15 años y para los adolescentes de 16 a 20 años (32 y 50% de la ingesta total de cafeína, respectivamente).

Una taza de 250 mL de café tiene hasta 200 mg de cafeína, mientras que un café expreso puede tener hasta 75mg de cafeína.⁶²

Tabla 1. Concentración de cafeína de diferentes bebidas y preparaciones. Modificado de Ref 61

Concentración de cafeína de diferentes bebidas y preparaciones					
Bebida	Concentración (mg/mL-1)		Cantidad (mg) por porción		ml por porción
	Mean (SD)	Rango	Mean (SD)	Rango	
Café					
Regular (espresso)	0,78 (0,31)	0,46-1,59	93,6 (28,3)	59,7-158,9	200
Instantáneo	0,41 (0,16)	0,21-0,44	95,2 (42,8)	48,2-159,9	200
Saquito de café	0,47 (0,04)	0,42-0,52	53,7 (15,0)	42,1-78,2	150
Máquina eléctrica	0,39 (0,07)	0,26-0,53	86,4 (16,5)	58,6-121,8	220
Café con leche	0,22 (0,14)	0,10-0,35	54,9 (37,2)	22,7-87,2	150
Café corto	1,38 (0,68)	0,73-2,76	90,7 (25,1)	60,6-132,7	45
Te					
Saquito de te	0,12 (0,03)	0,08-0,17	24,8 (7,4)	16,0-36,3	200
Hojas de te	0,27 (0,04)	0,22-0,33	55,0 (8,9)	45,3-68,3	200
Mate					
Saquito de mate	0,15 (0,02)	0,12-0,18	29,2 (4,3)	24,3-35,3	200
Hojas de mate	0,33 (0,03)	0,31-0,34	75,2 (5,8)	71,1-79,3	200
Otras bebidas					
Leche chocolatada	0,034 (0,005)	0,030-0,042	8,5 (1,3)	7,4-10,5	250
Bebidas carbonatadas	0,11 (0,01)	0,09-0,12	38,8 (4,6)	31,4-45,9	354
Bebidas carbonatadas dietéticas	0,13 (0,01)	0,12-0,14	45,7 (2,9)	43,1-51,1	354
Bebidas energizantes	0,28 (0,08)	0,17-0,36	70,7 (20,2)	42,6-93,3	250

FARMACOCINETICA y FARMACODINAMIA

La farmacocinética de la cafeína parece ser en gran medida independiente de la vía de administración. Tras la ingestión oral, la cafeína se absorbe rápida y completamente (el 99% en 45 minutos) alcanzando niveles máximos en plasma entre 30 y 60 minutos. Las concentraciones plasmáticas de 8-10 mg/mL se alcanzan después de dosis de 5-8 mg/kg, mientras que niveles plasmáticos de aproximadamente 3 mg/mL son típicamente observados con dosis más bajas, como consumir 2 tazas de café (~2 mg/kg).^{63,64}

Una vez absorbida, la cafeína se distribuye por todo el cuerpo y puede cruzar la barrera hematoencefálica, hemato-testicular, placentaria y encontrarse en la leche materna. La vida media de la cafeína es aproximadamente de 4 a 6 horas en adultos, pero puede verse afectada por numerosos factores, incluido el embarazo, la dieta, los medicamentos y el tabaquismo. La vida media plasmática en niños y adolescentes es más corta o comparable a la de los adultos. La cantidad de cafeína inalterada excretada en la orina es menos del 3%, lo que demuestra que la cafeína se metaboliza casi por completo.⁶⁵

Aproximadamente el 95% de la cafeína que ingresa al hígado se metaboliza a través de la enzima hepática citocromo P450 1A2 (CYP1A2), que la desmetila para producir el metabolito primario paraxantina (1,7-dimetilxantina). La fracción restante de cafeína se metaboliza por la xantina oxidasa (XO) y la N-acetil transferasa 2 (NAT2).⁶⁶ Los niños menores de 2 años parecen ser acetiladores lentos y los bebés hasta la edad de 8-9 meses tienen una capacidad de metabolizar la cafeína muy reducida, excretando aproximadamente un 85% de la cafeína administrada en la orina sin cambios.^{67,68}

La paraxantina también es biológicamente activa y tiene efectos análogos a la cafeína en todo el cuerpo, aunque puede tener concentraciones séricas más estables y una vida media plasmática similar o más larga. Los otros dos metabolitos de primer paso son la teobromina y la teofilina, que son estructuralmente análogos a la cafeína y también tienen vidas medias más largas.⁶⁹

Existen factores extrínsecos que pueden modificar la farmacocinética de la cafeína. Varios compuestos comunes (por ejemplo, alcohol, tabaco, anticonceptivos orales, antibióticos quinolónicos, ciertas verduras y jugo de naranja) y condiciones (por ejemplo, embarazo, enfermedad hepática) pueden llevar a alteraciones en la farmacocinética de la cafeína al inducir cambios en la actividad enzimática hepática. El metabolismo de la cafeína se ralentiza durante el embarazo y aumenta la vida media de la cafeína. En una revisión, Grosso y Bracken (2005) informaron que, hacia el final del embarazo, la vida media de la cafeína variaba de 11,5 a 18 horas. Esto se debe en parte al hecho de que ni la placenta ni el feto pueden metabolizar la cafeína y que el metabolismo materno de la cafeína se ve afectado debido a las reducciones en la actividad de las enzimas CYP1A2 y NAT2.⁷⁰

La cafeína tiene diferentes modos de acción, pero debido a que la cafeína es químicamente similar a la adenosina, el mecanismo de acción principal es la unión no específica a los receptores acoplados a proteínas G de adenosina, tanto presinápticos A₁ como postsinápticos A₂, que se encuentran en todo el cuerpo.⁷¹ La adenosina endógena es un mensajero que regula la actividad cerebral, actuando como neuromodulador en los receptores A₁ y A₂ para suprimir el estado de alerta.⁷² Debido a que la cafeína tiene una alta afinidad por estos receptores, bloquea la acción normal de la adenosina y las respuestas de alerta se incrementan. Por lo tanto, muchos de los efectos asociados con el uso de cafeína, adversos o no, ocurren al bloquear estos receptores (por ejemplo, aumentar la liberación de noradrenalina, serotonina y dopamina y aumentar la liberación de catecolaminas). Muchos

de los receptores que bloquea la cafeína se encuentran en los sistemas cardiovascular, respiratorio, renal y nervioso central y, por lo tanto, los efectos de la cafeína en esos sistemas se han estudiado comúnmente.

La cafeína también tiene efectos intracelulares, que pueden ser debido a eventos post-receptores o a interacciones directas con enzimas. La cafeína tiene la capacidad de movilizar reservas intracelulares de calcio e inhibir enzimas fosfodiesterasas, pero estos resultados solo pueden observarse en dosis de cafeína más altas que no se encuentran típicamente en la dieta. Un aumento del calcio intracelular puede mejorar la excitación neuromuscular y las contracciones musculares esqueléticas durante actividades de fuerza y puede explicar por qué los protocolos clínicos que evalúan los efectos de la cafeína sobre el rendimiento físico utilizan dosis más altas.⁶⁶

CAFEINA – ANTIOXIDANTE

El café es aceptado como una fuente rica en compuestos antioxidantes y de eliminación de radicales libres. El catabolismo de la cafeína en sistemas bacterianos y plantas genera alcaloides de purina, como la teobromina (3,7-dimetilxantina), teofilina (1,3-dimetilxantina), otras metilxantinas, xantina y finalmente ácido úrico. Los metabolitos de purina tienen un efecto de inhibición sobre la producción de radicales hidroxilos por la vía L-DOPA-Cu.⁷³

Modelos experimentales y estudios en humanos han demostrado, aunque con algunos resultados contrastantes, la atenuación de marcadores inflamatorios, como IL-6, TNF- α , IFN- γ , TNF- β , después de la administración de café. También se ha informado que la cafeína tiene la capacidad de inhibir la activación inducida de NF- κ B a través de mecanismos similares a los descritos para los ácidos clorogénicos.⁵⁹

CAFEINA Y SALUD

Toxicidad general

La toxicidad de la cafeína en adultos puede presentar un espectro de síntomas clínicos que van desde nerviosismo, irritabilidad e insomnio hasta trastornos sensoriales, diuresis, arritmia, taquicardia, aumento de la respiración y trastornos gastrointestinales. La toxicidad de la cafeína en niños se manifiesta por vómitos graves, taquicardia, agitación del sistema nervioso central y aumento de la diuresis.⁷⁴

La exposición crónica a la cafeína se ha relacionado con una serie de disfunciones que involucran al sistema gastrointestinal, hígado, sistema renal y muscular.

Actualmente se cree ampliamente que el uso habitual diario de cafeína >500–600mg (4-7 tazas de café o 7-9 tazas de té) representa un riesgo significativo para la salud y, por lo tanto, puede considerarse como “abuso”. El abuso sostenido puede resultar en cafeinismo, que se refiere a un síndrome caracterizado por una variedad de reacciones adversas como inquietud, ansiedad, irritabilidad, agitación, temblor muscular, insomnio, dolor de cabeza, diuresis, trastornos sensoriales (tinnitus), síntomas cardiovasculares (taquicardia, arritmia) y problemas gastrointestinales (náuseas, vómitos, diarrea).⁷⁵

En la mujer embarazada, la cafeína atraviesa la placenta y también es transportada por la leche materna. Por lo tanto, el consumo de esta sustancia por la madre debe ser considerado por sus posibles efectos sobre la salud del feto.

No hay una opinión unánime sobre el riesgo del consumo de cafeína durante el embarazo. Varios estudios no pudieron encontrar una asociación clara entre el consumo de cafeína y el resultado del embarazo. Otros estudios han encontrado una asociación entre la ingesta de cafeína durante el embarazo y la muerte fetal, el aborto espontáneo, y otros efectos descritos en neonatos como bajo peso al nacer o retardo del crecimiento. El consenso general es que es deseable que la ingesta total de cafeína durante el embarazo no supere los 300 mg al día.

76

EFFECTOS SOBRE EL HUESO Y EL BALANCE DE CALCIO

La información sobre el potencial de la cafeína para influir negativamente en el metabolismo óseo incluye estudios epidemiológicos que investigan la relación entre el consumo de cafeína y/o café y el riesgo de osteoporosis, caracterizada por baja densidad mineral ósea y mayor susceptibilidad a fracturas, así como estudios metabólicos que examinan el efecto de la cafeína en la homeostasis del calcio.⁷⁷

La ingesta de cafeína de 150-300 mg después de un ayuno de 10 horas aumenta la excreción urinaria de calcio 2-3 horas después de la exposición. La hipercalciuria inducida por cafeína no se ve afectada por el nivel de estrógenos, género o edad.⁷⁸

Barger-Lux y col. (1991) informaron que las ingestas de cafeína de 400 mg por persona al día durante 19 días mostraron evidencia de remodelación ósea alterada en mujeres

premenopáusicas saludables entre las edades de 35 y 44 años, pero no tuvieron efecto en la absorción de calcio, el calcio fecal endógeno o la excreción urinaria de calcio.⁷⁹

Ya sea a través del aumento de la excreción urinaria de calcio o la disminución de la absorción intestinal de calcio,⁷⁸ la cafeína parece tener un efecto negativo en el equilibrio de calcio. Barger-Lux y col. (1991) concluyeron que una ingesta diaria de 400 mg de cafeína en mujeres premenopáusicas saludables con una ingesta de calcio de al menos 600 mg al día no tiene un efecto apreciable en la excreción de calcio. Datos recopilados de mujeres posmenopáusicas indicaron que las ingestas de café >1000 mL al día (760 mg de cafeína al día) podrían inducir una pérdida excesiva de calcio, mientras que las ingestas de 150-300 mL de café al día (112–224 mg de cafeína al día) tendrían poco impacto en el equilibrio de calcio.⁸⁰

Se han llevado a cabo varios estudios epidemiológicos para evaluar la relación entre la ingesta de cafeína y la densidad ósea. Algunos estudios describen que aumentar la ingesta de cafeína no se asoció con disminuciones significativas en la densidad mineral ósea en mujeres adolescentes, mujeres jóvenes de 20-30 años, mujeres premenopáusicas, perimenopáusicas y posmenopáusicas u hombres. Otros estudios han observado algunas asociaciones negativas entre la ingesta de cafeína y la densidad mineral ósea; pero estas asociaciones desaparecieron cuando se ajustaron los factores de confusión como la ingesta de calcio en algunos trabajos. Algunos investigadores encontraron que los efectos de la cafeína sobre la densidad ósea dependían de las ingestas de calcio. Harris y Dawson-Hughes (1994) concluyeron que dos o tres porciones de café (280-420 mg de cafeína al día) pueden acelerar la pérdida ósea en mujeres postmenopáusicas saludables con ingestas de calcio <800 mg al día.⁸¹ Barrett-Connor y col. (1994) encontraron que solo las mujeres posmenopáusicas que bebían menos un vaso de leche al día entre los 20 y 50 años mostraron una disminución asociada con el café en la densidad mineral ósea.⁸²

La ingesta de cafeína ha sido investigada como un factor de riesgo potencial para las fracturas óseas, la principal causa de morbilidad y mortalidad asociada con la osteoporosis.⁸¹

En estudios de casos y controles, las ingestas de cafeína no se asociaron con un aumento del riesgo de fractura de cadera en mujeres mayores de 55 años, mujeres de 18-70 años, o hombres o mujeres mayores de 65 años. En un estudio transversal, tampoco pudieron

demostrar que las ingestas de cafeína estuvieran relacionadas con una mayor incidencia de fracturas de bajo impacto.⁸³ En contraste, otro estudio encontró que las mujeres que consumían más de cuatro tazas de café al día (>544 mg de cafeína al día) tenían un mayor riesgo de fractura de cadera que aquellas que "casi nunca" consumían café.⁸⁴ Aunque otros estudios han mostrado un aumento en el riesgo de fractura de cadera con la cafeína, no estaba claro si el análisis se ajustaba a diferencias en la ingesta de calcio o si los datos de ingesta de calcio no estaban disponibles.⁸⁵

La interpretación de los efectos de la cafeína sobre el metabolismo óseo es compleja porque el consumo de café está asociado con otros factores de riesgo para la osteoporosis: ingesta de calcio, edad, consumo de tabaco y consumo de alcohol. En conjunto, los datos disponibles sugieren que un aumento en la ingesta de cafeína está asociado con un deterioro leve pero biológicamente real en el equilibrio de calcio. La mayoría de las evidencias indican que este efecto es a través de la hipercalciuria inducida por la cafeína.⁸⁶

La significancia biológica del efecto negativo de la cafeína sobre el equilibrio de calcio sigue siendo tema de debate científico, ya que los estudios tanto sobre densidad ósea como sobre el riesgo de fractura han revelado resultados no concluyentes. Se sugiere que un patrón de vida de alta ingesta de cafeína (más de cuatro tazas de café al día o >400 mg de cafeína al día) en mujeres contribuye a un impacto negativo en el metabolismo del calcio y los huesos y está correlacionado con la pérdida ósea o el riesgo de fractura, especialmente cuando hay una baja ingesta de calcio. Estudios epidemiológicos muestran una asociación negativa entre la ingesta de cafeína y la masa ósea pueden explicarse por una relación inversa entre el consumo de leche y el consumo de bebidas que contienen cafeína, concluyendo que no hay evidencia de que la cafeína tenga algún efecto perjudicial sobre el estado óseo o el equilibrio de calcio en individuos que ingieren niveles recomendados de calcio.⁸⁷

La evidencia indica que la importancia del potencial de la cafeína para afectar adversamente el equilibrio de calcio y el metabolismo óseo depende de las ingestas de cafeína y calcio a lo largo de la vida y es biológicamente más relevante en mujeres. Los datos actuales sugieren que las ingestas de cafeína de <400 mg al día no tienen efectos significativos en el estado óseo o el equilibrio de calcio en individuos que ingieren al menos 800 mg de calcio al día.⁸⁸

EFFECTOS EN EL DESARROLLO

Hay evidencia de que muchas mujeres reducen espontáneamente su ingesta de cafeína durante el embarazo, algunas aparentemente desarrollando una "pérdida temporal del gusto" por la sustancia. Sin embargo, el consumo de cafeína en este grupo puede seguir siendo relativamente alto. Aproximadamente el 98% de las mujeres en edad reproductiva consumen regularmente cafeína en forma de bebidas con cafeína o en medicamentos que contienen cafeína, mientras que el 72% de ellas continúan haciéndolo durante el embarazo. Las investigaciones epidemiológicas mostraron que la mayoría de las mujeres consumen cafeína durante el embarazo en un rango de 100-300 mg al día. Una pequeña proporción de mujeres embarazadas en la población puede ingerir una cantidad mucho mayor, de hasta 5400 mg de cafeína al día. Durante los últimos 20 años, se ha acumulado una gran cantidad de evidencia sobre los efectos del consumo de cafeína en la reproducción y el desarrollo prenatal y postnatal. Aunque los resultados de los estudios no han sido completamente consistentes, la mayor parte de la evidencia sugiere que la ingesta de cafeína en niveles de dosis muy altas (~5300 mg/día) puede tener efectos adversos en algunos parámetros reproductivos/desarrollo.⁸⁹

Efectos de la cafeína en el resultado del embarazo parecen biológicamente plausibles. Los datos publicados sugieren que el feto humano y el recién nacido pueden estar expuestos a cantidades sustanciales de cafeína o sus metabolitos, ya que la cafeína ingerida por la madre se absorbe rápidamente desde el tracto gastrointestinal, cruza fácilmente la placenta y se distribuye a todos los tejidos fetales, incluido el sistema nervioso central. La cafeína también se excreta en la leche materna. Además, la exposición del feto y del recién nacido a la cafeína se ve favorecida debido a que la vida media de la cafeína aumenta notablemente en el feto (las enzimas involucradas en la oxidación de las xantinas metiladas están ausentes en el feto), en el recién nacido y en la mujer embarazada en comparación con adultos no embarazadas y niños mayores.

