



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR EM SAÚDE**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS

ANA PRATES SOARES

**EFEITOS DO PAMIDRONATO DISSÓDICO SOBRE A
FORMAÇÃO DO ESMALTE DENTÁRIO**

Vitória da Conquista/BA

2015

ANA PRATES SOARES

**EFEITOS DO PAMIDRONATO DISSÓDICO SOBRE A
FORMAÇÃO DO ESMALTE DENTÁRIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia, Universidade Federal da Bahia, como requisito para
obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Ribeiro do Espírito Santo
Universidade Federal da Bahia – UFBA

Vitória da Conquista/BA

2015

Biblioteca Universitária Campus Anísio Teixeira – UFBA

Soares, Ana Prates
Efeito do pamidronato dissódico sobre a formação do esmalte dentário / Ana Prates
Soares. – 2015.
91 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Ribeiro do Espírito Santo.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar
em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Biociência, 2015.

1. Esmalte Dentário. 2. Bisfosfonato. 3. Microscopia de Polarização. 4. Microscopia
Eletrônica de Varredura. I. Universidade Federal da Bahia. Instituto Multidisciplinar em
Saúde. II. Espírito Santo, Alexandre Ribeiro do. III. Título.

CDU: 615.015.11

ANA PRATES SOARES

**EFEITOS DO PAMIDRONATO DISSÓDICO SOBRE A
FORMAÇÃO DO ESMALTE DENTÁRIO**

Esta dissertação foi julgada adequada à obtenção do grau de Mestre em Biociências e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Biociências, Universidade Federal da Bahia. Vitória da Conquista/BA, Agosto de 2015.

Prof. Dr. Alexandre Ribeiro do Espírito Santo

Universidade Federal da Bahia

Profa. Dra. Gyselle Cynthia Silva Meireles Lemos

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

Profa. Dra. Telma de Jesus Soares

Universidade Federal da Bahia

Dedicatória. Aos meus pais, com quem aprendo a ser uma pessoa melhor a cada dia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, por amor e apoio.

Aos meus pais, pela base que me deram.

À minha irmã, pelo companheirismo e pelos conselhos.

À minha avó Marizete, pela presença e suporte.

Ao Prof. Dr. Alexandre Ribeiro do Espírito Santo, pela orientação com excelência e carinho, e por me proporcionar grandes oportunidades de aprendizado.

Ao Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line, por sua disponibilidade e exemplo em humildade e ética de trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcelo Rocha Marques, por atenção, conhecimento e amizade.

Aos Professores Doutores Alex José Leite Torres, Anderson Santos Souza, Antonio Carlos Ricardo Braga Junior, Deise Souza Vilas Bôas, Laize Tomazi, Márcio Cajazeira Aguiar e Telma de Jesus Soares, por terem me ensinado tanto sobre as matérias quanto sobre a correta conduta de um docente.

Aos colegas Andressa Araújo Oliveira, Rafael Pena Siqueira, Dandara Andrade de Santana, Arla da Silva Rocha e Bruna Larissa Lago Silva, por compartilharem as alegrias e frustrações ao longo do curso.

Aos amigos que fiz em Piracicaba/SP, Polyane, Juliana, Gustavo, Francielly, Mayra, Flávia, Eliene, Cidinha, Regina e Gilson por terem feito da minha estadia tão especial.

Agradeço a todos por terem feito parte dessa experiência enriquecedora.

“Die Welt ist so leer, wenn man nur Berge, Flüsse und Städte darin denkt, aber hie und da jemand zu wissen, der mit uns übereinstimmt, mit dem wir auch stillschweigend fortleben, das macht uns dieses Erdenrund erst zu einem bewohnten Garten.”

Johann Wolfgang von Goethe

SOARES, Ana Prates. Efeitos do pamidronato dissódico sobre a formação do esmalte dentário. 91 f. il. 2015. Dissertação (Mestrado) – Instituto Multidisciplinar de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2015.

