

# Efectos del Cloruro de Cobalto sobre el Epitelio de Unión y Epitelio Reducido del Esmalte del Primer Molar Superior de Rata

Effects of Cobalt Chloride in Junctional Epithelium and Reduced Enamel Epithelium of the Rat Maxillary First Molar

\*Ana Luiza de C. Felippini; \*\*Ruberval Armando Lopes; \*Miguel Angel Sala;  
\*\*\*I-Sei Watanabe; \*Túlio Roberto V.P. Lopes; \*João Paulo M. Issa & \*José Paulo Ribas

---

FELIPPINI, A. L.; LOPES, R. A.; SALA, M. A.; WATANABE, I.; LOPES, T. R. V. P.; ISSA, J. P. M. & RIBAS, J. P. Efectos del cloruro de cobalto sobre el epitelio de unión y epitelio reducido del esmalte del primer molar superior de rata. *Int. J. Morphol.*, 27(4): 1081-1088, 2009.

**RESUMEN:** El cobalto es uno de los principales componentes de las aleaciones metálicas fundidas, usadas frecuentemente en odontología. El metal es el constituyente de 45 a 70% de los trabajos protéticos. En virtud de la existencia de evidencias que elementos metálicos pueden causar toxicidad sistémica y local, este trabajo tuvo como objetivo evaluar los efectos del cobalto sobre el epitelio de unión y el epitelio del esmalte del primer molar superior de rata, durante la lactancia. Con esa finalidad fueron usadas ratas con 1 día de vida postnatal, cuyas madres recibieron 300 mg de cloruro de cobalto por litro de agua destilada en el bebedero, durante a la lactancia. Al cabo de 21 días, las crías fueron sacrificadas con sobredosis anestésica. Las cabezas fueron separadas, fijadas en "alfac", descalcificadas e incluidas en parafina. Fueron utilizados cortes frontales seriados teñidos con hematoxilina y eosina. Fueron estimados los siguientes parámetros nucleares: diámetros mayor, menor y geométrico medio, relación entre diámetros, perímetro, área, volumen, relación entre volumen y área, excentricidad, coeficiente de forma e índice de contorno. Mediante métodos estereológicos fueron evaluados: relación núcleo/citoplasma, volumen celular, densidad numérica celular, relación superficie externa/camada basal, espesor de las capas epiteliales y densidad de superficie. Todos los datos obtenidos fueron sometidos a análisis estadístico mediante la prueba no-paramétrica de Wilcoxon-Mann-Whitney. Los núcleos de los tejidos estudiados mostraron valores menores para diámetros, perímetro, área, volumen y relación volumen/área. Estereológicamente, fue posible observar en el epitelio de unión y en el epitelio reducido del esmalte, células menores con citoplasma más escaso, lo que se refleja en mayor número de células por mm<sup>3</sup> de tejido. En este estudio, el cobalto ocasionó un cuadro de atrofia epitelial, sugiriendo una acción directa sobre los epitelios de unión y del esmalte.

**PALABRAS CLAVE:** Cobalto; Rata; Lactancia; Epitelio de Unión; Epitelio Reducido del Esmalte.

---

## INTRODUCCIÓN

El cobalto es un metal pesado y uno de los componentes principales de las aleaciones metálicas fundidas más frecuentemente usadas en odontología. El metal es componente de 45 a 70% de los trabajos protéticos, como coronas, prótesis parciales fijas y prótesis parciales removibles (Leghissa *et al.*, 1994; Ferreira *et al.*, 2003).

Una de las características más importantes de una aleación fundida es la corrosión que puede sufrir (Wataha, 2000). El ambiente húmedo de la cavidad bucal es un medio favora-

ble para la ocurrencia de este fenómeno (Lassila & Vallittu, 1998). La interacción de las aleaciones con los fluidos bucales causa la ionización y consecuente degradación y disolución de los iones metálicos constituyentes. La acidez del ambiente (debida a los ácidos provenientes del biofilm dental, de los alimentos y del metabolismo microbioso) así como las oscilaciones de temperatura del medio bucal y la abrasión mecánica causada por los alimentos y la masticación pueden aumentar la liberación de esos iones (Suzuki, 1995; Wataha & Lockwood, 1998; Faccioni *et al.*, 2003).