Nawrot y col. (2003) sugiere que el consumo de hasta 300 mg/día (dos a tres tazas por día) en mujeres embarazadas y de 2,5 mg/kg/día (una taza por día) en jóvenes no está asociado con efectos adversos. Sin embargo, se ha descrito que las mujeres que beben más de 5 tazas

de café diarias (+300 mg/día) tienen mayor probabilidad de parto prematuro, fetos más pequeños para el periodo gestacional y mayor incidencia de aborto espontáneo.⁷⁵

La cafeína podría generar mayores efectos adversos en recién nacidos que en adultos ya que la eliminación en infantes es más lenta que en los adultos. Por lo tanto, el recién nacido puede verse más afectado por una dosis de cafeína que un adulto.⁹⁰

CRECIMIENTO FETAL

El posible impacto adverso del consumo de cafeína durante el embarazo en el crecimiento fetal ha sido motivo de preocupación durante muchos años. La cafeína aumenta los niveles de AMPc mediante la inhibición de fosfodiesterasas, y el aumento en AMPc podría interferir con el crecimiento y desarrollo celular fetal. La cafeína también puede bloquear receptores específicos de adenosina. Como la adenosina está involucrada en mantener el equilibrio entre la disponibilidad y el uso de oxígeno tisular, el bloqueo de sus receptores podría aumentar la susceptibilidad de la célula a la hipoxia. Se ha informado que el consumo de dos tazas de café aumenta la concentración de epinefrina materna y disminuye el flujo sanguíneo placentario.⁹¹ Dado que el tabaquismo está estrechamente asociado con el consumo de cafeína, es importante destacar que la cafeína y el tabaquismo imponen efectos fisiológicos adversos similares en el desarrollo fetal. Los resultados de los estudios epidemiológicos que investigan la asociación entre el consumo de cafeína y el crecimiento fetal han sido no concluyentes. De 18 estudios epidemiológicos, tres indican una asociación entre el bajo peso al nacer (peso corporal <2500 g al nacer) o el retraso en el crecimiento intrauterino y el consumo de cafeína <300 mg/día. En un estudio de base poblacional realizado por Fortier y col. (1993), la ingesta de cafeína por 7025 mujeres que vivían en el área de la ciudad de Quebec, Canadá, no se relacionó con el bajo peso al nacer, pero sí se asoció con un aumento del riesgo de retraso en el crecimiento intrauterino.⁹² En un estudio brasileño de casos y controles, los resultados mostraron que la proporción de madres que dieron a luz bebés con retraso en el crecimiento intrauterino aumentó a medida que aumentaba el consumo promedio de café durante el embarazo en comparación con las madres cuyos bebés tenían un crecimiento adecuado para la edad gestacional.⁹³ En el estudio prospectivo de Watkinson y Fried (1985) en el que se recopilaron datos sobre el uso materno de té, café, refrescos con cafeína, barras de chocolate, bebidas de chocolate y medicamentos con cafeína, los efectos más marcados asociados con el uso intensivo de cafeína (> 300 mg/día) fueron una reducción del peso al nacer y un menor

perímetro cefálico; las asociaciones aún fueron significativas después del ajuste por el uso de nicotina materna. Los resultados sugieren que la ingesta diaria de cafeína de 5300 mg puede interferir con el crecimiento fetal normal.⁹⁴

Tres estudios informaron una reducción en el peso al nacer para los bebés nacidos de madres que consumieron cafeína durante la gestación a 400, 500 o 5800 mg de cafeína al día. En un estudio de 11858 mujeres embarazadas en Dinamarca, encontraron que el consumo materno de café de cuatro o más tazas al día (400 mg de cafeína al día) se asoció con una disminución moderada en el peso al nacer.⁹⁵

En un estudio prospectivo realizado por Shu et al. (1995), el consumo de cafeína en niveles de hasta 300 mg/día (tres tazas de café al día) no mostró relación con el crecimiento fetal. Aunque el consumo elevado de cafeína (≥ 300 mg/día) en el primer o segundo trimestre se relacionó con una reducción del peso al nacer promedio (93 g para el primer trimestre, 141 g para el segundo trimestre), el estudio no informó una disminución en el crecimiento fetal en ningún trimestre cuando los datos se ajustaron.⁹⁶ Un estudio de casos y controles emparejados realizado por Santos et al. (1998) no encontró asociación entre el consumo de cafeína a un nivel de dosis promedio de aproximadamente 150 mg/día y un mayor riesgo de bajo peso al nacer o retraso del crecimiento intrauterino.⁹⁷

Es difícil establecer la causa de las inconsistencias en los resultados de los estudios que investigan la asociación entre el consumo de cafeína y el crecimiento fetal. Pueden haber resultado de sesgos, especialmente en estudios retrospectivos, información incompleta sobre cantidades y fuentes de consumo de cafeína, clasificación incorrecta de la exposición a la cafeína, control inadecuado de factores de confusión o simplemente sesgo desconocido del estudio. A pesar de las inconsistencias en los resultados, la asociación persistente entre el consumo de cafeína durante el embarazo y el bajo peso al nacer observada en varios estudios sugiere firmemente que la cafeína puede afectar adversamente el crecimiento fetal. Basándose en los datos evaluados anteriormente, a pesar de las inconsistencias en los resultados, el consumo de cafeína durante el embarazo en niveles de dosis de ≥ 300 mg al día podría interferir con el crecimiento fetal (disminución del peso al nacer o retraso en el crecimiento intrauterino), especialmente en fumadores o bebedores de alcohol pesados.^{92,98,99}

Estudios en animales

Estudios en animales de experimentación evaluaron los efectos de la exposición prenatal a la cafeína a una dosis de 120 mg/kg. Los resultados demostraron que la cafeína inhibe el crecimiento óseo, y este efecto está asociado con la exposición materna a glucocorticoides y la inhibición de la expresión de IGF-1 en las placas epifisarias o cartílago de crecimiento.¹⁰⁰

Serakides and Sena Reis (2014) concluyen que la cafeína no detiene la osificación endocondral, sino que la inhiben. Además, los efectos de la cafeína son más dañinos en el cartílago de crecimiento de crías de ratas de 3 días, y la frecuencia e intensidad de los cambios observados fueron dosis dependientes. A pesar de que los niveles séricos de cortisol no se vieron alterados en madres que fueron tratadas con bajas dosis de cafeína, altas dosis de cafeína (100 mg/kg) incrementaron los niveles séricos de cortisol materno, y esto estuvo asociado con cambios más severos en el tejido cartilaginoso relacionado con la osificación endocondral de las crías.¹⁰¹

En otro estudio se suministró una dosis de 0,25mg/kg de peso corporal de cafeína a madres gestantes entre el día 7 y 15 de embarazo y se analizaron los fetos. Se demostró que la cafeína produce defectos en las extremidades y en el paladar de fetos de ratas y que tiene efecto en la condrogénesis de las extremidades.¹⁰²

EFFECTOS SOBRE EL TEJIDO MANDIBULAR Y DENTARIO

Nakamoto et al. ¹⁰³ describen que las mandíbulas de las crías de ratas sacrificadas en el momento del nacimiento, cuyas madres consumieron, a partir del 7mo día de gestación, una dieta suplementada con 20 mg/kg/día de cafeína, presentan menor peso, contenido de calcio, y actividad de fosfatasa alcalina y ácida significativamente menores comparado con grupos no suplementados.

En otro estudio, evaluaron grupos experimentales alimentados con dietas normoproteicas e hipoproteicas suplementados con 2 mg/100 g de peso de cafeína concluyendo que la ingesta de cafeína durante el embarazo y la lactancia de las ratas también causa cambios composicionales en los dientes en desarrollo de las crías.¹⁰⁴ También investigaron como la exposición prenatal de cafeína en ratas recién nacidas cuyas madres recibieron dietas normoproteicas e hipoproteicas afecta la superficie del esmalte de los primeros molares, observando que los cristales del esmalte del grupo de cafeína eran más pequeños que los del grupo control, concluyendo que la ingesta de cafeína durante la gestación afecta el desarrollo de los primeros molares de las ratas recién nacidas.¹⁰⁵ Falster y col. (1992), utilizaron ratas

que a partir del 7mo día de gestación se les implantó una tableta subcutánea de cafeína. Se obtuvieron los molares de las crías y se les aplicó una solución ácida sobre el esmalte. Se encontraron valores mayores de calcio y fosfato en la solución ácida en los grupos suplementados con cafeína (mayor susceptibilidad al ataque ácido); la superficie de los grupos suplementados, al ser observada con microscopio, fueron significativamente diferentes a los grupos controles; y se encontraron cristales más pequeños en los grupos suplementados. Todo esto indicaría que la exposición de cafeína de los fetos a través de la ingesta materna afecta el desarrollo de los molares de las crías.^{106,107}

Otro estudio evaluó la solubilidad ácida del esmalte en las crías de ratas que se les administró cafeína durante la gestación y lactancia, determinando que una mayor cantidad de calcio y magnesio se disolvió de la superficie adamantina de primeros molares de las ratas de los grupos experimentales a diferencia del grupo control.¹⁰⁸

5 HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis alternativa: Debido a los efectos conocidos de la cafeína sobre el metabolismo mineral y los tejidos dentarios en animales que recibieron cafeína como suplemento, así como sobre la osificación endocondral de las crías cuando las madres consumieron cafeína durante el embarazo, planteamos la hipótesis de que el consumo de cafeína durante el embarazo y la lactancia podría afectar negativamente el desarrollo mandibular y dentario de las crías.

Hipótesis nula: El consumo de cafeína durante el embarazo y la lactancia no afecta el desarrollo mandibular y dentario de las crías.

En este proyecto, se propone utilizar metodologías que permitan evaluar las alteraciones producidas por el consumo materno de cafeína durante el embarazo y la lactancia en el desarrollo mandibular y dentario, aspectos que no han sido considerados en profundidad previamente. Además, se busca actualizar el conocimiento sobre el tema y aportar nueva información que permita conectar e interpretar datos previos, con el fin de construir nueva evidencia científica sobre el impacto de la cafeína en el desarrollo mandibular y dentario.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar el impacto del consumo de cafeína por ratas gestantes y lactantes en el desarrollo dentario y mandibular de su progenie.

Objetivos específicos

Objetivo 1: Evaluar los efectos del consumo de cafeína en ratas gestantes y lactantes sobre el desarrollo dentario de la progenie.

Objetivo 2: Analizar las alteraciones en el desarrollo mandibular de las crías de ratas que consumieron cafeína durante la gestación y lactancia.

Objetivo 3: Comparar los efectos del consumo de distintas dosis de cafeína en ratas gestantes y lactantes sobre el desarrollo mandibular y dentario de la progenie.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizaron 12 ratas hembra de la línea Sprague-Dawley obtenidas del CIPReB (Centro de Investigación y Producción de Reactivos Biológicos) de la Facultad de Ciencias Médicas (UNR) de 7 semanas de edad. Estas fueron trasladadas al Bioterio del Laboratorio de Biología Ósea, donde se habitaron en un ambiente ventilado y a temperatura controlada de 23 ± 1 °C, con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas en racks ventilados.

Luego de una semana de adaptación, se dividieron aleatoriamente en 3 grupos de 4 ratas cada uno y se colocaron en plantel con 1 macho cada 2 hembras. Una vez comprobada la preñez fueron separadas en cajas individuales y posteriormente al nacimiento de las crías se normalizaron los grupos con una distribución de 5 crías por madre.

Los grupos experimentales así constituidos fueron (Figura 18):

1. Agua (grupo Control) (GC)
2. Cafeína dosis baja (25 mg/kg) (C)
3. Cafeína a dosis alta (50 mg/kg) (C+)

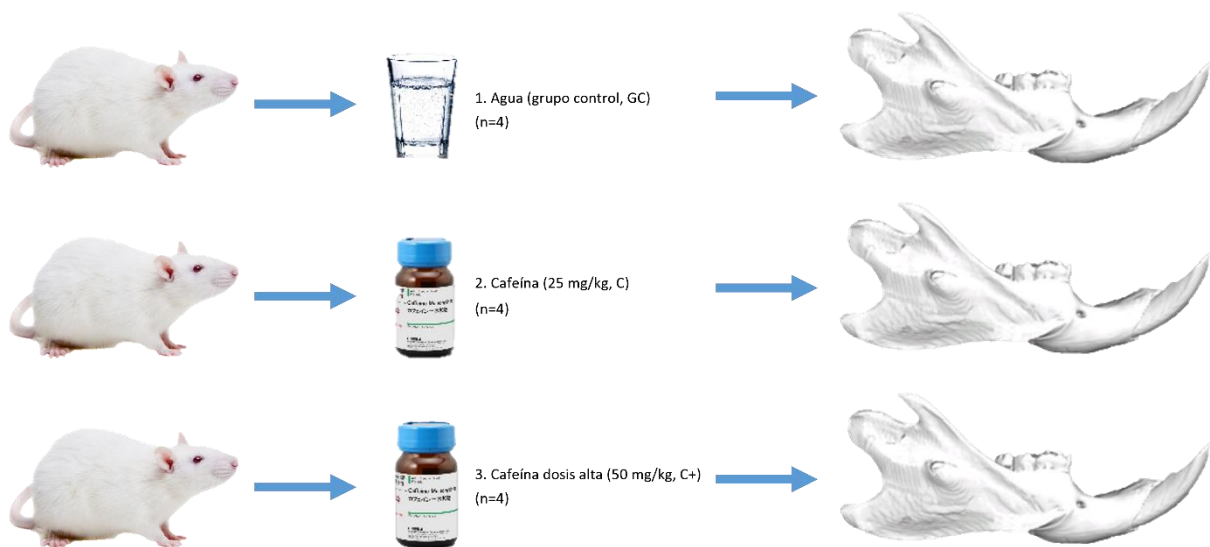


Figura 18. Diseño experimental

A partir de este punto, los grupos con cafeína recibieron una solución de cafeína (*Caffeine* C0750 - Sigma-Aldrich) en agua ad libitum, preparada previamente, durante la preñez (21 días) y se continuó hasta el día 33 de vida de las crías, momento en el cual se llevó a cabo el procedimiento de eutanasia en cámara de CO₂.

Cada una de las crías recibió tres inyecciones de tetraciclina (Tetracycline hydrochloride T7660 Sigma-Aldrich) en un intervalo regular de 8 días en los días 14, 22 y 30 de vida con el objetivo de realizar marcaciones para mediciones histomorfométricas descritas en las siguientes secciones.

Las crías fueron pesadas en los días de las inyecciones de tetraciclina y en el día del sacrificio. Finalizado el tiempo experimental, a los 33 días de vida de las crías, se realizó la eutanasia en cámara de CO₂ de 20 crías por cada grupo y se obtuvieron 40 hemimandíbulas por cada grupo, las cuales fueron distribuidas de forma aleatoria para las distintas técnicas utilizadas para cumplimentar con los objetivos (Figura 19).