RESUMO

Pamidronato dissódico é um bisfosfonato nitrogenado usado como parte do tratamento de crianças com doenças ósseas. O presente trabalho teve como objetivo investigar a associação entre o tratamento com pamidronato dissódico e alterações na matriz orgânica do esmalte secretório (MOES) e no esmalte maduro. Dessa forma, trinta e um ratos Wistar machos foram divididos em quatro grupos: o grupo p21 (n = 8) recebeu injeções semanais de pamidronato (0,5 mg/kg) e o c21 (n = 5) solução tampão fosfato em volume equivalente ao administrado aos animais p21 por 21 dias; o grupo p56 (n = 9) recebeu injeções semanais de pamidronato (0,5 mg/kg) e o c56 (n = 9) solução tampão fosfato em volume equivalente ao administrado aos animais p56 por 56 dias. Vinte e quatro horas após a última injeção, os animais foram adequadamente anestesiados e perfundidos com solução fixadora. As hemimaxilas foram removidas e os incisivos superiores foram seccionados a 2 mm acima da crista óssea alveolar. A porção anterior dos incisivos superiores dos grupos p56 e c56 foi utilizada para análise do esmalte maduro. A porção posterior dos incisivos de todos os grupos foi fixada por mais 24 h, em seguida descalcificada, desidratada e incluída em parafina. Cortes longitudinais de 5 µm de espessura da porção posterior dos incisivos foram obtidos, nos quais mensurou-se o retardo óptico (nm) da área que mostrou o maior brilho de birrefringência na MOES. Noventa por cento dos cortes foram coradas com Ponceau SS e suas fotomicrografias foram analisadas para quantificação indireta do conteúdo proteico em três áreas de 1280x100 pixels da MOES. A porção anterior dos incisivos direitos foi utilizada para análise da superfície externa vestibular do esmalte maduro com espectrometria de energia dispersiva de raios x (EDS) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). A porção anterior dos incisivos esquerdos foi submetida à análise de microdureza e da ultraestrutura de áreas internas do esmalte maduro. O grupo p21 mostrou aumento estatisticamente significativo da quantidade de proteínas no centro e em área da MOES próxima à dentina, quando comparado ao grupo c21 ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente; teste t). O grupo p56 não mostrou diferença em relação ao c56 no que se refere à quantidade de proteínas na MOES. Os grupos p21 e p56 exibiram expressivas reduções nos valores de retardo ótico quando comparados aos grupos c21 e c56, respectivamente ($p < 0,05$; $p < 0,01$; teste t). EDS mostrou alterações estatisticamente significativas na quantidade de fósforo do esmalte maduro vestibular ($p < 0,05$; teste de Mann-Whitney). Não foram observadas diferenças entre os grupos em relação à microdureza interna ou à ultraestrutura da superfície vestibular externa e de áreas internas do esmalte maduro. Os resultados deste estudo indicam que o pamidronato pode alterar o estado de agregação dos componentes da MOES, assim como a composição química do esmalte maduro. No entanto, tais alterações parecem ser insuficientes para promoverem modificações na ultraestrutura e nas propriedades mecânicas do esmalte maduro.

Palavras-chave: Matriz Orgânica do Esmalte Dentário, Bisfosfonatos, Microscopia de Polarização, Microscopia Eletrônica de Varredura.

SOARES, Ana Prates. Effects of pamidronate disodium on dental enamel formation. 91 f. il. 2015. Masters Dissertation – Instituto Multidisciplinar de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2015.