\* Departamento de Morfología, Estomatología y Fisiología, Facultad de Odontología de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

\*\* Curso de Odontología, Universidad de Franca, UNIFRAN, Franca, São Paulo, Brasil.

\*\*\* Departamento de Anatomía, Instituto de Ciencias Biomédicas, USP, São Paulo, Brasil.

Los metales liberados pueden penetrar en los tejidos bucales, llegar al tracto gastrointestinal vía saliva y ser absorbidos en los intestinos, además de poder alcanzar todo el cuerpo, transportados por la linfa y la sangre (Bonda *et al.*, 2001; Ferreira *et al.*). De este modo, la cavidad bucal es el primer contacto de los productos metálicos de la corrosión que pueden, entonces, circular localmente y diseminarse sistémicamente. Algunos estudios demuestran que los iones metálicos atraviesan la membrana plasmática, se ligan a proteínas o enzimas celulares y modulan la expresión de citoquinas, mediando respuestas adversas locales y respuestas tisulares remotas (Catelas *et al.*, 2003; Catelas *et al.*, 2005).

La leche es la forma natural de nutrientes para el recién nacido. El calostro suple las demandas metabólicas del recién nacido durante los tres primeros meses de vida, proveyendo los carbohidratos, proteínas, vitaminas y minerales necesarios para el crecimiento normal de los tejidos (Rossipal *et al.*, 2000; Wappelhorst *et al.*, 2002) así como para la maduración y funcionamiento de diversos sistemas enzimáticos de la cría (Biego *et al.*, 1998).

La ocitocina es la hormona responsable por estimular la contracción de las células mioepiteliales, lo que causa la excreción láctea por la glándula mamaria (Schroeder & Chakraborty, 1977). Estudios realizados con células aisladas de glándulas mamarias de ratas que estaban amamantando, mostraron que la ligación de la ocitocina en sus receptores es potencializada por la presencia de cobalto. El metal actúa aumentando la afinidad de los receptores de ocitocina, sin causar aumento de su cantidad (Pearlmutter & Soloff, 1979).

Según Rossipal & Krachler (1998), el recién nacido consume diariamente de 150 a 180 ml de leche por Kg de peso corporal, satisfaciendo así sus necesidades calóricas. Deficiencias en minerales durante este período pueden interferir en el desarrollo de las crías. Al contrario, la presencia de los elementos metálicos en alta concentración o la presencia de micropoluentes metálicos y tóxicos, en baja concentración, pueden causar alteraciones celulares y manifestaciones clínicas en los recién nacidos. Los efectos del metal dependen del nivel y de la duración de la exposición (Biego *et al.*).

La ingestión diaria de minerales por las madres (a través de alimentos y bebidas) influye en la concentración de estos elementos en la leche materna (Rossipal & Krachler). El consumo de alimentos por ratas grávidas alcanza valores de 1010 a 1200 J/Kg de peso corporal (Szakmáry *et al.*, 2001), mientras que la ingestión diaria materna de cobalto puede alcanzar valores de 31,5µg a 48,3µg (Wappelhorst *et al.*).

La concentración de cobalto en la leche humana aumenta durante el período de lactancia, presentando valores medios de 1,35 µg (1<sup>er</sup> al 3<sup>er</sup> día de lactancia), 1,64 µg em la leche madurada (42° al 60° días de lactancia) y 2,96 µg del 97° al 293° días de lactancia (Rossipal & Krachler). La intensificación de la absorción intestinal favorece una mayor disponibilidad de cobalto para la glándula mamaria y, consecuentemente, un aumento de su concentración en la leche materna.

Investigación realizada con grávidas entre las 38<sup>a</sup> y la 40<sup>a</sup> semanas de gestación demostró que 80% del cobalto presente en la sangre fue transferido para el calostro y 60% estaba presente en la sangre del feto, comprobando que el metal atravesó el epitelio de la glándula mamaria así como la barrera placentaria (Rossipal *et al.*).

El objetivo del presente trabajo es estudiar histopatológica e histométricamente las alteraciones presentes en el epitelio de unión y epitelio reducido del esmalte del primer molar superior de ratas sometidas a la acción del cobalto durante la lactancia. La realización de esta investigación fue autorizada por el "Comité de Ética em Pesquisa" de la Universidad de Franca, SP, Brasil.