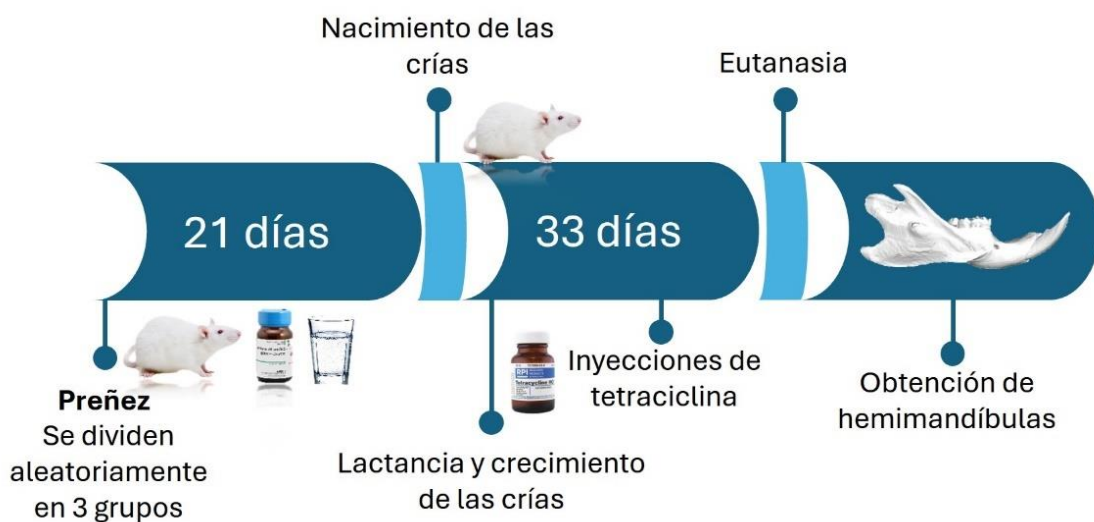


Figura 19. Línea de tiempo de experimento

Dado que las ratas presentan un metabolismo considerablemente más acelerado (se estima 6.4 veces mayor) que el de los humanos, por lo que para lograr una equivalencia en términos de exposición y efectos fisiológicos se debe ajustar esta cifra. Matemáticamente, la conversión es la siguiente: $5 \text{ mg/kg (humano)} \times 6.4 \approx 32 \text{ mg/kg (equivalencia en ratas)}$. En nuestro estudio se optó por administrar dos regímenes de dosis: 25 mg/kg y 50 mg/kg. De esta manera, la dosis de 25 mg/kg se sitúa ligeramente por debajo del valor estimado para una exposición equivalente a la que se observaría en humanos, mientras que la dosis de 50 mg/kg representa un escenario de sobreexposición, lo que permite explorar la relación dosis-respuesta de forma más amplia.

Todos los procedimientos se llevaron a cabo bajo normas éticas universalmente consensuadas, y fueron aprobadas por el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) Comité de Bioética, Facultad de Ciencias Médicas, UNR. CUDI/EXPT. N° 13458-2020.

6.2 TÉCNICAS

Se obtuvieron 110 hemimandíbulas (36 grupo Control, 36 grupo Cafeína y 38 grupo Cafeína dosis alta), las cuales se distribuyeron aleatoriamente para las distintas técnicas de estudio.

ESTUDIO RADIOGRÁFICO

Una vez obtenidas las hemimandíbulas, se limpiaron de tejidos blandos y se las fijó en alcohol 95%. Se obtuvieron radiografías (Kodak D-speed 30,5 x 40,5 mm) de 34 hemimandíbulas junto a una escala de aluminio con un equipo de rayos X (Work Ray de 70KV) que posteriormente fueron digitalizadas (Figura 20).



Figura 20. Radiografía de hemimandíbula con patrón de calcio

Mediciones macroscópicas morfométricas: Las mediciones se realizaron con el programa de procesamiento digital de imágenes ImageJ (versión 1.54, National Institutes of Health, Bethesda, MD, EE. UU.) sobre las radiografías de las hemimandíbulas según el protocolo descrito por Eratalay.¹⁰⁹ Las mediciones lineales realizadas fueron: A-B; A-C (longitud); A-D

(base); B-D; B-E (altura); F-G. También se midió el área mandibular (A-B-D) (Figura 21) (Figura 22)

Mediciones de densidad mineral: Se midió la densidad ósea de la zona anteroinferior al primer molar definido como ZONA 1 (rectángulo verde de 1.5 mm x 1 mm) y la densidad del incisivo en un cuadrado por debajo del primer molar (rectángulo azul de 1 mm x 1 mm) y la densidad de la porción coronaria del primer molar.

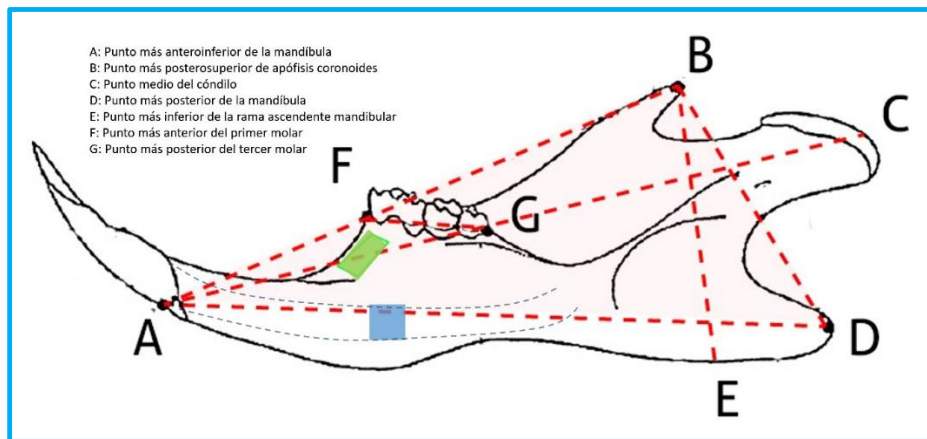


Figura 21. Mediciones macroscópicas realizadas en hemimandíbula

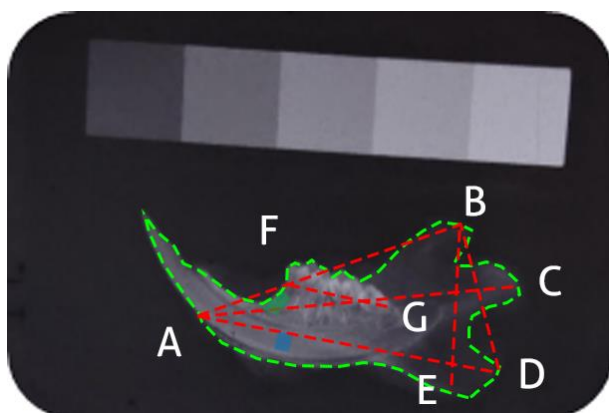


Figura 22. Mediciones realizadas en radiografía

RESISTENCIA ÓSEA

Una vez obtenidas las hemimandíbulas, se limpiaron de tejidos blandos y se sometieron a la criopreservación (congelación de huesos en condiciones húmedas). La evaluación de la resistencia ósea se realizó en la hemimandíbula a través del ensayo de flexión a tres puntos. Fue realizado en un equipo diseñado en el Laboratorio de Biología Ósea, este cuenta con una celda de carga de 200 N de capacidad máxima, con sensibilidad de 0,01 N y una precisión de 10 micras para el desplazamiento. Se colocó la mandíbula con su cara

vestibular mirando hacia arriba en el soporte. El punto de aplicación de la fuerza fue alineado con el segundo molar. La velocidad de desplazamiento fue de 0,01 mm/seg, y se obtuvo una curva de carga en función de la deformación para determinar las propiedades óseas. Los valores de voltaje y desplazamiento fueron adquiridos por el software Biomedical Data Acquisition Suite 1.9 (Argentina, 2011) (Figura 23). El software transformó los datos de voltaje a fuerza y luego se calculó las demás variables biomecánicas: se obtuvieron medidas de punto de fractura (N), fuerza máxima soportada (N) y rigidez del hueso que es la pendiente de la sección lineal de la gráfica de carga vs desplazamiento (N/mm) (Figura 24).

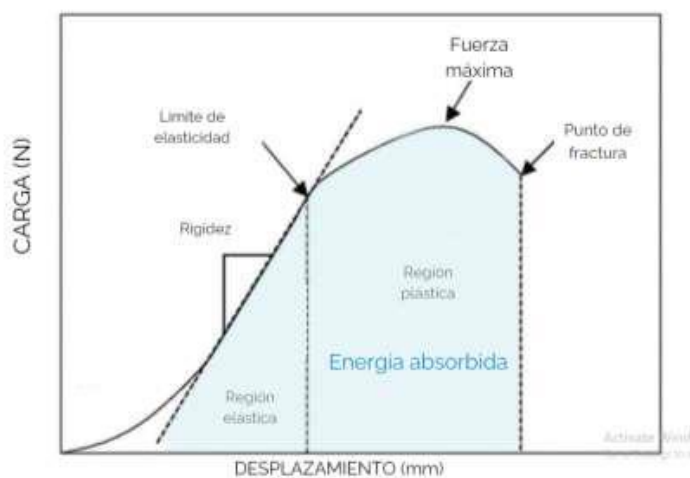


Figura 23. Variables obtenidas de la curva de carga vs desplazamiento

Punto de fractura: Es la fuerza al momento de la fractura. Mide la resistencia y la tenacidad de un material. Cuanto mayor sea la fuerza de fractura, más resistente será el material y más energía podrá absorber antes de fracturarse.

Fuerza máxima soportada: Es el valor máximo alcanzado de fuerza en la curva y representa al máximo valor de fuerza soportado antes de que se produzca una deformación permanente o una fractura.

Rigidez: Es la pendiente de la parte lineal de la curva fuerza vs desplazamiento. Se refiere a la medida de la resistencia del hueso a la deformación cuando se aplica una carga.



Figura 24. Ensayo de flexión a tres puntos para hemimandíbulas

HISTOMORFOMETRIA ESTÁTICA

Para llevar a cabo la histomorfometría estática del cóndilo y de tejidos dentarios del incisivo de crecimiento continuo y del primer molar inferior las muestras se fijaron en formol al 10 %, se descalcificaron en EDTA (ácido etilen diamino tetracético) al 10% pH 7 durante 40 días. Posteriormente el material se deshidrató y se incluyó en parafina para realizar cortes orientados mesiodistales de 8 μm en un microtomo de parafina RM2125 RTS (Leica Microsystems). Los cortes fueron desparafinados y coloreados con hematoxilina y eosina, se deshidrataron y se montaron con bálsamo de Canadá.

Cóndilo mandibular: Se seleccionaron las secciones sagitales centrales de cada cóndilo mandibular y se examinaron bajo un microscopio óptico (Mikoba serie F-320, China) con un aumento de x200. La adquisición de imágenes se realizó con una cámara digital para microscopio Touptek, XCAM1080PHA (Hangzhou ToupTek Photonics Co., Ltd., Hangzhou, Zhejiang, China). Con un macro específico (InteredgeDistance) del software ImageJ se realizaron mediciones del ancho de las capas fibrosa, proliferativa, madura/hipertrófica y del total de las tres capas a lo largo de 200 μm del cartílago condilar. El área por medir se determinó tomando las 200 μm caudales de una línea perpendicular a la distancia media de polo superior a polo inferior del cóndilo (Figura 25).^{110,111,112}

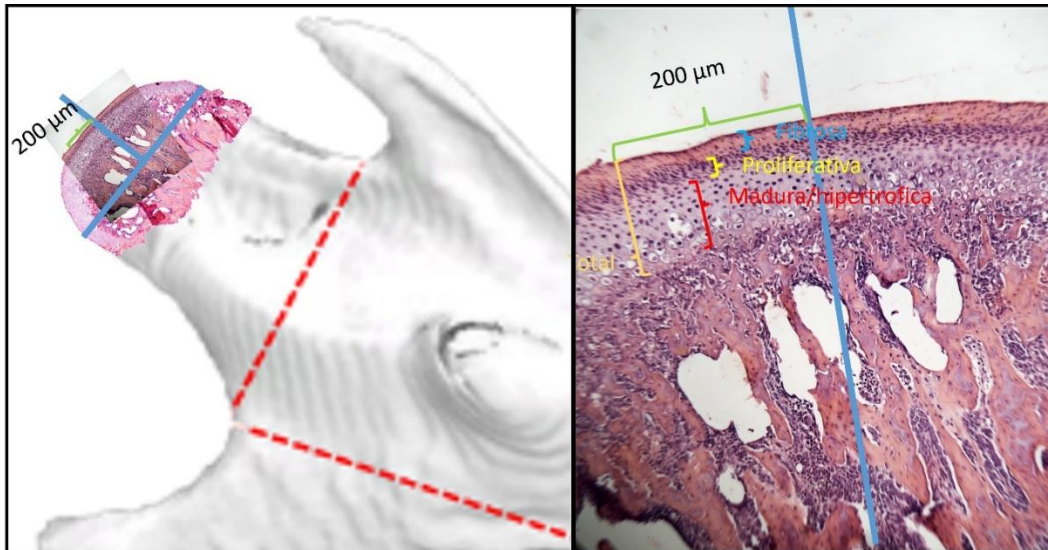


Figura 25. Corte histológico de cóndilo mandibular con capas de cartílago de crecimiento

TEJIDO DENTARIO

Ameloblastos: Mediante un protocolo de cuantificación de células del software ImageJ se realizaron mediciones de la cantidad de ameloblastos (A) presentes a lo largo de un área de 200 µm de la capa ameloblástica del incisivo de crecimiento continuo a la altura del primer molar inferior como se muestra en la

Figura 26.

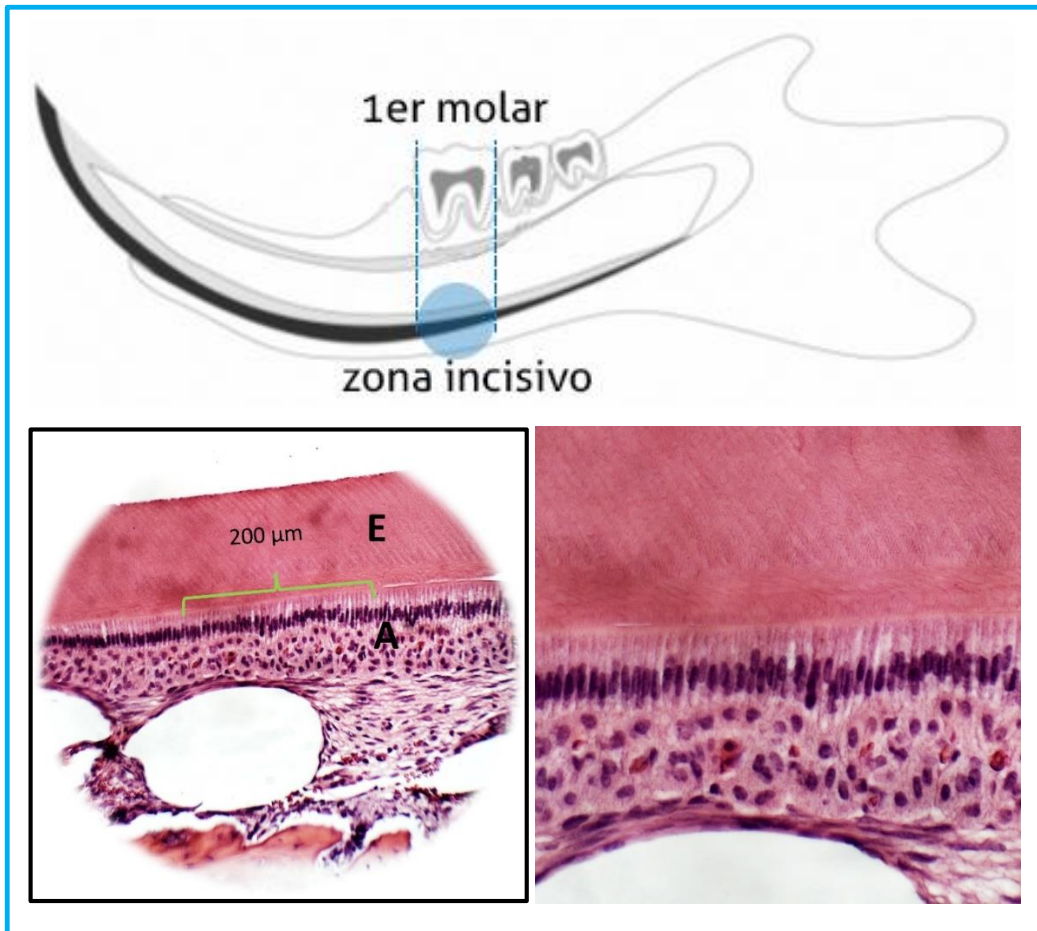


Figura 26. Corte histológico de ameloblastos

Odontoblastos: Mediante el mismo protocolo de cuantificación de células del software ImageJ se realizaron mediciones de la cantidad de odontoblastos presentes a lo largo de un área de 200 μm de la capa odontoblástica a la altura de la UAC distal del primer molar mandibular hacia coronal (Figura 27).^{113,114,115}