ABSTRACT

Pamidronate disodium is a nitrogen-containing bisphosphonate used as part of the treatment of children with bone diseases. The present work aimed to investigate the association among administration of pamidronate, changes in the secretory-stage enamel organic extracellular matrix (EOECM), and mature enamel features. Therefore, thirty-one Wistar male rats were assigned to four groups: p21 group (n = 8) received weekly injections of pamidronate disodium (0,5 mg/kg) and c21 group (n = 5) received phosphate buffered saline (PBS) injections of volumes equivalent to those injected in p21 animals for 21 days; p56 group (n = 9) received weekly injections of pamidronate disodium (0,5 mg/kg) and c56 group (n = 9) received PBS injections of volumes equivalent to those injected in p56 animals for 56 days. Twenty-four hours after the last injection, animals were properly anesthetized and perfused with a fixative solution. Hemimaxillae were then removed and upper incisors sectioned at 2 mm above the alveolar bone crest. Anterior fragment of upper incisors from p56 and c56 groups was used for analysis of mature enamel. Posterior fragment of upper incisors from all groups was fixed, decalcified, dehydrated and embedded in paraffin. Five- μ m thick longitudinal sections of posterior fragment of upper incisors were obtained. The sections were used to determine optical retardation (nm) of the area that showed the highest birefringence brightness in the secretory-stage EOECM. Ninety percent of the sections were stained with Ponceau SS and their photomicrographs were used to measure the quantity of stained proteins in three 1280x100 pixels areas of the secretory-stage EOECM. Anterior portion of right upper incisors was used for analysis of the external buccal mature enamel surface by means of energy dispersive x-ray spectroscopy (EDS) and scanning electron microscopy (SEM). Anterior portion of left upper incisors was submitted to analysis of microhardness and ultrastructure of cross-sectioned mature enamel. The p21 group showed a statistically significant increase in quantity of proteins in the middle of the secretory-stage EOECM and in the area of that matrix close to dentin, when compared to c21 group ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively; t test). The p56 group was not different to the c56 group in regards to quantity of proteins in the secretory-stage EOECM. Both p21 and p56 groups exhibited expressive decreases in the values of optical retardation when compared to c21 and c56 groups, respectively ($p < 0.05$; $p < 0.01$; t test). EDS showed statistically significant reduction in quantity of phosphorus in buccal outer mature enamel of p56 rats when compared to c56 animals ($p < 0.05$; Mann-Whitney test). Differences between p56 and c56 groups were not observed in regards to cross-sectional microhardness and to ultrastructure of internal regions and of external buccal surface of mature enamel. The results of the present study indicate that pamidronate disodium may alter aggregational status of the secretory-stage EOECM, even though the chemical composition of mature enamel. Nevertheless, these alterations seem to be insufficient for promoting modifications in ultrastructure and mechanical properties of mature enamel.

Keywords: Enamel Organic Extracellular Matrix, Bisphosphonates, Polarized Light Microscopy, Scanning Electron Microscopy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Alterações nos ameloblastos durante a amelogênese	15
Figura 2. Similaridade das moléculas PPI e BFs	17
Figura 3. Estrutura química dos principais bisfosfonatos	18
Figura 4. Representação sumária dos mecanismos de ação dos bisfosfonatos	20
Figura 5. Micrografias de luz polarizada e de campo claro	34
Figura 6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do esmalte maduro	36

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Gráfico 1. Taxas de erupção	32
Gráfico 2. Retardos óticos dos grupos p21, c21, p56 e c56	33
Gráfico 3. Retardos óticos dos grupos p21 e p56	33
Gráfico 4. Curvas de dispersão de birrefringência	34
Gráfico 5. Quantidade de proteínas dos grupos p21 e c21	35
Tabela 1. Quantidade de proteínas dos grupos p56 e c56	35
Tabela 2. Valores de microdureza Knoop	37
Tabela 3. Quantidade de fósforo no esmalte maduro	37
Gráfico 6. Razão cálcio/fósforo no esmalte maduro	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ANT – Adenosina Nucleotídeo Translocase
- AppCp – análogo do ATP
- Apppl – análogo do ATP
- ATP – Adenosina Trifosfato
- BFs – Bisfosfonato
- c21 – Controle 21 dias
- c56 – Controle 56 dias
- DP – Desvio Padrão
- DPI – *Dots Per Inch*, Pontos por Polegada
- EDS – Espectroscopia de raios X por dispersão em energia
- FPP – Farnesil Pirofosfato
- GGPP – Geranylgeranyl Pirofosfato
- GTP – Guanosina Trifosfato
- IPP – Isopentenil Pirofosfato
- Klk4 – Peptidase 4 relacionada a Calicreína
- MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura
- Mmp20 – Metaloproteinase de Matriz 20
- MOES – Matriz Orgânica do Esmalte Secretório
- não-NBFs – Bisfosfonatos não Nitrogenados
- NBFs – Bisfosfonatos Nitrogenados
- OI – Osteogênese Imperfeita
- p21 – Pamidronato 21 dias
- p56 – Pamidronato 56 dias
- PPi – Pirofosfatase inorgânica