## MATERIAL Y MÉTODO

Fueron usadas 10 ratas blancas (*Rattus norvegicus* - variedad *albinus*), Wistar machos, con 1 día de vida, divididas en dos grupos:

a) Grupo tratado (T), constituido por cinco crías, elegidas aleatoriamente de nidadas de 10 lactantes, cuyas madres recibieron, durante la lactancia, 300 mg de cloruro de cobalto por litro de agua destilada en el bebedero.

b) Grupo control (C), constituido por cinco crías, escogidas al azar, cuyas madres recibieron, durante la lactancia, solamente agua en el bebedero. Luego del período experimental (21 días) los animales fueron sacrificados por sobredosis de anestésico (inyección de Hypnol a 3%). Las cabezas, separadas de los cuerpos, fueron inmediatamente fijadas en "alfac" (alcohol 80% - 85ml, formol -10ml y ácido acético-5ml), durante 24 h, a temperatura ambiente, de acuerdo con la técnica de Gomes *et al.* (1990). Posteriormente, el material fue descalcificado en solución de citrato de sodio 20% y ácido fórmico 30% (a:a) (Morse, 1945). Las cabezas descalcificadas fueron desarticuladas y el paladar, seccionado en un plano frontal a nivel de los primeros molares, fue incluido en parafina. Los cortes seriados de 6 µm, con intervalos de 10 secciones, fueron teñidos con hematoxilina y eosina.

Con la finalidad de evaluar cuantitativamente las alteraciones celulares ocurridas en el epitelio de unión y epitelio reducido del esmalte, fueron utilizadas técnicas cariométricas y estereológicas.

Fueron estimados los siguientes parámetros cariométricos: diámetros mayor (D), menor (d) y medio (M), relación D/d, perímetro (P), área (A), volumen (V), relación V/A, coeficiente de forma, índice de contorno y excentricidad (Sala *et al.*, 1994).

Los parámetros estereológicos estimados fueron: volumen citoplasmático, volumen celular, relación N/C, densidad numérica celular, espesor, relación superficie externa/membrana basal y densidad de superficie (Sala *et al.*, 1992).

De acuerdo con el análisis previo de los resultados experimentales, mediante la prueba de Shapiro-Wilks, el estudio estadístico fue realizado con la utilización de la prueba no paramétrica de Wilcoxon-Mann-Whitney (Sprent & Smeeton, 2001).

## RESULTADOS

El peso corporal de las crías de ratas tratadas con cobalto durante la lactancia fue significativamente menor (30,74 g) que el de las crías de las ratas control (34,86 g).

Histopatológicamente, el primer molar superior de la rata tratada con cobalto no había irrumpido o irrumpió parcialmente al 21° día de vida postnatal. Se pudo observar, a mayor aumento, que el epitelio de unión estaba disminuido y desorganizado, y que el epitelio del esmalte estaba en pleno funcionamiento, pero constituido de células más achatadas.

Los núcleos de las células de los estratos basal y espinoso del epitelio de unión mostraron diámetros, perímetro, área y volumen menores en el grupo tratado con cobalto. No hubo diferencias para excentricidad, coeficiente de forma e índice de contorno. Resultados semejantes se observaron también en el epitelio reducido del esmalte (Tabla I).

Los volúmenes citoplasmático y celular y la relación N/C de las células de los estratos basal y espinoso del epitelio de unión estaban significativamente disminuidos, mientras que la densidad numérica celular en ambos estratos era significativamente mayor en las ratas tratadas. El espesor del epitelio de unión era menor en la rata tratada, mientras que la densidad de superficie y la relación superficie externa/membrana basal eran semejantes.

El epitelio reducido del esmalte mostró volumen citoplasmático y celular y relación N/C reducidos, y espesor y densidad numérica celular mayores en el grupo tratado (Tabla II).

Tabla I. Valores cariométricos medios de las células del epitelio de unión y epitelio reducido del esmalte del primer molar maxilar de ratas control (C) y tratadas con cobalto (T) durante a lactancia. Prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney. \* p < 0,01.