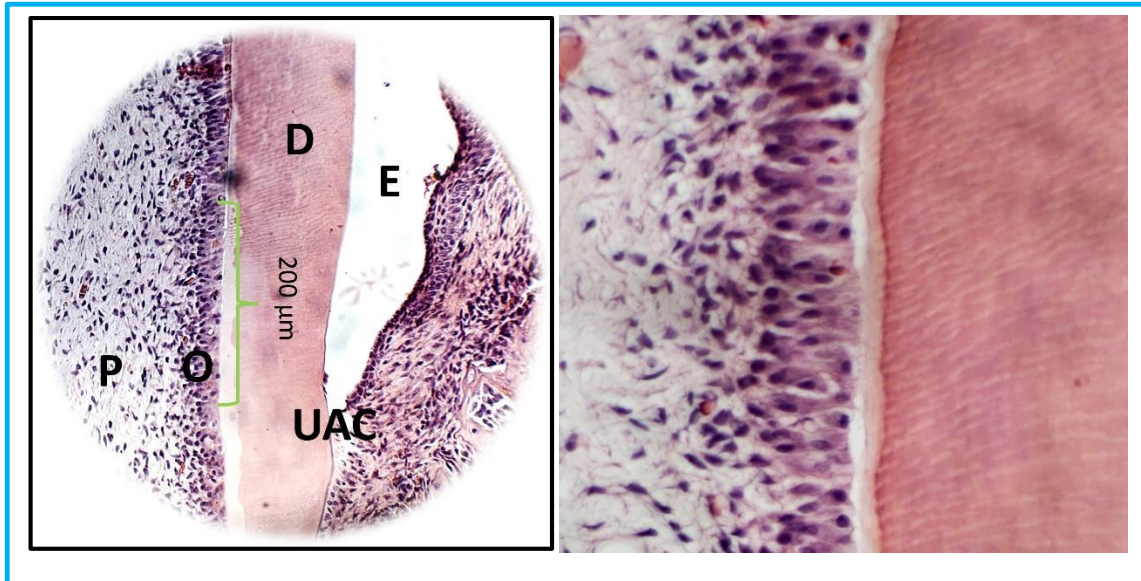


Figura 27. Corte histológico de odontoblastos. P: pulpa. O: Odontoblastos. D: dentina. E: esmalte. UAC: unión amelocementaria.

Espesor de predentina: Mediante la utilización del macro “Interedge Distance” del software ImageJ se midió el espesor de la capa de predentina a lo largo de 50 µm a la altura de la UAC distal del primer molar mandibular hacia coronal.

Cresta alveolar: Utilizando el programa ImageJ se determinó la altura vertical del hueso alveolar (AHA) midiendo la distancia desde una línea trazada entre la UAC entre el primer y el segundo molar (M1-M2) hasta la cresta del hueso alveolar (CHA) (Figura 28). ^{116,117,118}

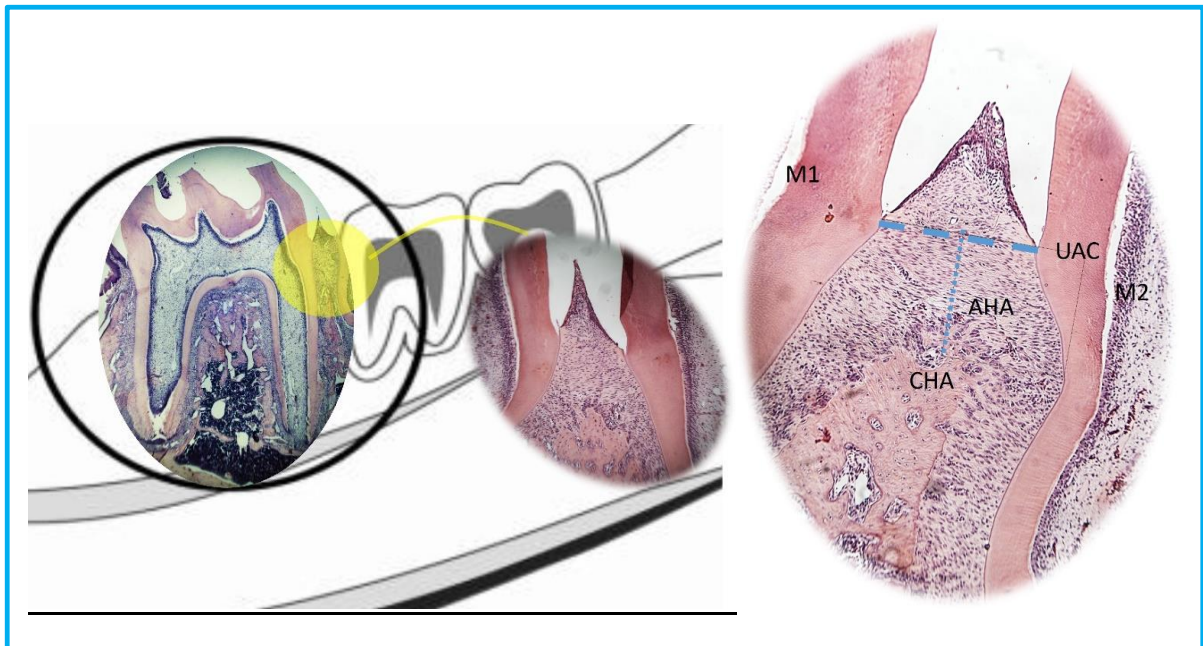


Figura 28. Corte histológico del hueso alveolar x100. M1: primer molar. M2: segundo molar. UAC: unión amelocementaria. AHA: altura de hueso alveolar. CHA: cresta del hueso alveolar.

HISTOMORFOMETRIA DINÁMICA

Para evaluar el crecimiento de la dentina se inyectó tetraciclina a las crías, con un intervalo regular de 8 días en los días 14, 22 y 30 de vida. La dosis que se usó fue de 10 mg/kg (0.1 mL tetraciclina 1%/100g peso corporal).

Las tetraciclinas tienen la propiedad de depositarse en los frentes de mineralización ya que se asocian a los átomos de calcio depositados en las superficies mineralizadas del hueso o dentina en formación, y dado que fluorescen bajo luz ultravioleta generan bandas que pueden detectarse mediante microscopia de fluorescencia. La distancia entre las bandas se midió para estimar la proporción de aposición dentinaria en intervalos específicos de tiempo (MAR del inglés *Mineral Apositional Rate*).

Las hemimandíbulas seleccionadas se fijaron en formol-PBS 10%, luego se deshidrataron en etanol con concentraciones crecientes (70% a 98%) y un paso final en xileno puro (Biopack, Argentina). Posteriormente se realizó una infiltración con metilmetacrilato puro (MMA) por 48 h, y luego se colocaron las diferentes piezas en viales de vidrio con 0.5 g de peróxido de benzoílo (Sigma, USA) cada 100 mL de MMA. El peróxido de benzoílo se utilizó como catalizador de la polimerización. Se realizó vacío y se dejaron polimerizar los bloques a 37-40 °C durante 1 semana o hasta que se completó la polimerización. Luego se realizaron cortes de 100-150 micras con sierra circular diamantada de baja velocidad (IsoMet Buehler

Ltd. Illinois, USA), los cortes obtenidos con la sierra se adhirieron sobre portaobjetos y se redujo el espesor del corte con papel de esmeril de 600-2000 granos/pulgada, hasta obtener el grosor de ~60 micras. Los cortes fueron finalmente montados con bálsamo de Canadá. Para la obtención de las imágenes y la determinación de los scores histomorfométricos, se utilizó un microscopio de fluorescencia (Mikoba serie F-320, China), cámara Touptek (XCAM1080PHA) y el software Image J 1.40 (NIH, USA). Para observar y poder obtener imágenes con la fluorescencia emitida por la tetraciclina se utilizó un filtro azul (λ excitación: 450-490 nm). Con un macro específico llamado "Interedge Distance" del software ImageJ se obtuvieron las distancias entre las 3 bandas y la distancia a la capa odontoblástica, se tomaron 20 medidas diferentes al azar en un área determinada, para luego promediarlas y arrojar un valor final que fue el utilizado para hallar el MAR en cada muestra. Las mediciones se realizaron en la dentina a lo largo de 50 μ m en cada marca a la altura de la UAC distal del primer molar mandibular hacia coronal. (Figura 29).^{119,120,121,122 123 124}

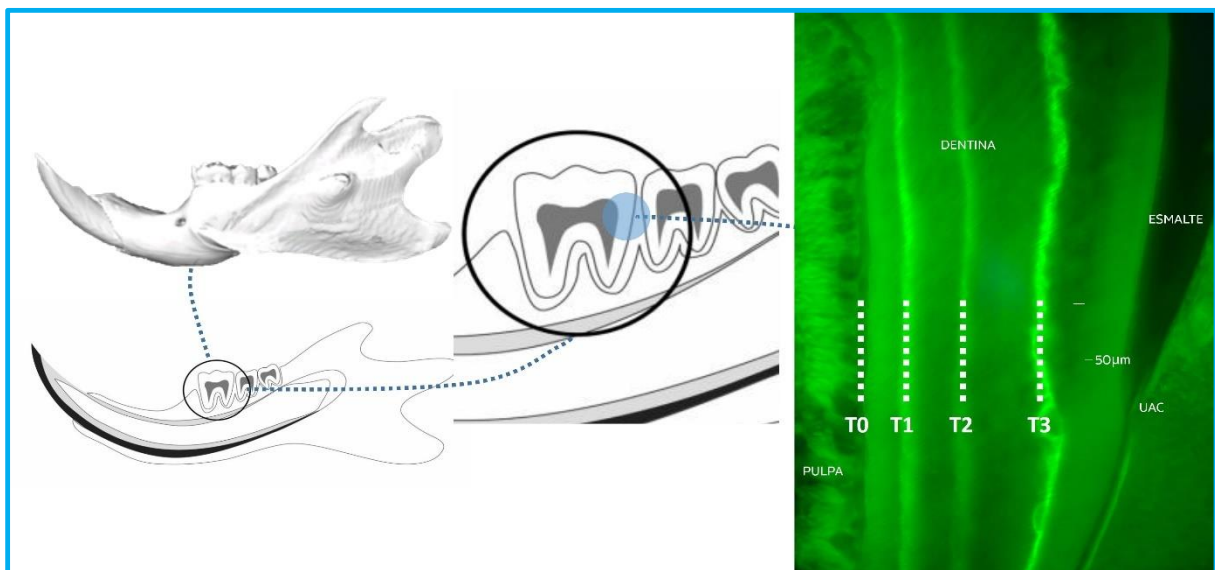


Figura 29. Corte histológico sin descalcificar de histomorfometría dinámica, con marcaciones de tetraciclina en dentina

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo mediante el uso del software GraphPad Prism 8.0.2 empleando test paramétrico o no paramétricos según corresponda. El análisis de normalidad se realizó con la prueba de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de varianzas se evaluó con la prueba de Barlett.

Si los datos presentaban una distribución normal y el tamaño de muestra suficiente, se realizó la prueba paramétrica ANOVA y análisis *post hoc* de Tukey.

Si los datos no presentaban una distribución normal o tamaño de muestra pequeño, se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y análisis *post hoc* de Dunn.

En todos los casos se consideró diferencia significativa cuando $p < 0,05$.

7 RESULTADOS

Se realizó un análisis inicial para investigar posibles diferencias significativas entre los sexos en las variables de interés. Los resultados de este análisis indicaron que no existía dimorfismo sexual significativo en ninguno de los parámetros medidos ($p > 0.05$). Debido a esta ausencia de diferencias sexuales significativas, se decidió agrupar los datos de todas las ratas independientemente de su sexo para los análisis subsecuentes. Esta estrategia permitió aumentar el poder estadístico de nuestros análisis y simplificar la interpretación de los resultados.

Respecto al peso de las crías al momento del sacrificio no se encontraron diferencias significativas entre los grupos (Figura 30).

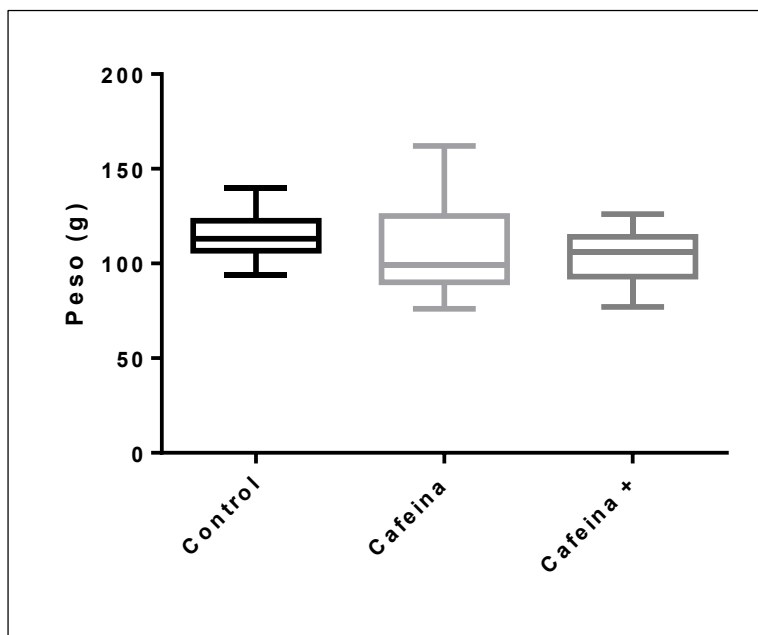


Figura 30. Pesos al momento del sacrificio de las ratas de los distintos grupos

7.1 Estudio morfométrico mediante radiografías

El parámetro BE ^{Figura 21} mostró una disminución significativa en el grupo Cafeína y en el grupo Cafeína+ comparados con el grupo Control. El parámetro FG también presentó una disminución significativa en el grupo Cafeína en comparación con el control. En cuanto al parámetro ABD, se observaron disminuciones significativas tanto en el grupo Cafeína como en el grupo Cafeína+ respecto al grupo Control. En el parámetro “densidad del incisivo”, el grupo Cafeína+ mostró un aumento significativo comparado con el Control. Finalmente, el

parámetro “densidad del molar” presentó un aumento significativo en el grupo Caféina+ en comparación con el Control (Figura 31). Todos los demás parámetros (AB, AC, AD, BD, ZONA 1) ^{Figura 21} no mostraron diferencias significativas entre los grupos (Tabla 2).