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	
2.1 Amelogênese	15
2.1.1 Birrefringência da MOES	16
2.2 Bisfosfonatos	17
2.2.1 Bisfosfonatos e amelogênese	21
2.2.2 Pamidronato	23
3. JUSTIFICATIVA	25
4. OBJETIVOS	26
4.1 Objetivo geral	26
4.2 Objetivos específicos	26
5. METODOLOGIA	27
5.1 Animais, tratamento com pamidronato dissódico e obtenção das amostras	27
5.2 Taxa de erupção dentária	28
5.3 Microscopia de polarização da MOES	28
5.4 Análise da quantidade de proteínas na MOES	29
5.5 Testes de microdureza e MEV do esmalte maduro transversalmente cortado	30
5.6 EDS e MEV da superfície externa vestibular do esmalte maduro	31
5.7 Análise dos resultados	31
6. RESULTADOS	32
6.1 Taxa de erupção dos incisivos superiores	32
6.2 Microscopia de polarização da MOES	32
6.3 Quantidade de proteínas na MOES	35
6.4 Microdureza e MEV do esmalte maduro transversalmente cortado	36
6.5 EDS e MEV da superfície externa vestibular do esmalte maduro	37
7. DISCUSSÃO	39
8. CONCLUSÃO	43
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
10. ANEXOS	50

1. INTRODUÇÃO

O esmalte dentário é a estrutura mais mineralizada do corpo humano e contém os maiores cristais de hidroxiapatita biologicamente produzidos, organizados numa estrutura prismática altamente resistente às forças de atrito da mastigação (BARTLETT, 2013; PAINE & SNEAD, 1997). Defeitos na formação do esmalte estão entre as alterações mais comuns da dentição humana e comprovadamente aumentam a predisposição à cárie (ELLWOOD & O'MULLANE, 1996; MODESTO *et al.*, 2012), que ainda representa um problema de saúde pública no Brasil e em diversos outros países em desenvolvimento.

O uso de bisfosfonatos por pacientes acometidos por doenças ósseas osteoporóticas proporciona uma melhora na qualidade de vida desses indivíduos e diminui a prevalência de fraturas ósseas nessa população (KITAOKA *et al.*, 2011). O mecanismo de ação dos bisfosfonato é o desencadeamento da apoptose dos osteoclastos, que são células responsáveis pela reabsorção da matriz óssea (MÖNKKÖNEN *et al.*, 2006). O advento da descoberta do efeito dos bisfosfonato sobre a matriz óssea tornou essas substâncias muito populares (CREMERS & PAPADOULOS, 2011). Tendo aplicação inclusive em pacientes infantis para tratamento de doenças ósseas pediátricas de cunho osteoporótico (CHIBULE & MADHURI, 2012).

Um dos efeitos adversos do uso dessa medicação em crianças pode ser o desencadeamento da hipoplasia do esmalte (IWAI *et al.*, 2013). Diversas pesquisas foram desenvolvidas nessa área para avaliar o efeito de bisfosfonatos diferentes sobre a formação do esmalte (NELSON-FILHO *et al.*, 2012). No entanto, não há relato na literatura atual do efeito do pamidronato dissódico, droga pesquisada no presente trabalho, sobre a formação do esmalte dentário. O pamidronato é hoje a droga mais usada em pacientes com Osteogênese Imperfeita, que é uma disfunção congênita da formação do colágeno do tipo I e que resulta na formação de ossos osteoporóticos (GLORIEUX *et al.*, 1998). Nesse contexto, torna-se relevante a análise dos mecanismos de formação de defeitos na estrutura do esmalte causados por bisfosfonatos, e em particular se o pamidronato produz algum efeito adverso na mencionada estrutura.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Amelogênese

A formação e o desenvolvimento dentário são eventos altamente regulados que acontecem devido a interações entre diferentes células e entre células e matriz extracelular (FUANGTHARNTHIP *et al.*, 2000). As células responsáveis pela formação do esmalte são denominadas ameloblastos, apresentam origem epitelial e formam uma camada única sobre o esmalte em desenvolvimento. A formação do esmalte ou amelogênese ocorre em quatro etapas diferentes definidas pela morfologia e função dos ameloblastos, classificadas como: pré-secretora, de secreção, de transição e de maturação (BARTLETT, 2013; SIMMER & HU, 2001) (Figura 1).