Parametros	Epitelio de unión				Epitelio reducido del esmalte	
	Estrato Basal		Estrato espinoso		C	T
	C	T	C	T		
D. mayor (D) (mm)	9,38	5,80*	9,11	5,64*	8,1	5,50*
D. menor (d) (mm)	6,92	4,33*	6,67	4,12*	6,17	3,98*
D. medio (mm)	8,02	4,88*	7,77	4,79*	7,04	4,66*
Rel. D/d	1,38	1,31	1,39	1,40*	1,34	1,42
Perímetro (mm)	25,79	15,63*	24,99	15,46*	22,55	15,04*
Área (mm <sup>2</sup> )	50,93	19,02*	47,85	18,34*	39,35	17,49*
Volumen (mm <sup>3</sup> )	276,32	63,87*	252,64	60,60*	188,6	57,18*
Rel. V/A	5,35	3,26*	5,2	3,19*	4,7	3,11*
Excentricidad	0,62	0,51	0,63	0,59	0,58	0,61
Coeficiente de forma	0,95	0,96	0,96	0,95	0,96	0,95
Índice de contorno	3,63	3,61	3,63	3,64	3,62	3,64

Tabla II. Volúmenes estereológicos medios del epitelio de unión y del epitelio reducido del esmalte del primer molar superior en ratas control (C) y tratadas con cobalto (T) durante la lactancia. Prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney.

Parámetros	Control	Tratado
<b>Epitelio de unión</b>		
<i>Estrato basal</i>		
Vol. citoplasmático (mm <sup>3</sup> )	448,4	128,95**
Vol. celular (mm <sup>3</sup> )	719,63	190,72**
Relación N/C	0,29	0,13**
Espesor (mm)	4,54	5,09*
Densidad celular (Nx10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	1,77	5,46**
<i>Estrato espinoso</i>		
Vol. Citoplasmático (mm <sup>3</sup> )	510,49	226,18**
Vol. celular (mm <sup>3</sup> )	756,93	284,76**
Relación N/C	0,18	0,08**
Espesor (mm)	9,76	15,66*
Densidad celular (Nx10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	1,36	3,78**
<i>Epitelio total</i>		
Densidad de superficie (mm <sup>2</sup> /mm <sup>3</sup> )	49,83	48,4
Espesor (mm)	25,24	19,25*
Relación sup.ext/membr.basal	0,83	0,86
Densidad celular (Nx10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )		4,30**
<b>Epitelio reducido del esmalte</b>		
Vol. citoplasmático (mm <sup>3</sup> )	305,09	115,16**
Vol. celular (mm <sup>3</sup> )	489,4	169,92**
Relación N/C	0,35	0,13**
Espesor (mm)	5,28	7,42**
Densidad celular (Nx10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	2,4	6,62**

\* p < 0,05; \*\* p < 0,01.

## DISCUSIÓN

Según Tsalev & Zaprianov (1983) el mecanismo de toxicidad del cobalto, evidenciado experimentalmente en los procesos metabólicos y en órganos y glándulas, incluye:

- sustitución del zinc por el cobalto en enzimas Zn-dependientes, causando deficiencia de aquel metal.
- alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos, con disminución de la utilización de glucosa, en la captación del oxígeno y en la producción de energía.

- desactivación de enzimas óxido-reductoras, llevando a la disminución de la oxidación beta de ácidos grasos de cadena larga en las mitocondrias del miocardio.

- aumento de la fracción globulina y ácido neuramínico, constituyente de esa proteína.

- daños celulares en los islotes de Langerhans del páncreas causando hiperglucemia.

- daños en las células del epitelio de los túbulos contornados proximales de los riñones, provocando proteinuria y glucosuria.

- perjuicio de la función hepática con infiltración lipídica, alteraciones enzimáticas en los hepatocitos, resultando en aumento sérico de las enzimas hepáticas.

Wataha (2000) verificó que son necesarios 100 mg de cobalto para inhibir 50% de la actividad celular. Schmalz *et al.* (1998) relataron que la vitalidad celular de cultivos de fibroblastos y queratinocitos, expuestos por 24 h al cobalto, fue reducida en 60%. Constataron, además, un aumento de los niveles de IL-6 en los cultivos celulares expuestos al metal, sugiriendo que el cobalto estaría implicado en actividad inflamatoria y que los posibles mediadores serían IL-6 y PGE2. Los autores sugirieron que algunas aleaciones odontológicas podrían causar inflamación gingival y periodontal; entre tanto, se dispone de escasa información sobre las moléculas causadoras de los efectos adversos.