Tabla 2. Medidas morfométricas (mm) y densitométricas (g/cm²)

	CONTROL	CAFEINA	CAFEINA+	p
AB	13,00 ± 0,45	13,10 ± 1,11	13,20 ± 1,24	ns
AC	17,10 ± 0,42	17,90 ± 0,96	17,10 ± 0,76	ns
AD	17,00 ± 0,46	17,50 ± 0,99	16,80 ± 1,27	ns
BD	8,58 ± 0,29	7,85 ± 0,92	7,76 ± 1,05	ns
BE	8,59 ± 0,35	7,90 ± 0,68*	7,69 ± 0,71*	0,0143
FG	5,84 ± 0,11	5,57 ± 0,25*	5,71 ± 0,16	0,0063
ABD	54,30 ± 4,00	46,00 ± 4,70*	47,00 ± 5,82*	0,0019
ZONA 1	21,70 ± 8,73	17,10 ± 5,16	20,70 ± 6,35	ns
INCISIVO	18,90 ± 6,07	22,00 ± 4,90	25,20 ± 4,25*	0,0429
MOLAR	30,20 ± 3,80	32,70 ± 6,48	37,60 ± 4,37*	0,0141

Media ± DS (p < 0.05) - * diferencia significativa vs grupo Control

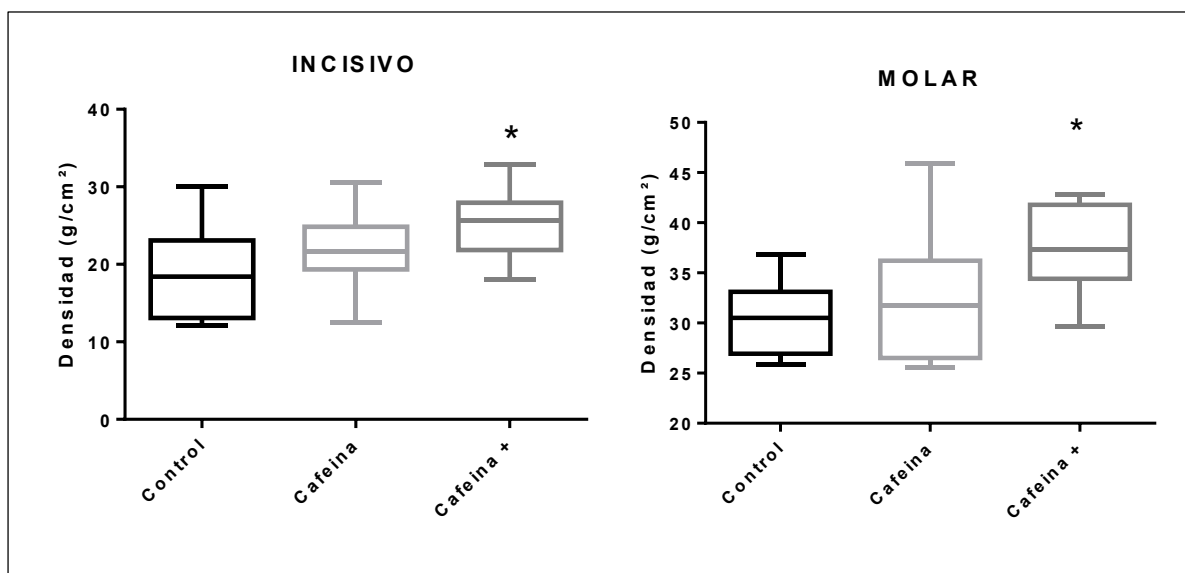


Figura 31. Densidad mineral del incisivo y del primer molar de los distintos grupos. (p < 0.05) - * diferencia significativa vs grupo Control

7.2 Resistencia ósea

Se observó incremento significativo de la fuerza máxima soportada en ambos grupos que recibieron cafeína versus el Control (CG: $24,60 \pm 2,10$, C: $30,40 \pm 3,60^*$, C+: $30,10 \pm 5,60^*$; $p=0,01$); sin diferencias entre ambos grupos que recibieron cafeína. El punto de fractura y la rigidez mostraron incremento significativo respecto del GC solo en el grupo C+ (punto de fractura: CG: $22,20 \pm 2,60$, C: $27,30 \pm 4,40$, C+: $28,50 \pm 5,90^*$, $p=0,05$); (rigidez: CG: $39,50 \pm 7,80$, C: $52 \pm 22,80$, C+: $63,80 \pm 13,50^*$; $p=0,01$) (Figura 32).

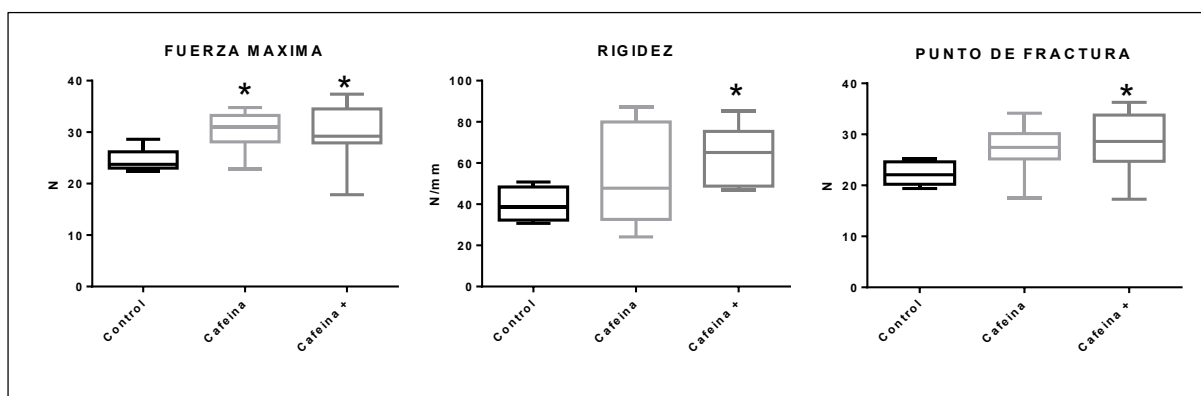


Figura 32. Parámetros biomecánicos obtenidos por ensayo de flexión a tres puntos. ($p < 0.05$) - * diferencia significativa vs grupo Control.

7.3 Histomorfometría Estática

Cóndilo mandibular

El espesor de la capa fibrosa, la capa proliferativa y la hipertrófica mostraron una disminución significativa en el grupo Cafeína comparado con el Control. En el espesor de la capa hipertrófica hubo una diferencia significativa entre los grupos Cafeína y Cafeína+. En el parámetro total, el grupo Cafeína mostró una disminución significativa respecto al control, y también se encontró una diferencia significativa entre los grupos Cafeína y Cafeína+. Los demás parámetros no mostraron diferencias significativas entre los grupos (Tabla 3).

Tabla 3, Histomorfometría estática del cóndilo mandibular (μm)

	CONTROL	CAFEINA	CAFEINA+	p
FIBROSA	93.87 ± 40.76	$51.44 \pm 19.98^*$	84.07 ± 19.18	0.0304
PROLIFERATIVA	193.50 ± 77.39	$100.20 \pm 42.65^*$	165.20 ± 65.32	0.0359

HIPERTROFICA	228.20 ± 47.45	158.80 ± 17.43*	224.70 ± 38.67#	0.0039
TOTAL	512.30 ± 138.90	302.50 ± 64.88*	453.90 ± 68.72#	0.0029

Media ± DS ($p < 0.05$) - * diferencia significativa vs grupo Control - # diferencia significativa entre grupos cafeína

Odontoblastos y ameloblastos

Se encontraron diferencias significativas en los parámetros de odontoblastos y ameloblastos (células/200 μm) entre los grupos tratados con cafeína y el grupo Control. Específicamente, el parámetro de odontoblastos mostró un incremento significativo en el grupo Cafeína+ (74.50 ± 8.53) comparado con el grupo Control (53.80 ± 10.27) y, además, hubo una diferencia significativa entre los grupos Cafeína y Cafeína+ (48 ± 9.51 vs. 74.50 ± 8.53). Similarmente, el parámetro de ameloblastos presentó un incremento significativo en el grupo Cafeína+ (61.50 ± 8.49) respecto al grupo Control (48.50 ± 5.02), con una diferencia significativa también entre los grupos Cafeína y Cafeína+ (47.08 ± 6.89 vs. 61.50 ± 8.49). (Figura 33) No se observaron diferencias significativas entre el grupo Control y el grupo Cafeína para ambos parámetros.

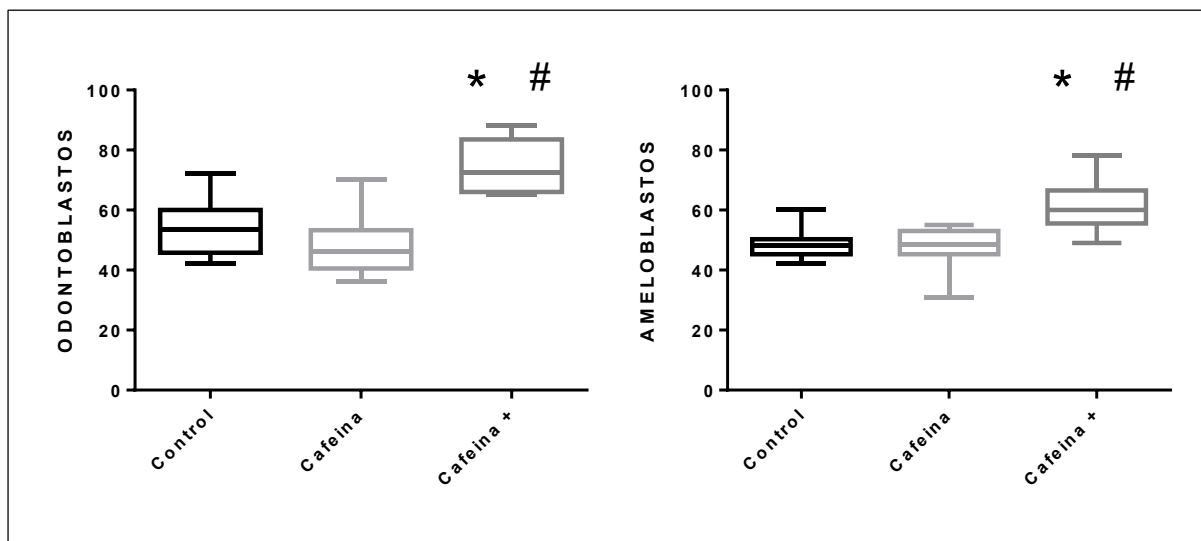


Figura 33. Población celular de odontoblastos y ameloblastos en los distintos grupos (células/200 μm) ($p < 0.05$) - * diferencia significativa vs grupo Control - # diferencia significativa entre grupos cafeína

Pre dentina

Se analizaron los efectos de la ingesta de cafeína en ratas gestantes sobre el espesor de la pre dentina en las crías. (Tabla 4).

El análisis de varianza (ANOVA) reveló diferencias significativas entre los tres grupos ($p = 0.041$). Sin embargo, el análisis post-hoc de Tukey no encontró diferencias significativas entre

pares de grupos individuales. A pesar de esto, se observó una tendencia hacia un mayor espesor de predentina en los grupos tratados con cafeína en comparación con el grupo control, como se visualiza en el gráfico adjunto (Figura 34).

Tabla 4. Espesor de predentina (μm) – Media \pm DS

	CONTROL	CAFEINA	CAFEINA+
ESPESOR DE PREDENTINA	306.80 \pm 96.27	415.60 \pm 104.30	417.90 \pm 122.40

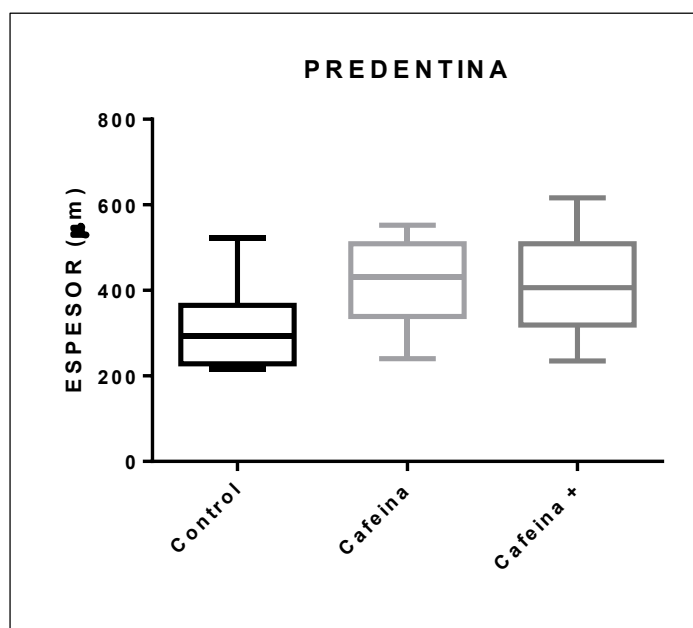


Figura 34. Espesor de la predentina en los distintos grupos

Cresta alveolar

No se encontraron diferencias significativas en la altura del hueso alveolar entre los grupos tratados con cafeína y el grupo control. Las medias y desviaciones estándar fueron de 351,40 \pm 86,65 μm para el grupo Control, 343,70 \pm 56.84 μm para el grupo Cafeína, y 378,40 \pm 86,52 μm para el grupo Cafeína+.

7.4 Histomorfometría dinámica

La distancia entre T0-T1 mostró un incremento significativo en los grupos Cafeína y Cafeína+ comparados con el grupo Control. Para el parámetro T0-T3, el grupo Cafeína mostró un incremento significativo respecto al grupo Control y, además, hubo una diferencia significativa entre los grupos Cafeína y Cafeína+. Los demás parámetros (T1-T2 y T2-T3) no mostraron diferencias significativas entre los grupos (Figura 35).

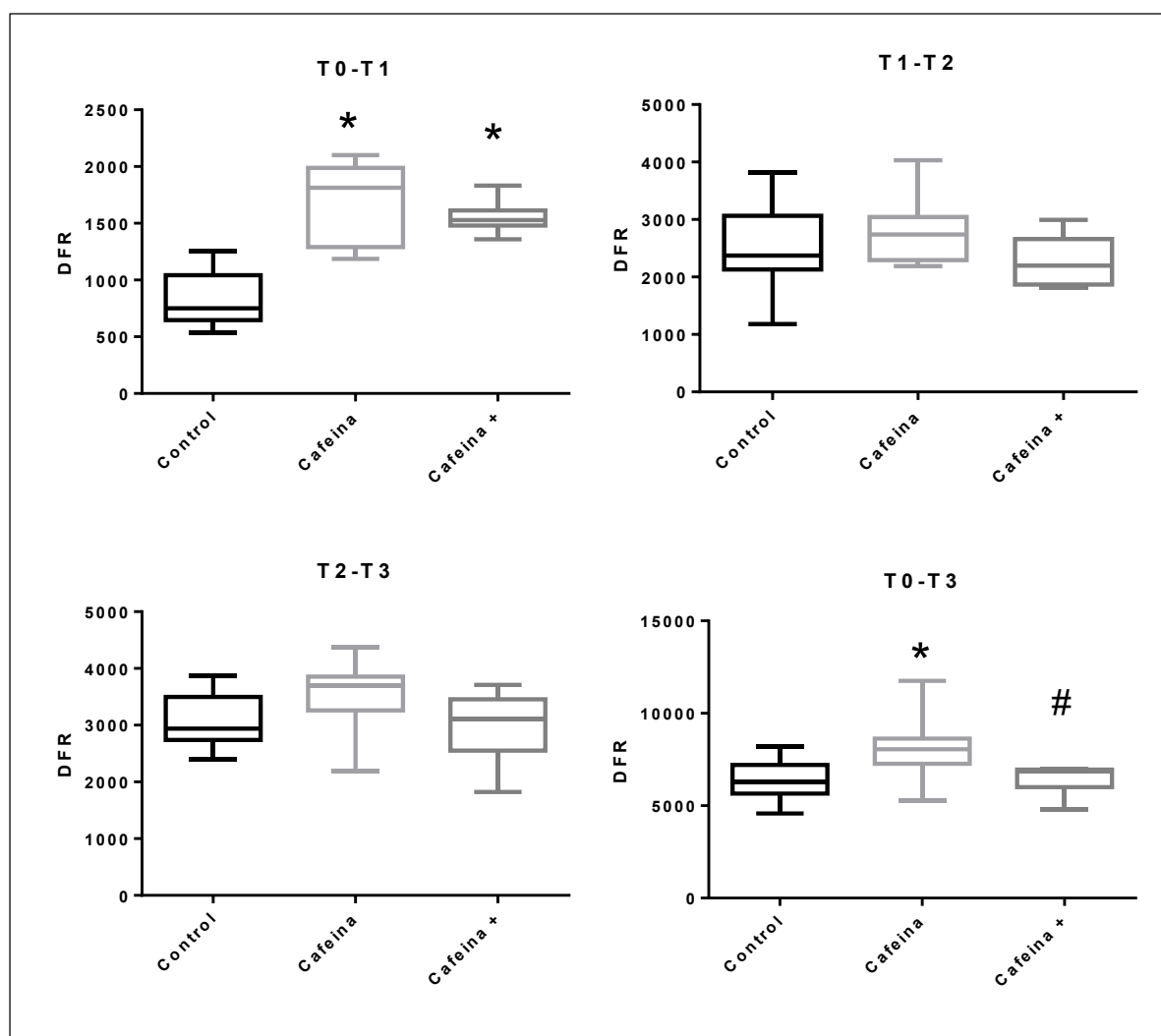


Figura 35. Mediciones de histomorfometría dinámica de los distintos grupos. DFR = Dentin formation rate ($P < 0.05$) - * diferencia significativa vs grupo Control - # diferencia significativa entre grupos cafeína

8 DISCUSION

La presente tesis investiga los efectos de la administración de cafeína durante la gestación y lactancia sobre el desarrollo mandibular y dentario en ratas, con el objetivo de establecer correlaciones y posibles extrapolaciones al ámbito humano. La importancia de este estudio se fundamenta en el elevado consumo de cafeína en la población argentina, donde casi el 100% de los adultos y el 98% de niños y adolescentes ingieren cafeína a través de diversas fuentes. En adultos, la ingesta media se aproxima a los 288 mg diarios, lo que equivale a una dosis de aproximadamente 4.4 mg/kg/día, siendo la infusión de yerba mate y el café las principales fuentes responsables de esta exposición (el mate representa cerca del 50% y el café alrededor del 36% de la ingesta total).⁶¹ En términos prácticos, se estima que una taza de 250 mL de café puede contener hasta 200 mg de cafeína, mientras que un café expreso aporta cifras en torno a los 75 mg.