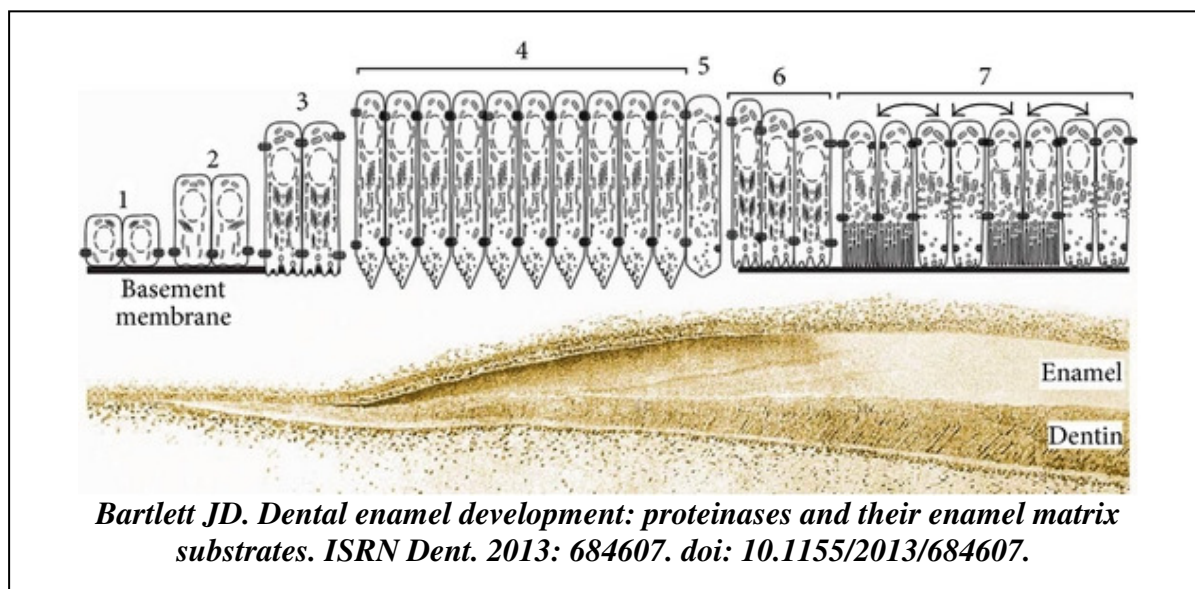


Figura 1 – Alterações nos ameloblastos durante a amelogênese. (1) células do epitélio do órgão do esmalte; (2) início da diferenciação em pré-ameloblastos; (3) pré-ameloblastos e membrana basal em degeneração; (4) ameloblastos da fase de secreção com processo de Tomes desenvolvido; (5) ameloblastos perdem seu processo de Tomes e depositam a última camada de proteínas do esmalte; (6) ameloblastos na fase de transição; (7) ameloblastos na fase de maturação com membrana basal que varia de lisa a ondulada.

A fase pré-secretora é iniciada quando células do epitélio interno do órgão do esmalte começam a se alongar e desenvolvem prolongamentos que atravessam a membrana basal em degeneração, se diferenciando em pré-ameloblastos ao serem estimuladas pelo início da mineralização da pré-dentina (MASSA *et al.*, 2006; NANCI, 2003).

Os pré-ameloblastos mudam de conformação, desenvolvem prolongamentos e continuam a amadurecer para formarem ameloblastos da fase de secreção. Esta fase é

caracterizada pelo alongamento dessas células, formação de prolongamentos citoplasmáticos denominados de processos de Tomes, e pela deposição de uma complexa mistura de proteínas que formam a matriz orgânica do esmalte secretório (MOES) (PAINE & SNEAD, 1997). A MOES é composta principalmente pelas amelogeninas, proteínas que se reúnem para formar estruturas globulares conhecidas como nanosferas, que se agregam em menor quantidade com a ameloblastina e enamelinina dando origem a uma estrutura supramolecular organizada (RAVINDRANATH *et al.*, 2004). A medida que a matriz é secretada, finas e longas fitas de minerais se formam. Esta estrutura parece ser fundamental para a formação ordenada da porção mineral (MORADIAN-OLDAK *et al.*, 2006). Durante a fase de secreção, os ameloblastos se afastam da dentina enquanto a espessura do esmalte aumenta (BARTLETT, 2013). Nesta fase, há produção e liberação da enamelinina (Mmp20), uma metaloproteinase responsável pela clivagem de proteínas estruturais da MOES, incluindo amelogeninas, enamelininas e ameloblastinas, em sua porção C-terminal, gerando produtos proteolíticos N-terminais hidrofóbicos que permanecem entre os cristalitos em alongamento (por meio da deposição de cálcio, fosfato e bicarbonato que atravessam a camada de ameloblastos) até o seu completo crescimento em altura, evitando fusões prematuras e a formação de uma camada fina e quebradiça de esmalte (BARTLETT, 2013; NAGANO *et al.*, 2009).