En el presente trabajo, el estrato basal del epitelio de unión del primer molar superior de la rata tratada con cobalto durante la lactancia, se presentó más delgado y estereológicamente, fue posible observar células menores, con citoplasma más escaso, reflejándose en mayor número de células por mm<sup>3</sup> de tejido. Los núcleos también mostraron valores menores, evaluados cariométricamente, para los diámetros mayor, menor y medio; perímetro, área, volumen y relación volumen/área.

Estereológicamente, el estrato espinoso del epitelio de unión se comportó de modo similar al estrato basal, excepto para el espesor que presentó valor significativamente mayor en relación al grupo control. Los núcleos, luego de la evaluación cariométrica, mostraron valores menores para los diámetros mayor, menor y medio; volumen, perímetro, área y relación volumen/área; los parámetros para las formas nucleares no mostraron alteraciones significativas. El espesor total del epitelio de unión se presentó disminuido, asociado a un aumento de la densidad numérica celular.

El epitelio del esmalte de rata tratada presentó célu-

las menores y con citoplasma reducido, lo que se refleja en el mayor número de células por  $\text{mm}^3$ . Los núcleos eran menores y mostraron diámetros, perímetro, área, volumen y relación volumen/área disminuidos. Los parámetros excéntrica, coeficiente de forma e índice de contorno no detectaron alteración de la forma nuclear.

La liberación de los elementos metálicos de una aleación, a través del fenómeno de la corrosión, es siempre necesaria para la ocurrencia de efectos biológicos adversos. La respuesta biológica depende de la cantidad de metal liberada así como de la duración de su exposición a los tejidos (Wataha, 2000).

Kazantzis (1981) sugiere que el cobalto, al reaccionar con proteínas, forma complejos solubles que penetran en las células por endocitosis, ocurriendo, así, digestión de las proteínas transportadoras por proteasas lisosómicas, con consecuente liberación y redistribución intracelular del metal. Los autores relatan que altas concentraciones de cobalto fueron encontradas en los núcleos de las células musculares, donde el metal puede ejercer efectos en la replicación del DNA y RNA.

Catelas *et al.* (2005) observaron que cultivos de macrófagos de rata expuestos al cobalto presentaron alteraciones morfológicas, liberación de citoquina TNF- $\alpha$ , ruptura de la membrana celular, fragmentación del DNA y muerte celular por necrosis y apoptosis. Según los autores, los efectos del metal dependen de su afinidad por proteínas, ya que influirán en su mecanismo de penetración celular y consecuente toxicidad.

Iones metálicos pueden mediar respuestas mutagénicas y carcinogénicas. La mutagenicidad es una alteración en la secuencia de pares de bases del DNA, mientras que la carcinogenicidad resulta de innumerables mutaciones en el DNA que llevan a la célula a crecer y dividirse inadecuadamente. El papel de los metales en el mecanismo de carcinogénesis consiste en la reacción con varios compuestos endógenos, tales como peróxido de hidrógeno, radicales sulfito y glutatión, produciendo especies reactivas y activas, causando alteraciones en el DNA, o sea, el metal no actuaría directamente en el DNA, causando mutaciones, más indirectamente, produciendo radicales libres. Los efectos mutagénicos también pueden ser explicados por alteraciones provocadas en los mecanismos de reparación del DNA, aún no develados completamente (Hartwig & Schwerdtle, 2002). Según Lison *et al.* (2001), existen evidencias que cationes de cobalto solubles ejercen actividad genotóxica y carcinogénica *in vitro* e *in vivo* en sistemas experimentales, pero en la especie humana no hay certeza; datos experimentales *in vitro* indican genotoxicidad potencial en linfocitos

humanos, sin evidencia de potencial carcinogénico.

Los blancos de la acción tóxica de los metales son los procesos bioquímicos que ocurren en las células, específicamente las enzimas y/o membranas de células y organelas. El efecto tóxico del metal involucra, generalmente, interacción entre el metal libre en forma de ión con el blanco. La toxicidad es determinada por la dosis en los niveles moleculares/celulares y, así, factores como la forma química y la capacidad de ligación del metal se tornan críticos (Klaasen, 1996).