Una vez ingerida, la cafeína es absorbida de forma rápida desde el tracto gastrointestinal y se distribuye ampliamente por todo el organismo. Su capacidad para cruzar barreras biológicas esenciales -tales como la hematoencefálica, hemato-testicular, placentaria- y su detección en la leche materna, refuerzan la relevancia clínica de estudiar su impacto en etapas críticas del desarrollo.¹²⁵ Durante el embarazo, la farmacocinética de la cafeína se ve alterada, ya que tanto la placenta como el feto carecen de enzimas capaces de metabolizarla eficazmente. En este contexto, se observa una disminución en la actividad de enzimas que ocasiona un alargamiento de la vida media de la cafeína, la cual puede variar entre 11.5 y 18 horas hacia el final de la gestación.¹²⁶ Este fenómeno implica que el feto y el recién nacido estén expuestos a concentraciones prolongadas de cafeína y sus metabolitos, lo que podría interferir con el crecimiento y el desarrollo celular.

Diversos estudios en animales han evaluado el efecto de la exposición prenatal a la cafeína. En particular, ensayos experimentales que han utilizado dosis elevadas (por ejemplo, 120 mg/kg) han demostrado una inhibición en el crecimiento óseo, un efecto que se vincula a la exposición de la madre a glucocorticoides (aumentados por el consumo de cafeína) y a una reducida expresión del IGF-1 en las placas epifisarias y en los cartílagos de crecimiento. Se ha observado asimismo que la cafeína, en lugar de detener el proceso de osificación endocondral, lo modula negativamente de manera que sus efectos se manifiestan de forma

más pronunciada en el cartílago de crecimiento, siendo la severidad de estos cambios dependiente de la dosis administrada.¹²⁷

Tales hallazgos resaltan la necesidad de una evaluación cuidadosa de la exposición a cafeína durante períodos críticos de desarrollo, tanto en estudios experimentales como en escenarios clínicos. El amplio consumo de cafeína en la población, sumado a su presencia en diversas bebidas y alimentos, refuerza la necesidad de comprender sus efectos, especialmente en poblaciones vulnerables como gestantes y neonatos.

Los hallazgos obtenidos en este trabajo permiten, por un lado, identificar un efecto potencialmente positivo de la cafeína en parámetros estructurales y funcionales de los dientes (como el incremento en densidad y resistencia mecánica) y, por otro lado, evidenciar cómo la misma sustancia puede tener un efecto adverso en regiones del desarrollo óseo de tipo endocondral, como es el caso del cóndilo mandibular. Esta dualidad de efectos subraya la complejidad de la influencia de la cafeína en distintos tejidos y la importancia de considerar tanto la cantidad como el momento de exposición para comprender plenamente su impacto.

8.1 Estudio Radiográfico

Respecto a las medias morfométricas, si bien en la mayoría no hubo diferencias significativas, en las que las hubo (B-E o ABD) (Figura 36) parecieran no ser clínicamente relevantes ya que son decimas de milímetro las diferencias encontradas. Sumado a esto, nos encontramos con la dificultad de preservar y radiografiar adecuadamente en todas las muestras la apófisis coronoides (punto B), involucrada en dichas determinaciones dado que es una estructura ósea muy delicada en ratas con 33 días de vida. Esta dificultad podría haber influenciado la diferencia observada.

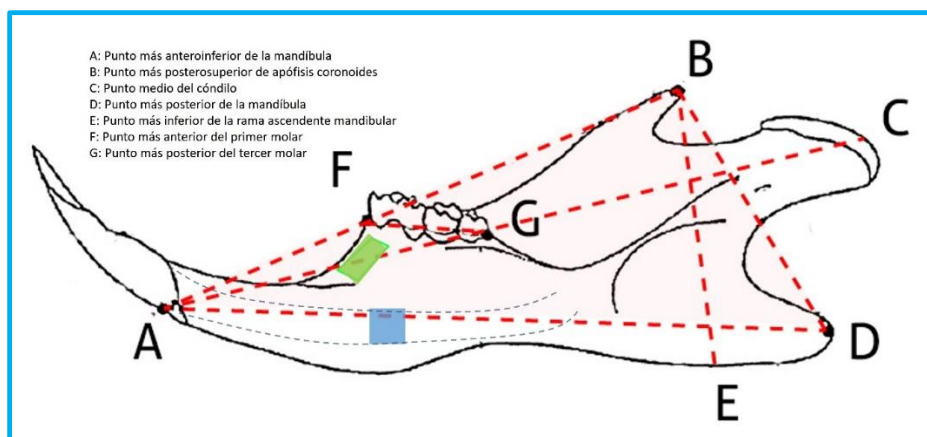


Figura 36 Mediciones macroscópicas realizadas en hemimandíbula

La distancia F–G mostró una media de $5,84 \pm 0,11$ mm en el grupo control y de $5,57 \pm 0,25$ mm en el grupo cafeína, lo que equivale a una disminución del 4,6 % con respecto al control ($p = 0,0063$). Aunque esta diferencia fue estadísticamente significativa, su magnitud es pequeña si la comparamos con las variaciones de longitud ósea o resistencia mecánica reportadas en modelos animales. Por ejemplo, en estudios de osteoporosis en ratas se ha demostrado que una reducción del 10 % en la resistencia máxima del hueso tibial ya se considera clínicamente relevante, pues compromete la integridad estructural y la función mecánica.¹²⁸

Hasta donde sabemos, no existen estudios que midan exactamente la distancia F–G tal como la definimos en nuestra metodología; sin embargo, podemos inferir que una variación inferior al 5 % en esta dimensión no redundaría en un deterioro funcional detectable ni en cambios macroscópicos relevantes. En consecuencia, aunque la administración de cafeína produjo un acortamiento leve de la región molar posterior, este efecto por sí solo no parece traducirse en una repercusión clínica significativa en el modelo de rata.

Estos resultados son consistentes con la ausencia de diferencia de peso en las ratas, ya que una alteración en medidas macroscópicas morfométricas sería un hallazgo con un impacto fuerte en el desarrollo de las ratas y se vería reflejado en una alteración de su peso. En los estudios previos que describen alteraciones en el desarrollo óseo asociadas al consumo de cafeína, los autores suelen enfatizar que las dosis administradas o ingeridas son considerablemente elevadas, por lo general superiores a 300 mg/día. Esta alta exposición farmacológica es señalada como un factor clave para la aparición de efectos adversos en la formación y mineralización ósea.^{94,99,100} Por otro lado, las diferencias significativas encontradas en el parámetro Incisivo y Molar, donde lo que se está midiendo es la densidad

de los tejidos dentarios (esmalte y dentina) se corresponde con los hallazgos encontrados en pruebas histológicas y biomecánicas, observándose una mayor densidad en los grupos que consumieron cafeína.

8.2 Resistencia ósea

Los ensayos de flexión a tres puntos mostraron que los grupos expuestos a cafeína tuvieron un incremento significativo en los principales parámetros biomecánicos (fuerza máxima, punto de fractura y rigidez) con respecto al control ($p < 0,05$). No se detectaron diferencias entre el grupo con cafeína y el de cafeína concentrada en ninguno de estos indicadores.

La hemimandíbula de la rata contiene un incisivo de crecimiento continuo que recorre prácticamente toda la longitud del cuerpo mandibular. Dada la alta densidad mineral del esmalte y la dentina, este diente puede sesgar la respuesta biomecánica global de la mandíbula completa. De hecho, nuestros análisis radiográficos e histológicos revelaron que los animales tratados con cafeína mostraron mayor densidad mineral en el incisivo, mayor población de células ameloblásticas y odontoblásticas, y un incremento en la aposición dentinaria. Por lo tanto, es plausible que el aumento observado en la fuerza máxima, el punto de fractura y la rigidez se deba, al menos en parte, a la contribución estructural de un incisivo más mineralizado, más que a cambios exclusivos en el hueso cortical mandibular.

Estudios previos en hueso esquelético de rata han reportado que el consumo de cafeína tiende a reducir la resistencia mecánica ósea.^{129,130,131} Sin embargo, al evaluar la hemimandíbula completa mediante flexión a tres puntos, la presencia de un incisivo con mayor densidad mineral podría enmascarar o incluso superar ese efecto debilitante. Para aislar el comportamiento del hueso cortical sin la influencia del incisivo, en futuros experimentos sería recomendable realizar la prueba en secciones libres de diente o excluir la región dentaria de la zona de soporte y carga.

8.3 Histomorfometría

Cóndilo mandibular

La mandíbula es un elemento óseo con la particularidad de tener dos tipos de crecimiento diferentes, por un lado, el crecimiento aposicional en el cuerpo y rama mandibular y por otro lado un crecimiento endocondral en el cóndilo. El crecimiento endocondral, también

encontrado en los huesos largos, presenta un cartílago de crecimiento, elemento anatómico característico donde se pueden realizar mediciones histológicas precisas de sus capas. Estudios previos en huesos largos encontraron una asociación negativa en el consumo de cafeína y el desarrollo endocondral de huesos largos. Hay que tener en cuenta que las dosis utilizadas en estos estudios son considerablemente altas (≥ 100 mg/kg/día).^{132,133,134}

Los resultados del presente estudio indican que la exposición a cafeína tiene un impacto negativo en el espesor de las capas del cartílago de crecimiento del cóndilo mandibular en ratas jóvenes. En particular, se observó una disminución significativa en el espesor de la capa fibrosa, proliferativa e hipertrófica en el grupo tratado con cafeína (25mg/kg/día) en comparación con el grupo control.

El hecho de que el espesor total del cartílago de crecimiento también se vea significativamente reducido en el grupo tratado con cafeína refuerza la idea de que la cafeína puede tener un efecto generalizado inhibitorio sobre la actividad condrogénica en esta región. Dado que el cartílago del cóndilo es esencial para el crecimiento, estos resultados sugieren que la cafeína podría afectar negativamente el desarrollo mandibular durante períodos críticos de crecimiento.

La diferencia significativa en el espesor de la capa hipertrófica y en el espesor total entre los grupos Cafeína y Cafeína+ sugiere que la exposición a altas concentraciones de cafeína podría mitigar parcialmente algunos de los efectos inhibitorios observados en el grupo Cafeína. Esto podría deberse a mecanismos compensatorios o a diferencias en la absorción, metabolismo o efectos locales de la cafeína en el cóndilo mandibular.

Estos resultados concuerdan con estudios previos que han demostrado que la cafeína puede interferir con el crecimiento óseo y la diferenciación celular en el cartílago. Por ejemplo, se ha reportado que la cafeína afecta la proliferación de condrocitos y la actividad de las células óseas en otros modelos animales, lo que podría explicar los efectos observados en el presente estudio. La reducción del grosor de la capa proliferativa, en particular, podría estar relacionada con una disminución de la actividad mitótica de los condrocitos, mientras que la reducción en la capa hipertrófica podría reflejar un impacto directo en la osificación endocondral.^{101 101 102}

Odontoblastos y ameloblastos

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que la exposición a cafeína, especialmente en concentraciones más altas, tiene un impacto significativo en la cantidad de odontoblastos y ameloblastos en comparación con el grupo control. Específicamente, se observó un aumento significativo en el número de odontoblastos en el grupo tratado con cafeína concentrada (Cafeína+) en comparación tanto con el grupo control como con el grupo que recibió cafeína en bajas concentraciones. Estos hallazgos sugieren que la cafeína en altas concentraciones puede estimular la proliferación o actividad de los odontoblastos, lo que podría estar asociado con procesos de reparación dental.

De manera similar, se encontró que los ameloblastos también mostraron un incremento significativo en el grupo de cafeína concentrada en comparación con los otros grupos. Este aumento podría indicar un efecto potenciador de la cafeína en la actividad de los ameloblastos, células esenciales para la formación del esmalte dental. Dado que no se observaron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo tratado con cafeína en bajas concentraciones para ambos tipos de células, esto sugiere que los efectos observados son dependientes de la dosis y no se presentan a niveles de exposición más bajos. No se han encontrado estudios que demuestren un efecto estimulante de la cafeína sobre la proliferación de odontoblastos o ameloblastos, sería valioso explorar esta área en futuras investigaciones. Particularmente, estudios que analicen el efecto de la cafeína en la proliferación de estas células durante el desarrollo dentario podrían proporcionar información relevante para comprender mejor los mecanismos involucrados.

Es importante considerar que, aunque los hallazgos sugieren un impacto positivo de la cafeína en la proliferación de odontoblastos y ameloblastos, el consumo excesivo de cafeína también podría tener efectos adversos.^{103 104 105 106 107} Por lo tanto, futuros estudios deberían centrarse en comprender mejor el equilibrio entre los efectos beneficiosos y perjudiciales de la cafeína en la salud dental, así como en explorar el impacto de diferentes dosis y tiempos de exposición.

Predentina

Los resultados obtenidos sugieren que la ingesta de cafeína durante la gestación podría tener un efecto significativo en el desarrollo del tejido dentario, particularmente en el espesor de

la predentina. Aunque el análisis de ANOVA reveló diferencias significativas entre los grupos, el análisis post-hoc de Tukey no mostró diferencias significativas entre los pares de grupos.

Además del mayor espesor de predentina observado en los grupos tratados con cafeína, se detectó un mayor número de células generadoras de dentina (odontoblastos) y una mayor tasa de aposición de dentina en estos grupos. Estos hallazgos se confirmaron mediante un estudio de histomorfometría dinámica con marcaciones de tetraciclina, lo que indica que la exposición a la cafeína no solo afectó el espesor del tejido dentario, sino también la actividad celular y el ritmo de formación de la dentina.

Estos resultados sugieren que la cafeína podría influir en la actividad de los odontoblastos, las células responsables de la formación de dentina, lo que podría explicar tanto el aumento en el espesor de predentina como la mayor tasa de aposición.

Es importante destacar que la falta de significancia en las comparaciones múltiples entre grupos podría estar relacionada con el tamaño reducido de la muestra, lo que limita el poder estadístico del análisis.

Cresta alveolar

No se encontraron diferencias significativas en la altura del hueso alveolar entre los grupos tratados con cafeína y el grupo control, lo que indica que la exposición a cafeína, incluso en concentraciones más altas, no afecta significativamente la altura de la cresta alveolar en ratas jóvenes. La altura de la cresta alveolar es un marcador importante de salud periodontal, y su disminución puede ser indicativa de pérdida ósea, como se observa en la periodontitis. Sin embargo, los resultados sugieren que la cafeína no afecta la altura del hueso alveolar

Las medias obtenidas para los grupos Control, Cafeína y Cafeína concentrada (Cafeína+) muestran valores relativamente similares, lo que refuerza la idea de que la cafeína, en las dosis y tiempos de exposición utilizados en este estudio, no parece influir en la pérdida ósea alveolar en el espacio entre el primer y segundo molar.

8.4 Histomorfometría dinámica

Los resultados del estudio muestran que la exposición a la cafeína tiene un impacto significativo en la tasa de aposición dentinaria en ratas jóvenes, evaluada mediante histomorfometría dinámica con tetraciclina. Los parámetros T0-T1, T1-T2, T2-T3 y T0-T3

indican cambios en la deposición de dentina en los grupos tratados con cafeína en comparación con el grupo control. Específicamente, se observó un incremento significativo en la distancia T0-T1 en los grupos Cafeína y Cafeína+ en comparación con el grupo Control, lo que sugiere una mayor formación de dentina durante el período evaluado.