Ao atingir a espessura da camada do esmalte determinada geneticamente, os ameloblastos reduzem sua produção de proteínas e mudam de conformação, se tornando menos alongados e perdendo seu processo de Tomes, caracterizando a fase de transição (SIMMER & HU, 2001). Na fase de maturação os ameloblastos secretam peptidase-4 relacionada à calicreína (Klk4) que após necessária ação prévia da Mmp20 ajuda na remoção de proteínas da matriz para que os cristalitos finalizem o seu crescimento em largura, havendo assim a sua fusão e o consequente endurecimento dos bastões e das regiões inter-bastões do esmalte em estágio final de desenvolvimento (BARTLETT, 2013). O esmalte maduro gerado nesse processo é formado por cristais de hidroxiapatita carbonatada contendo flúor, embebidos por uma quantidade pequena de material orgânico (THESLEFF, 1995). É fortemente estabelecido o conhecimento de que o esmalte maduro é constituído em 96% por mineral e em 4% por material orgânico (BARTLETT, 2013).

2.1.1 Birrefringência da MOES

A birrefringência é uma propriedade anisotrópica que reflete alto grau de organização em nível molecular, com possível relevância funcional. Uma estrutura birrefringente possui refração dupla, o que significa que a luz polarizada ao atravessá-la

refrata como duas frentes de onda de luz. O desvio relativo entre essas frentes de onda é conhecido como retardo ótico do brilho de birrefringência que é medido em nanômetros (VIDAL, 2003). Quanto mais alto o valor do retardo ótico, mais ordenada é a estrutura biológica birrefringente em análise por meio de microscopia de luz polarizada (VIDAL & MELLO, 2005).

A MOES adequadamente fixada e desmineralizada apresenta forte birrefringência, inicialmente observada próxima à junção amelodentinária e distante dos ameloblastos ativos na secreção de proteínas e proteinases do esmalte em desenvolvimento, demonstrando a necessidade de processamento proteolítico da matriz após a sua secreção para que se torne ordenada e birrefringente (DO ESPÍRITO SANTO *et al.*, 2006; DO ESPÍRITO SANTO *et al.*, 2007). A análise da birrefringência em cortes histológicos comuns e não corados tem se mostrado um método simples e válido para avaliação da ordem supramolecular tecidual, inclusive da MOES. Estudos prévios demonstram que fatores ambientais, como o uso de flúor ou bisfosfonatos alteram a birrefringência da MOES de incisivos superiores de animais de laboratório (MOFATTO *et al.*, 2011; DO ESPÍRITO SANTO *et al.*, 2010), assim como fatores genéticos interferem na referida propriedade anisotrópica da MOES (DO ESPÍRITO SANTO *et al.*, 2007). Portanto, é plausível inferir que alterações no brilho de birrefringência da referida matriz possam refletir certo grau de desordem molecular, que por sua vez constitua um ponto de partida para defeitos na fase mineral do esmalte em desenvolvimento.

2.2 Bisfosfonatos

Bisfosfonatos (BFs) são compostos químicos análogos ao pirofosfato inorgânico (PPi) (Figura 2). BFs foram primeiramente estudados como inibidores de calcificação resistentes à hidrólise promovida pela fosfatase alcalina. Coincidentemente, foi descoberto o seu efeito dose dependente na inibição da reabsorção óssea (RUSSEL, 2011). A administração parenteral de BFs é atualmente a forma mais usual de tratar desordens esqueléticas comuns (CREMERS & PAPADOULOS, 2011).

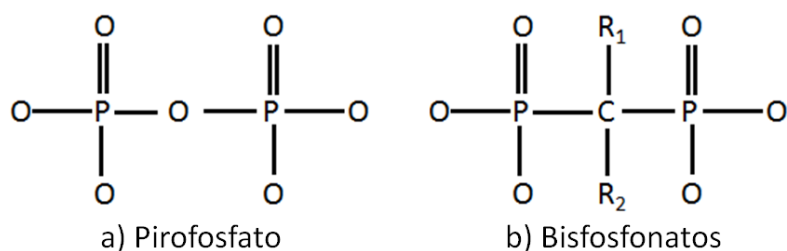


Figura 2 – Similaridade das moléculas do PPi (a) e da estrutura básica dos BFs (b).