Células aeróbicas están constantemente expuestas a peligrosas especies reactivas de oxígeno; entre tanto, en condiciones normales, hay equilibrio entre la formación y la neutralización de estas especies. Partículas metálicas tienen potencial para producir especies reactivas de oxígeno alterando el equilibrio entre oxidantes y antioxidantes, lo que puede ocasionar daños bioquímicos irreversibles, como peroxidación lipídica, oxidación de proteínas, oxidación de componentes principales del DNA con consecuentes daños tisulares. La oxidación de proteínas es ampliamente patogénica llevando a efectos deletéreos en la función proteica. Proteínas ligadas a metales pueden también promover oxidación de macromoléculas vecinas (Petit *et al.*, 2005).

Según Kasprzak (2002), alteración de la fisiología celular ocurre cuando metales exógenos se unen a las proteínas (incluyendo DNA y proteínas nucleares) o dislocan metales fisiológicos de ser transportadores naturales, ocasionando daños estructurales e/o funcionales en los ligantes. Los daños oxidativos pueden estar involucrados en la inducción de la toxicidad y alteraciones celulares por el cobalto. Algunos metales alteran el metabolismo del calcio, hierro, cobre, así como también inhiben defensas antioxidantes e interfieren en los mecanismos de reparación y replicación del DNA (Busselberg, 1995; Faccioni *et al.*). En la cromatina nuclear, la molécula de DNA, que posee abundancia de aniones de fosfato y grupos donantes de oxígeno, se torna un sitio favorable para a unión de cationes metálicos, lo que explica la presencia de metales en los núcleos celulares cuando cultivos de células son expuestos a los metales *in vivo*. Los efectos más comúnmente observados en la cromatina son enlaces cruzados como, por ejemplo, entre dos citosinas o dos timinas en el mismo filamento los que se manifiestan en aberraciones morfológicas de los cromosomas (Kasprzak).

Según Duguid *et al.* (1993) cationes metálicos bivalentes, como el  $\text{Co}^{+2}$ , pueden alterar la estructura del DNA. Metales con fuerte afinidad por bases perturban la ligación de hidrógeno entre los pares de bases del DNA.

Los cationes metálicos se ligan con mayor preferencia a las regiones GC que a las regiones AT. El sitio N7 de la guanina es reconocido como un importante sitio de interacción del metal.

Petit *et al.* (2006) demostraron que el cobalto indujo la nitración de proteínas cuando cultivos de macrófagos humanos eran expuestos al metal. Observaron que las proteínas nitradas estaban presentes en la fracción citoplasmática de las células, concluyendo que el metal posee capacidad de modificar la función proteica además de estar, probablemente, relacionadas a los efectos citotóxicos del cobalto, ya que la nitración de proteínas es un marco en los daños celulares.

Muchos son los mecanismos descritos en la literatura como responsables de los efectos biológicos adversos causados por el cobalto. A pesar que no existe un consenso a este respecto, la interacción del metal con el DNA, sea a través de la formación de enlaces cruzados, daños oxidativos, interferencias en los procesos de reparación y replicación, parece ser el principal medio de actuación del cobalto. El presente estudio demostró alteraciones en epitelios de la mucosa bucal causadas por el cobalto abriendo, así, perspectivas para la realización de futuros estudios con el fin de evaluar el mecanismo específico de acción del metal capaz de ocasionar los efectos adversos.

FELIPPINI, A. L.; LOPES, R. A.; SALA, M. A.; WATANABE, I.; LOPES, T. R. V. P.; ISSA, J. P. M. & RIBAS, J. P. Effects of cobalt chloride in junctional epithelium and reduced enamel epithelium of the rat maxillary first molar. *Int. J. Morphol.*, 27(4):1081-1088, 2009.

**SUMMARY:** Cobalt is one of the main components of cast metal alloys broadly used in dentistry. It is the constituent of 45 to 70% of numerous prosthetic works. There are evidences that metal elements cause systemic and local toxicity. The purpose of the present study was to evaluate the effects of cobalt on the junctional epithelium and reduced enamel epithelium of the first superior molar in rats, during lactation. To do this, 1-day old rats were used, whose mothers received 300mg of cobalt chloride per liter of distilled water in the drinker, during lactation. After 21 days, the rat pups were killed with an anesthetic overdose. The heads were separated, fixed in "alfac", decalcified and embedded in paraffin. Frontal sections stained with hematoxylin and eosin were employed. Karyometric methods allowed to estimate the following parameters: biggest, smallest and mean diameters, D/d ratio, perimeter, area, volume, volume/area ratio, eccentricity, form coefficient and contour index. Stereologic methods allow to evaluate: cytoplasm/nucleus ratio, cell and cytoplasm volume, cell number density, external surface/basal membrane ratio, thickness of the epithelial layers and surface density. All the collected data were subjected to statistic analysis by the non-parametric Wilcoxon-Mann-Whitney test. The nuclei of the studied tissues showed smaller values after karyometry for: diameters; perimeter, area, volume and volume/area ratio. Stereologically, it was observed, in the junctional epithelium and in the reduced enamel epithelium, smaller cells with scarce cytoplasm, reflected in the greater number of cells per mm<sup>3</sup> of tissue. In this study, cobalt caused epithelial atrophy, indicating a direct action on the junctional and enamel epithelium.