Es importante destacar que el parámetro T0-T1 representa la distancia desde los odontoblastos, donde se deposita la dentina nueva, hasta la marca de tetraciclina administrada el día 30 de vida. En esta etapa, las ratas tienen mayor edad y han comenzado a consumir alimentos sólidos, lo cual se traduce en un aumento de la actividad masticatoria en comparación con los períodos anteriores de lactancia exclusiva. Esta mayor actividad masticatoria podría haber contribuido al incremento observado en la tasa de deposición dentinaria.¹³⁵

El parámetro T0-T3, que es la sumatoria del espesor total de las marcas de tetraciclina desde la primera inyección (día 14) hasta la última (día 30), también mostró un aumento significativo en el grupo Cafeína comparado con el grupo Control. La diferencia significativa entre los grupos Cafeína y Cafeína+ sugiere que la concentración de cafeína influye en la magnitud de la deposición dentinaria, con un efecto potencialmente más pronunciado a dosis moderadas. Sin embargo, el efecto se modera a dosis más altas, lo que podría estar relacionado con un umbral fisiológico para la respuesta al estímulo de la cafeína.

Estos hallazgos están en línea con estudios previos que sugieren que la cafeína puede tener efectos variables en el metabolismo de los tejidos duros, como el hueso y los tejidos dentarios, dependiendo del contexto fisiológico, la dosis y la duración de la exposición.

9 CONCLUSIONES

La administración de cafeína durante la gestación y lactancia en ratas parece tener efectos diferenciados en el desarrollo dentario y mandibular de sus crías. Mientras que la cafeína mejora varios parámetros dentarios, como la densidad mineral de los incisivos, la resistencia biomecánica y la proliferación celular en los tejidos dentarios, parece tener un efecto negativo en el cartílago condilar, región mandibular con un desarrollo de tipo endocondral.

Se comprobó un aumento significativo en la densidad mineral y en la resistencia ósea de los incisivos y molares, acompañado de un incremento en la población de odontoblastos y ameloblastos y en la tasa de aposición dentinaria. Este hallazgo confirma que, bajo determinadas concentraciones, la cafeína ejerce un efecto promotor sobre la mineralización y la mecánica de la dentina y el esmalte.

La exposición a cafeína produjo una disminución notable del espesor del cartílago de crecimiento del cóndilo mandibular, afectando sus capas fibrosa, proliferativa e hipertrófica. Dicho efecto revela un impacto negativo sobre el crecimiento endocondral, lo que sugiere una modulación de la actividad condrogénica por parte de la cafeína.

Los efectos sobre odontoblastos, ameloblastos y deposición de dentina fueron más pronunciados en dosis altas, mientras que en dosis moderadas se observó una respuesta óptima sin descenso pronunciado. La variación entre dosis bajas, moderadas y altas apunta a mecanismos compensatorios o diferencias en la absorción/metabolismo de la cafeína en tejidos mandibulares.

Por último, no se detectaron cambios significativos en la altura de la cresta alveolar, lo que indica que, dentro de los rangos estudiados, la cafeína no compromete la salud periodontal. Estos resultados aportan evidencia original sobre los efectos duales de la cafeína en el desarrollo dentario y mandibular, sentando las bases para futuras investigaciones y aplicaciones en salud dental.

10 REFERENCIAS

-
- 1 Nanci, A. (2018). *Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure, and Function* (9th ed.). Elsevier.
 - 2 Gómez de Ferraris, M. E., & Campos Muñoz, A. (2002). *Histología y embriología bucodental* (2ª ed.). Madrid: Editorial Médica Panamericana.
 - 3 Fejerskov, O., & Kidd, E. A. M. (2008). *Dental Caries: The Disease and Its Clinical Management* (2nd ed.). Wiley-Blackwell.
 - 4 Goldberg, M. (2014). *The dental pulp: Biology, pathology, and regenerative therapies*. Springer.
 - 5 Smith, A. J. (2002). Pulpal Responses to Caries and Dental Repair. In Hargreaves & Goodis' Seltzer and Bender's Dental Pulp. Quintessence Publishing Co.
 - 6 Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res.* 2009;88(9):792-806. doi:10.1177/0022034509340867
 - 7 Jontell M, Okiji T, Dahlgren U, Bergenholtz G. Immune defense mechanisms of the dental pulp. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1998;9(2):179-200. doi:10.1177/10454411980090020301
 - 8 Murray PE, About I, Franquin JC, Remusat M, Smith AJ. Restorative pulpal and repair responses [published correction appears in *J Am Dent Assoc* 2001 Aug;132(8):1095]. *J Am Dent Assoc.* 2001;132(4):482-491. doi:10.14219/jada.archive.2001.0211
 - 9 Bergenholtz, G., & Hørsted-Bindslev, P. (2013). *Textbook of Endodontology* (3rd ed.). Wiley-Blackwell.
 - 10 Goldberg M, Kulkarni AB, Young M, Boskey A. Dentin: structure, composition and mineralization. *Front Biosci (Elite Ed).* 2011;3(2):711-735. Published 2011 Jan 1. doi:10.2741/e281
 - 11 Lee M, Lee YS, Shon WJ, Park JC. Physiologic dentin regeneration: its past, present, and future perspectives. *Front Physiol.* 2023;14:1313927. Published 2023 Dec 11. doi:10.3389/fphys.2023.1313927
 - 12 Pashley DH. Dentine permeability and its role in the pathobiology of dentine sensitivity. *Arch Oral Biol.* 1994;39 Suppl:73S-80S. doi:10.1016/0003-9969(94)90191-0
 - 13 Ciucchi B, Bouillaguet S, Holz J, Pashley D. Dentinal fluid dynamics in human teeth, in vivo. *J Endod.* 1995;21(4):191-194. doi:10.1016/S0099-2399(06)80564-9
 - 14 Arola DD, Gao S, Zhang H, Masri R. The Tooth: Its Structure and Properties. *Dent Clin North Am.* 2017;61(4):651-668. doi:10.1016/j.cden.2017.05.001
 - 15 Yu T, Klein OD. Molecular and cellular mechanisms of tooth development, homeostasis and repair. *Development.* 2020;147(2):dev184754. Published 2020 Jan 24. doi:10.1242/dev.184754
 - 16 Chen S, Xie H, Zhao S, Wang S, Wei X, Liu S. The Genes Involved in Dentinogenesis. *Organogenesis.* 2022;18(1):1-19. doi:10.1080/15476278.2021.2022373
 - 17 Bleicher F. Odontoblast physiology. *Exp Cell Res.* 2014;325(2):65-71. doi:10.1016/j.yexcr.2013.12.012
 - 18 Garcés-Ortíz M, Ledesma-Montes C, Reyes-Gasga J. Presence of matrix vesicles in the body of odontoblasts and in the inner third of dentinal tissue: a scanning electron microscopic study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2013;18(3):e537-e541. Published 2013 May 1. doi:10.4317/medoral.18650
 - 19 Kinney JH, Habelitz S, Marshall SJ, Marshall GW. The importance of intrafibrillar mineralization of collagen on the mechanical properties of dentin. *J Dent Res.* 2003;82(12):957-961. doi:10.1177/154405910308201204
 - 20 Bevelander G, Nakahara H. The formation and mineralization of dentin. *Anat Rec.* 1966;156:303-323. doi:10.1002/ar.1091560306.

-
- 21 Linde A. Dentin mineralization and the role of odontoblasts in calcium transport. *Connect Tissue Res.* 1995;33(1-3):163-170. doi:10.3109/03008209509016997
- 22 Lacruz RS, Habelitz S, Wright JT, Paine ML. Dental enamel formation and implications for oral health and disease. *Physiol Rev.* 2017;97(3):939-993. doi:10.1152/physrev.00030.2016
- 23 Sarna-Boś K, Boguta P, Skic K, et al. Physicochemical Properties and Surface Characteristics of Ground Human Teeth. *Molecules.* 2022;27(18):5852. Published 2022 Sep 9. doi:10.3390/molecules27185852
- 24 Beniash E, Stifler CA, Sun CY, et al. The hidden structure of human enamel. *Nat Commun.* 2019;10(1):4383. Published 2019 Sep 26. doi:10.1038/s41467-019-12185-7
- 25 Boyde A. The development of enamel structure. *Proc R Soc Med.* 1967;60(9):923-928. doi:10.1177/003591576706000965
- 26 Gibson CW. The Amelogenin Proteins and Enamel Development in Humans and Mice. *J Oral Biosci.* 2011;53(3):248-256. doi:10.2330/joralbiosci.53.248
- 27 Warshawsky H, Smith CE. A three-dimensional reconstruction of the rods in rat maxillary incisor enamel. *Anat Rec.* 1971;169(3):585-591. doi:10.1002/ar.1091690308
- 28 Smith CE. Cellular and chemical events during enamel maturation. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1998;9(2):128-161. doi:10.1177/10454411980090020101
- 29 Paine ML, Luo W, Wang HJ, et al. Dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein overexpression during amelogenesis. *J Biol Chem.* 2005;280(36):31991-31998. doi:10.1074/jbc.M502991200
- 30 Wen SL. Human enamel structure studied by high resolution electron microscopy. *Electron Microscop Rev.* 1989;2(1):1-16. doi:10.1016/0892-0354(89)90008-7
- 31 Simmer JP, Hu JC. Dental enamel formation and its impact on clinical dentistry. *J Dent Educ.* 2001;65(9):896-905.
- 32 Cui FZ, Ge J. New observations of the hierarchical structure of human enamel, from nanoscale to microscale. *J Tissue Eng Regen Med.* 2007;1(3):185-191. doi:10.1002/term.21
- 33 Bosshardt DD, Selvig KA. Dental cementum: the dynamic tissue covering of the root. *Periodontol* 2000. 1997;13:41-75. doi:10.1111/j.1600-0757.1997.tb00095.x
- 34 Lindhe J, Lang NP, Karring T. *Textbook of Clinical Periodontology.* 5th ed. Wiley-Blackwell; 2008.
- 35 Newman MG, Takei H, Klokkevold PR, Carranza FA. *Carranza's Clinical Periodontology.* 12th ed. Saunders; 2015.
- 36 Ross MH, Pawlina W. *Histology: A Text and Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology.* 8th ed. Wolters Kluwer; 2020.
- 37 Standring S. *Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice.* 42nd ed. Elsevier; 2020.
- 38 Robling AG, Stout SD. Histomorphometry of human cortical bone: applications to age estimation. In: Katzenberg MA, Saunders SR, eds. *Biological Anthropology of the Human Skeleton.* 2nd ed. Wiley-Liss; 2007:187-213. doi:10.1002/9780470245842.ch5
- 39 Mundy GR. *Bone Remodeling and Its Disorders.* 2nd ed. CRC Press; 1999.
- 40 Boskey AL, Robey PG. The composition of bone. In: Rosen CJ, ed. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism.* 8th ed. Wiley-Blackwell; 2013:49-58. doi:10.1002/9781118453926.ch6.
- 41 Yahara Y, Nguyen T, Ishikawa K, Kamei K, Alman BA. The origins and roles of osteoclasts in bone development, homeostasis and repair. *Development.* 2022;149(8):dev199908. doi:10.1242/dev.199908

-
- 42 Raggatt LJ, Partridge NC. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J Biol Chem.* 2010;285(33):25103-25108. doi:10.1074/jbc.R109.041087
- 43 Hall BK, Miyake T. All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. *Bioessays.* 2000;22(2):138-147. doi:10.1002/(SICI)1521-1878(200002)22:2<138::AID-BIES5>3.0.CO;2-4
- 44 Fawcett DW. *A Textbook of Histology.* 12^a ed. Chapman & Hall; 1994.
- 45 Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science.* 2000;289(5484):1504-1508. doi:10.1126/science.289.5484.1504
- 46 Martin TJ, Seeman E. Bone remodelling: its local regulation and the emergence of bone fragility. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2008;22(5):701-722. doi:10.1016/j.beem.2008.07.006
- 47 Nelson SJ, ed. *Wheeler's Dental Anatomy, Physiology, and Occlusion.* 11^a ed. Elsevier; 2019.
- 48 Okeson JP. *Management of Temporomandibular Disorders and Occlusion.* 7th ed. Mosby; 2013.
- 49 Ingawalé S, Goswami T. Temporomandibular joint: disorders, treatments, and biomechanics. *Ann Biomed Eng.* 2009;37(5):976-996. doi:10.1007/s10439-009-9659-4
- 50 Berglundh T, Giannobile WV, Lang NP, Sanz M, eds. *Lindhe's Clinical Periodontology and Implant Dentistry.* 7th ed. Wiley-Blackwell; 2021.
- 51 Tanaka M, Ejiri S, Kohno S, Ozawa H. Region-specific bone mass changes in rat mandibular condyle following ovariectomy. *J Dent Res.* 2000;79(11):1907-1913. doi:10.1177/00220345000790111601
- 52 Klingenberg CP, Barluenga M, Meyer A. Shape analysis of symmetric structures: quantifying variation among individuals and asymmetry. *Evolution.* 2002;56(10):1909-1920. doi:10.1111/j.0014-3820.2002.tb00117.x
- 53 Nishijima K, Kuwahara S, Ohno T, et al. Occlusal tooth wear in male F344/N rats with aging. *Arch Gerontol Geriatr.* 2009;48(2):178-181. doi:10.1016/j.archger.2008.01.006
- 54 Rouvière H, Delmas A. *Anatomía humana: Descriptiva, topográfica y funcional.* Tomo 1: Cabeza y cuello. 11^a ed. Delmas V, ed. Elsevier Masson; 2005.
- 55 Lipski M, Tomaszewska IM, Lipska W, Lis GJ, Tomaszewski KA. The mandible and its foramen: anatomy, anthropology, embryology and resulting clinical implications. *Folia Morphol (Warsz).* 2013;72(4):285-292. doi:10.5603/fm.2013.0048
- 56 Maynard RL, Downes N. *Anatomy and Histology of the Laboratory Rat in Toxicology and Biomedical Research.* Academic Press; 2019.
- 57 Kim HJ, Park KM, Tak HJ, et al. Skeletal unit construction of rat mandible based on the masticatory muscle anatomy and double microcomputed tomography. *Anat Histol Embryol.* 2018;47(5):417-427. doi:10.1111/ahe.12374
- 58 Venegas C, Arias A, Dias FJ, Garay I, Navarro P, Fuentes R. Morphometric characteristics of rat mandibular bone: radiologic study of a widely used animal as experimental model through CBCT. *Int J Morphol.* 2022;40(6):1420-1425.
- 59 Brezová V, Šlebodová A, Staško A. Coffee as a source of antioxidants: An EPR study. *Food Chem.* 2009;114(3):859-868.
- 60 van Dam RM, Hu FB, Willett WC. Coffee, Caffeine, and Health. *N Engl J Med.* 2020;383(4):369-378. doi:10.1056/NEJMra1816604
- 61 Olmos V, Bardoni N, Ridolfi AS, Villaamil Lepori EC. Caffeine levels in beverages from Argentina's market: application to caffeine dietary intake assessment. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 2009;26(3):275-281. doi:10.1080/02652030802430649

-
- 62 Verster JC, Koenig J. Caffeine intake and its sources: A review of national representative studies. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2018;58(8):1250-1259. doi:10.1080/10408398.2016.1247252
- 63 Denaro CP, Brown CR, Wilson M, Jacob P 3rd, Benowitz NL. Dose-dependency of caffeine metabolism with repeated dosing. *Clin Pharmacol Ther*. 1990;48(3):277-285. doi:10.1038/clpt.1990.150
- 64 Arnaud MJ. The pharmacology of caffeine. *Prog Drug Res*. 1987;31:273-313. doi:10.1007/978-3-0348-9289-6_9
- 65 Birkett DJ, Miners JO. Caffeine renal clearance and urine caffeine concentrations during steady state dosing. Implications for monitoring caffeine intake during sports events. *Br J Clin Pharmacol*. 1991;31(4):405-408. doi:10.1111/j.1365-2125.1991.tb05553.x
- 66 Cappelletti S, Piacentino D, Sani G, Aromatario M. Caffeine: cognitive and physical performance enhancer or psychoactive drug? [published correction appears in *Curr Neuropharmacol*. 2015;13(4):554. Daria, Piacentino *Curr Neuropharmacol*. 2015;13(1):71-88. doi:10.2174/1570159X13666141210215655
- 67 Aranda JV, Collinge JM, Zinman R, Watters G. Maturation of caffeine elimination in infancy. *Arch Dis Child*. 1979;54(12):946-949. doi:10.1136/adc.54.12.946
- 68 Arnaud MJ. Metabolism of caffeine and other components of coffee. En: Garattini S, ed. *Caffeine, Coffee and Health*. Raven Press; 1993:43-95.
- 69 Baggott MJ, Childs E, Hart AB, et al. Psychopharmacology of theobromine in healthy volunteers. *Psychopharmacology (Berl)*. 2013;228(1):109-118. doi:10.1007/s00213-013-3021-0
- 70 Grosso LM, Bracken MB. Caffeine metabolism, genetics, and perinatal outcomes: a review of exposure assessment considerations during pregnancy. *Ann Epidemiol*. 2005;15(6):460-466. doi:10.1016/j.annepidem.2004.12.011
- 71 Yang A, Palmer AA, de Wit H. Genetics of caffeine consumption and responses to caffeine. *Psychopharmacology (Berl)*. 2010;211(3):245-257. doi:10.1007/s00213-010-1900-1
- 72 Vilarim MM, Rocha Araujo DM, Nardi AE. Caffeine challenge test and panic disorder: a systematic literature review. *Expert Rev Neurother*. 2011;11(8):1185-1195. doi:10.1586/ern.11.83
- 73 Azam S, Hadi N, Khan NU, Hadi SM. Antioxidant and prooxidant properties of caffeine, theobromine and xanthine. *Med Sci Monit*. 2003;9(9):BR325-BR330.
- 74 Wikoff D, Welsh BT, Henderson R, et al. Systematic review of the potential adverse effects of caffeine consumption in healthy adults, pregnant women, adolescents, and children. *Food Chem Toxicol*. 2017;109(Pt 1):585-648. doi:10.1016/j.fct.2017.04.002
- 75 Nawrot P, Jordan S, Eastwood J, Rotstein J, Hugenholtz A, Feeley M. Effects of caffeine on human health. *Food Addit Contam*. 2003;20(1):1-30. doi:10.1080/0265203021000007840
- 76 Saraiva SM, Jacinto TA, Gonçalves AC, Gaspar D, Silva LR. Overview of Caffeine Effects on Human Health and Emerging Delivery Strategies. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2023;16(8):1067. Published 2023 Jul 27. doi:10.3390/ph16081067
- 77 Bergman EA, Massey LK, Wise KJ, Sherrard DJ. Effects of dietary caffeine on renal handling of minerals in adult women. *Life Sci*. 1990;47(6):557-564. doi:10.1016/0024-3205(90)90616-y
- 78 Massey LK, Whiting SJ. Caffeine, urinary calcium, calcium metabolism and bone. *J Nutr*. 1993;123(9):1611-1614. doi:10.1093/jn/123.9.1611
- 79 Barger-Lux MJ, Heaney RP, Stegman MR. Effects of moderate caffeine intake on the calcium economy of premenopausal women [published correction appears in *Am J Clin Nutr* 1991 Jan;53(1):182]. *Am J Clin Nutr*. 1990;52(4):722-725. doi:10.1093/ajcn/52.4.722

-
- 80 Hasling C, Søndergaard K, Charles P, Mosekilde L. Calcium metabolism in postmenopausal osteoporotic women is determined by dietary calcium and coffee intake. *J Nutr.* 1992;122(5):1119-1126. doi:10.1093/jn/122.5.1119
- 81 Harris SS, Dawson-Hughes B. Caffeine and bone loss in healthy postmenopausal women. *Am J Clin Nutr.* 1994;60(4):573-578. doi:10.1093/ajcn/60.4.573
- 82 Ferrini RL, Barrett-Connor E. Caffeine intake and endogenous sex steroid levels in postmenopausal women. The Rancho Bernardo Study. *Am J Epidemiol.* 1996;144(7):642-644. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a008975
- 83 Travers-Gustafson D, Stegman MR, Heaney RP, Recker RR. Ultrasound, densitometry, and extraskeletal appendicular fracture risk factors: a cross-sectional report on the Saunders County Bone Quality Study. *Calcif Tissue Int.* 1995;57(4):267-271. doi:10.1007/BF00298881
- 84 Hernandez-Avila M, Colditz GA, Stampfer MJ, Rosner B, Speizer FE, Willett WC. Caffeine, moderate alcohol intake, and risk of fractures of the hip and forearm in middle-aged women. *Am J Clin Nutr.* 1991;54(1):157-163. doi:10.1093/ajcn/54.1.157
- 85 Grosso G, Godos J, Galvano F, Giovannucci EL. Coffee, Caffeine, and Health Outcomes: An Umbrella Review. *Annu Rev Nutr.* 2017;37:131-156. doi:10.1146/annurev-nutr-071816-064941
- 86 Heaney RP. Effects of caffeine on bone and the calcium economy. *Food Chem Toxicol.* 2002;40(9):1263-1270. doi:10.1016/s0278-6915(02)00094-7
- 87 Lee DR, Lee J, Rota M, et al. Coffee consumption and risk of fractures: a systematic review and dose-response meta-analysis. *Bone.* 2014;63:20-28. doi:10.1016/j.bone.2014.02.007
- 88 Olchowik G, Chadaj-Polberg E, Tomaszewski M, Polberg M, Tomaszewska M. The influence of caffeine on the biomechanical properties of bone tissue during pregnancy in a population of rats. *Folia Histochem Cytobiol.* 2011;49(3):504-511. doi:10.5603/fhc.2011.0071
- 89 Shangquan Y, Jiang H, Pan Z, et al. Glucocorticoid mediates prenatal caffeine exposure-induced endochondral ossification retardation and its molecular mechanism in female fetal rats. *Cell Death Dis.* 2017;8(10):e3157. Published 2017 Oct 26. doi:10.1038/cddis.2017.546
- 90 Furuhashi N, Sato S, Suzuki M, Hiruta M, Tanaka M, Takahashi T. Effects of caffeine ingestion during pregnancy. *Gynecol Obstet Invest.* 1985;19(4):187-191. doi:10.1159/000299032
- 91 Durrant KL. Known and hidden sources of caffeine in drug, food, and natural products. *J Am Pharm Assoc (Wash).* 2002;42(4):625-637. doi:10.1331/108658002763029607
- 92 Fortier I, Marcoux S, Beaulac-Baillargeon L. Relation of caffeine intake during pregnancy to intrauterine growth retardation and preterm birth. *Am J Epidemiol.* 1993;137(9):931-940. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a116763
- 93 Rondó PH, Rodrigues LC, Tomkins AM. Coffee consumption and intrauterine growth retardation in Brazil. *Eur J Clin Nutr.* 1996;50(11):705-709.
- 94 Watkinson B, Fried PA. Maternal caffeine use before, during and after pregnancy and effects upon offspring. *Neurobehav Toxicol Teratol.* 1985;7(1):9-17.
- 95 Kesmodel U, Olsen SF, Secher NJ. Does alcohol increase the risk of preterm delivery?. *Epidemiology.* 2000;11(5):512-518. doi:10.1097/00001648-200009000-00005
- 96 Shu XO, Hatch MC, Mills J, Clemens J, Susser M. Maternal smoking, alcohol drinking, caffeine consumption, and fetal growth: results from a prospective study. *Epidemiology.* 1995;6(2):115-120. doi:10.1097/00001648-199503000-00005
- 97 Santos IS, Victora CG, Huttly S, Carvalhal JB. Caffeine intake and low birth weight: a population-based case-control study. *Am J Epidemiol.* 1998;147(7):620-627. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a009502

-
- 98 James JE, Paull I. Caffeine and human reproduction. *Rev Environ Health*. 1985;5(2):151-167.
- 99 Koren G. Caffeine during pregnancy? In moderation [published correction appears in *Can Fam Physician* 2000 Aug;46:1569]. *Can Fam Physician*. 2000;46:801-803.
- 100 Tan Y, Liu J, Deng Y, et al. Caffeine-induced fetal rat over-exposure to maternal glucocorticoid and histone methylation of liver IGF-1 might cause skeletal growth retardation. *Toxicol Lett*. 2012;214(3):279-287. doi:10.1016/j.toxlet.2012.09.007
- 101 Sena Reis AM, Moura Batista AC, de Melo Ocarino N, Serakides R. Effects of caffeine intake in mothers on maternal cortisol levels and offspring endochondral ossification. *Actual Osteol*. 2014;10(1):20-36.
- 102 NISHIMURA H, NAKAI K. Congenital malformations in offspring of mice treated with caffeine. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1960;104:140-142. doi:10.3181/00379727-104-25757
- 103 Driscoll PG, Joseph F Jr, Nakamoto T. Prenatal effects of maternal caffeine intake and dietary high protein on mandibular development in fetal rats. *Br J Nutr*. 1990;63(2):285-292. doi:10.1079/bjn19900115
- 104 Nakamoto T, Shaye R, Mallek HM. Effects of maternal caffeine intake on the growth of rat tooth germs in protein-energy malnourished neonates. *Arch Oral Biol*. 1985;30(2):105-109. doi:10.1016/0003-9969(85)90101-3
- 105 Nakamoto T, Cheuk SL, Yoshino S, Falster AU, Simmons WB. Cariogenic effect of caffeine intake during lactation on first molars of newborn rats. *Arch Oral Biol*. 1993;38(10):919-922. doi:10.1016/0003-9969(93)90103-s
- 106 Hashimoto K, Joseph F Jr, Falster AU, Simmons WB, Nakamoto T. Effects of maternal caffeine intake during lactation on molar enamel surfaces in new-born rats. *Arch Oral Biol*. 1992;37(2):105-109. doi:10.1016/0003-9969(92)90005-s
- 107 Falster AU, Hashimoto K, Nakamoto T, Simmons WB. Physical examination of caffeine's effects on the enamel surface of first molar in new-born rats. *Arch Oral Biol*. 1992;37(2):111-118. doi:10.1016/0003-9969(92)90006-t
- 108 Schneider PE, Alonzo G, Nakamoto T, Falster AU, Simmons WB. Effects of caffeine intake during gestation and lactation on the acid solubility of enamel in weanling rats. *Caries Res*. 1995;29(4):285-290. doi:10.1159/000262083
- 109 Eratalay YK, Simmons DJ, El-Mofty SK, et al. Bone growth in the rat mandible following every-day or alternate-day methylprednisolone treatment schedules. *Arch Oral Biol*. 1981;26(10):769-777. doi:10.1016/0003-9969(81)90172-2
- 110 Jiao K, Dai J, Wang MQ, Niu LN, Yu SB, Liu XD. Age- and sex-related changes of mandibular condylar cartilage and subchondral bone: a histomorphometric and micro-CT study in rats. *Arch Oral Biol*. 2010;55(2):155-163. doi:10.1016/j.archoralbio.2009.11.012
- 111 Wang TM, Shih C. Study of histomorphometric changes of the mandibular condyles in neonatal and juvenile rats after administration of cyclophosphamide. *Acta Anat (Basel)*. 1986;127(2):93-99. doi:10.1159/000146262
- 112 Bouvier M, Hylander WL. The effect of dietary consistency on gross and histologic morphology in the craniofacial region of young rats. *Am J Anat*. 1984;170(1):117-126. doi:10.1002/aja.1001700109
- 113 Weinreb M Jr, Steigman S, Zajicek G, Michaeli Y. Odontoblast turnover in the impeded and unimpeded rat incisor derived from computerized histomorphometry. *Anat Rec*. 1985;211(2):218-225. doi:10.1002/ar.1092110215

-
- 114 Bardellini E, Amadori F, Santoro A, Conti G, Orsini G, Majorana A. Odontoblastic Cell Quantification and Apoptosis within Pulp of Deciduous Teeth Versus Pulp of Permanent Teeth. *J Clin Pediatr Dent.* 2016;40(6):450-455. doi:10.17796/1053-4628-40.6.450
- 115 Murray PE, Matthews JB, Sloan AJ, Smith AJ. Analysis of incisor pulp cell populations in Wistar rats of different ages. *Arch Oral Biol.* 2002;47(10):709-715. doi:10.1016/s0003-9969(02)00055-9
- 116 Aguirre JI, Akhter MP, Kimmel DB, et al. Enhanced alveolar bone loss in a model of non-invasive periodontitis in rice rats. *Oral Dis.* 2012;18(5):459-468. doi:10.1111/j.1601-0825.2011.01893.x
- 117 Aguirre JI, Akhter MP, Neuville KG, et al. Age-related periodontitis and alveolar bone loss in rice rats. *Arch Oral Biol.* 2017;73:193-205. doi:10.1016/j.archoralbio.2016.10.018
- 118 Bak EJ, Park HG, Kim M, et al. The effect of metformin on alveolar bone in ligature-induced periodontitis in rats: a pilot study. *J Periodontol.* 2010;81(3):412-419. doi:10.1902/jop.2009.090414
- 119 Pautke C, Vogt S, Kreutzer K, et al. Characterization of eight different tetracyclines: advances in fluorescence bone labeling. *J Anat.* 2010;217(1):76-82. doi:10.1111/j.1469-7580.2010.01237.x
- 120 Sebaoun JD, Kantarci A, Turner JW, Carvalho RS, Van Dyke TE, Ferguson DJ. Modeling of trabecular bone and lamina dura following selective alveolar decortication in rats. *J Periodontol.* 2008;79(9):1679-1688. doi:10.1902/jop.2008.080024
- 121 Vignery A, Baron R. Dynamic histomorphometry of alveolar bone remodeling in the adult rat. *Anat Rec.* 1980;196(2):191-200. doi:10.1002/ar.1091960210
- 122 Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, 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(1):2-17. doi:10.1002/jbmr.1805
- 123 Wang J, Muir AM, Ren Y, Massoudi D, Greenspan DS, Feng JQ. Essential Roles of Bone Morphogenetic Protein-1 and Mammalian Toll-like 1 in Postnatal Root Dentin Formation. *J Endod.* 2017;43(1):109-115. doi:10.1016/j.joen.2016.09.007
- 124 Liu J, Zhou H, Fan W, et al. Melatonin influences proliferation and differentiation of rat dental papilla cells in vitro and dentine formation in vivo by altering mitochondrial activity. *J Pineal Res.* 2013;54(2):170-178. doi:10.1111/jpi.12002
- 125 Surma S, Witek A. Coffee consumption during pregnancy - what the gynecologist should know? Review of the literature and clinical studies. *Ginekol Pol.* 2022;93(7):591-600. doi:10.5603/GP.a2022.0061
- 126 Grosso LM, Bracken MB. Caffeine metabolism, genetics, and perinatal outcomes: a review of exposure assessment considerations during pregnancy. *Ann Epidemiol.* 2005;15(6):460-466. doi:10.1016/j.annepidem.2004.12.011
- 127 Shangguan Y, Jiang H, Pan Z, et al. Glucocorticoid mediates prenatal caffeine exposure-induced endochondral ossification retardation and its molecular mechanism in female fetal rats. *Cell Death Dis.* 2017;8(10):e3157. Published 2017 Oct 26. doi:10.1038/cddis.2017.546
- 128 Peng Z, Tuukkanen J, Zhang H, Jämsä T, Väänänen HK. The mechanical strength of bone in different rat models of experimental osteoporosis. *Bone.* 1994;15(5):523-532. doi:10.1016/8756-3282(94)90276-3
- 129 Ohta M, Cheuk G, Thomas KA, et al. Effects of caffeine on the bones of aged, ovariectomized rats. *Ann Nutr Metab.* 1999;43(1):52-59. doi:10.1159/000012767
- 130 Ohta M, Ide K, Cheuk G, et al. A caffeine diet can alter the mechanical properties of the bones of young ovariectomized rats. *Ann Nutr Metab.* 2002;46(3-4):108-113. doi:10.1159/000063078
- 131 Huang TH, Yang RS, Hsieh SS, Liu SH. Effects of caffeine and exercise on the development of bone: a densitometric and histomorphometric study in young Wistar rats. *Bone.* 2002;30(1):293-299. doi:10.1016/s8756-3282(01)00659-7

132 Shin J, Choi Y, Kim J, et al. High doses of caffeine reduce in vivo osteogenic activity in prepubertal rats. *J Anat.* 2015;227(1):10-20. doi:10.1111/joa.12332

133 Shangguan Y, Jiang H, Pan Z, et al. Glucocorticoid mediates prenatal caffeine exposure-induced endochondral ossification retardation and its molecular mechanism in female fetal rats. *Cell Death Dis.* 2017;8(10):e3157. Published 2017 Oct 26. doi:10.1038/cddis.2017.546

134 Barone LM, Tassinari MS, Bortell R, et al. Inhibition of induced endochondral bone development in caffeine-treated rats. *J Cell Biochem.* 1993;52(2):171-182. doi:10.1002/jcb.240520209

135 Zhao Y, Ge W, Chen H, Yang Y, Xu Z. The effect of a soft diet on molar dentin formation during the occlusal establishment period. *Arch Oral Biol.* 2024;158:105858. doi:10.1016/j.archoralbio.2023.105858