**KEY WORDS:** Cobalt; Rat; Lactation; Junctional Epithelium; Reduced Enamel Epithelium.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Biego, G. H.; Joyeux, M.; Hartemann, N. P. & Debry, G. Determination of mineral contents in different kinds of milk and estimation of dietary intake in infants. *Food Add. Contam.*, 15:775-81, 1998.
- Bonda, P. L. F.; Porrini, R.; Rizzio, E.; Pietra, R.; Fortaner, S. & Sabbioni, E. Trace metals in oral mucosa in relation to the lichen rubber planus pathology. A preliminary study carried out by neutron activation analysis. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 15:79-83, 2001.
- Busselberg, D. Calcium channels as target sites of heavy metals. *Toxicol. Lett.*, 82/83:255-61, 1995.
- Catelas, I.; Petit, A.; Vali, H.; Fragiskatos, C.; Meilleur, R.; Zukor, D. J.; Antoniou, J. & Huk., O. L. Quantitative analysis of macrophage apoptosis vs. necrosis induced by cobalt and chromium ions *in vitro*. *Biomaterials*, 26:2441-53, 2005.
- Catelas, I.; Petit, A.; Zukor, D. J.; Antoniou, J. & Huk, O. L. TNF- $\alpha$  secretion and macrophage mortality induced by cobalt and chromium ions *in vitro*- Qualitative analysis of apoptosis. *Biomaterials*, 24:383-91, 2003.
- Duguid, J.; Bloomfield, V. A.; Benevides, J. & Thomas, G. J. Raman spectroscopy of DNA-Metal complexes. I. Interactions and conformational effects of the divalent cations. *Biophys. J.*, 65:1916-28, 1993.
- Faccioni, F.; Franceschetti, P.; Cerpelloni, M. & Fracasso, M. E. *In vivo* study on metal release from fixed orthodontic appliances and DNA damage in oral mucosa cells. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.*, 124:687-93, 2003.

- Ferreira, M. E.; Pereira, M. L.; Garcia e Costa, F.; Sousa, J. P. & Carvalho, G. S. Comparative study of metallic biomaterials toxicity: A histochemical and immunohistochemical demonstration in mouse spleen. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 17:45-9, 2003.
- Gomes, P. O.; Watanabe, I.; Matera, A.; Lopes, R. A. & Goldenberg, A. Effects of CO<sup>2</sup> laser on the pancreas of dogs: study at light and scanning electron microscopy. *Acta Cir. Bras.*, 5:59-65, 1990.
- Hartwig, A. & Schwerdtle, T. Interactions by carcinogenic metal compounds with DNA repair processes: Toxicological implications. *Toxicol. Lett.*, 127:47-54, 2002.
- Kasprzak, S. K. Oxidative DNA and protein damage in metal-induced toxicity and carcinogenesis. *Free Rad. Biol. Med.*, 32:958-67, 2002.
- Kazantzis, G. Role of cobalt, iron, lead, manganese, mercury, platinum, selenium and titanium in carcinogenesis. *Env. Health Persp.*, 40:143-61, 1981.
- Klaasen, C. D. Casarett and Doulls Toxicology. 5<sup>th</sup> Ed. New York, McGraw-Hill, 1996.
- Lassila, L. V. & Vallittu, P. K. Effect of water and artificial saliva on the low cycle fatigue resistance of cobalt-chromium dental alloy. *J. Prost. Dent.*, 80:708-13, 1998.
- Leghissa, P.; Ferrari, M. T.; Piazzolla, S.; Caironi, M.; Parigi, P. C. & Lebbolo, E. Cobalt exposure evaluation in dental prostheses production. *Sc. Total Env.*, 130:253-7, 1994.
- Lison, D.; De Boeck, M.; Verougstraete, V. & Kirsch-Volders, M. Update on the genotoxicity and carcinogenicity of cobalt compounds. *Occup. Environm. Med.*, 58:619-25, 2001.
- Morse, A. Formic acid-sodium citrate decalcification and butyl alcohol dehydration of teeth and bone for sectioning in paraffin. *J. Dental Res.*, 24:143-53, 1945.
- Pearlmutter, A. F. & Soloff, M. S. Characterization of the metal ion requirement for oxytocin-receptor interaction in rat mammary gland membranes. *J. Biol. Chem.*, 254:3899-906, 1979.
- Petit, A.; Mwale, F.; Tkaczyk, C.; Antoniou, J.; Zukor, D. J. & Huk, O. L. Induction of protein oxidation by cobalt and chromium ions in human U937 macrophages. *Biomaterials*, 26:4416-22, 2005.
- Petit, A.; Mwale, F.; Tkaczyk, C.; Antoniou, J.; Zukor, D. J. & Huk, O. L. Cobalt and chromium ions induce nitration of proteins in human U937 macrophages *in vitro*. *J. Biomed. Mat. Res., Part A*, 79A:599-605, 2006.
- Rossipal, E. & Krachler, M. Pattern of trace elements in human milk during the course of lactation. *Nutr. Res.*, 18:11-24, 1998.
- Rossipal, E.; Krachler, M. & Micet-Turk, D. Investigation of the transport of trace elements across barriers in humans: Studies of placental and mammary transfer. *Acta Ped.*, 89:1190-5, 2000.
- Sala, M. A.; Lopes, R. A. & Matheus, M. Método morfométrico para análisis cuantitativo de los tejidos. Determinación de los parámetros normales para el hepatocito de rata. *Arch. Fac. Med. Zaragoza*, 32:29-31, 1992.
- Sala, M. A.; Komesu, M. C.; Lopes, R. A. & Maia Campos, G. Karyometric study of basal cell carcinoma. *Braz. Dental J.*, 5:11-4, 1994.
- Schmalz, G.; Schuster, H. & Schweikl, H. E. Influence of metals on IL-6 release *in vitro*. *Biomaterials*, 19:1689-94, 1998.
- Schroeder, B. T. & Chakraborty, J. Binding of [(3) H] oxytocin to cells isolated from the mammary gland of the lactating rat. *J. Cell. Biol.*, 74:428-40, 1977.
- Sprent, P. & Smeeton, N. C. Applied nonparametric statistical methods. 3<sup>rd</sup> Ed. Boca Raton, Chapman & Hall/CRC, 2001.
- Suzuki, N. Metal allergy in dentistry: Detection of allergen metals with X-ray fluorescence spectroscopy and its application toward allergen elimination. *Int. J. Prosthodont.*, 8:351-69, 1995.
- Szokmáry, E.; Ungvary, G.; Hudak, A.; Tatrai, E.; Naray, M. & Morval, V. Effects of cobalt sulfate on prenatal development of mice, rats, and rabbits, and on early postnatal development of rats. *J. Toxicol. Environm. Health Part A*, 62:367-86, 2001.
- Tsalev, D. L. & Zaprianov, Z. K. *Atomic absorption spectrometry in occupational and environmental health practice*. Boca Raton, CRC Press, 1983.
- Wappelhorst, O.; Kühn, I.; Heidenreich, H. & Markert, B. Transfer of selected elements from food into human milk. *Nutrition*, 18:316-22, 2002.

Wataha, J. C. Biocompatibility of dental casting alloys: a review. *J. Prosth. Dent.*, 83:223-34, 2000.

Wataha, J. C. & Lockwood, P. E. Release of elements from dental casting alloys into cell-culture medium over 10 months. *Dental Mat.*, 14:158-63, 1998.

Dirección para correspondencia:  
Prof. Dr. Ruberval Armando Lopes  
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto  
Universidade de São Paulo  
Avenida do Café s/n  
CEP 14040-904  
Ribeirão Preto - SP  
BRASIL

e-mail: [ruberlopes@yahoo.com.br](mailto:ruberlopes@yahoo.com.br)

Received: 01-06-2009

Accepted: 14-09-2009