Suas moléculas são formadas por um átomo de carbono (C) central ligado a dois átomos de fósforo (P) mais duas ligações laterais com cadeias de átomos (R1 e R2). A mudança na composição dessas duas cadeias laterais possibilita a produção de diversos compostos com propriedades diferentes. Em geral, a presença de hidroxila na cadeia R1 aumenta a afinidade do composto por cristais de cálcio, já a presença do átomo de nitrogênio na cadeia R2 aumenta a potência anti-reabsortiva do BF e determina seu mecanismo de ação (PAPAPOULOS, 2008). BFs que possuem nitrogênio na sua cadeia R2 são denominados de bisfosfonatos nitrogenados ou NBFs e incluem: pamidronato, alendronato, risedronato e zoledronato. Os BFs simples ou não-NBFs não possuem nitrogênio na sua composição, foram os primeiros a serem testados e utilizados clinicamente, e inclui o etidronato (Figura 3), além do clodronato.

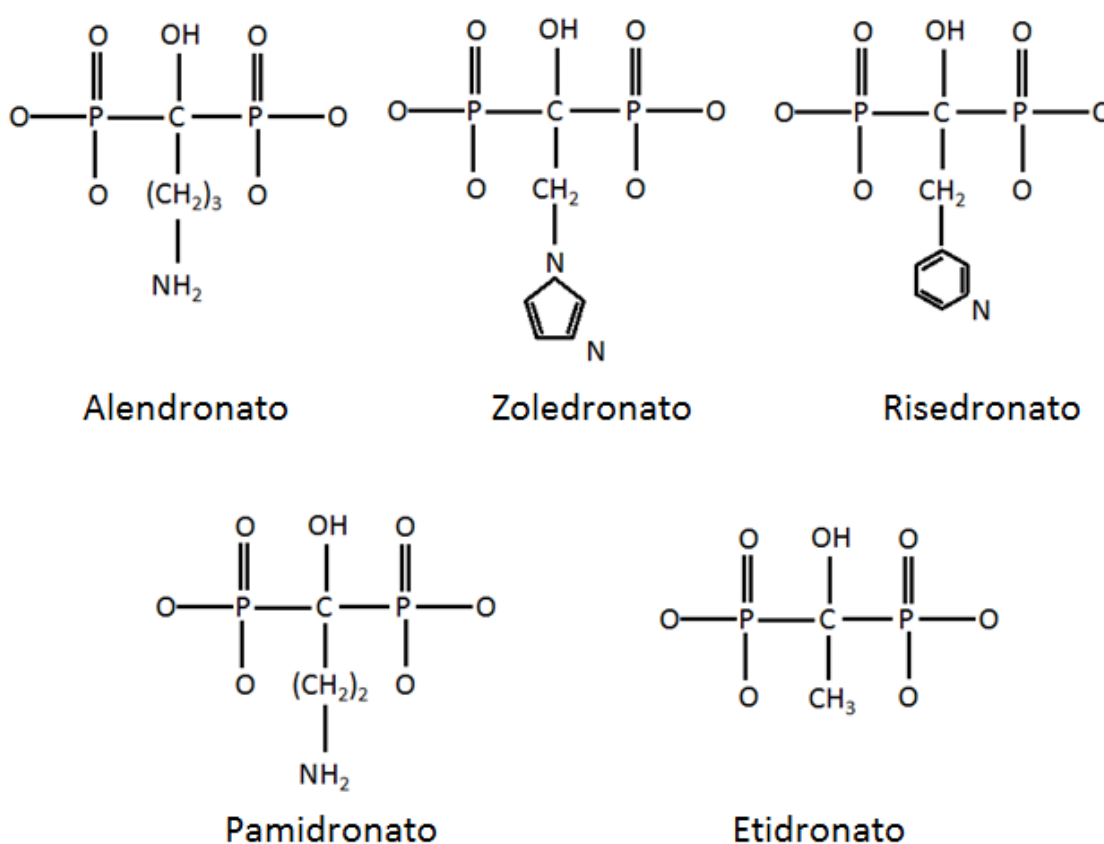


Figura 3 – Estrutura química dos principais BFs utilizados atualmente.

A forma mais usual de administração dos BFs é intravenosa, já que sua absorção, quando administrado via oral, é de somente 2% (ALLGROVE, 1997). Quando na circulação, os BFs podem seguir dois caminhos básicos, para os rins ou para os ossos. O determinante principal do caminho a ser seguido pelo composto é a taxa de renovação óssea; taxas mais altas levam a uma maior deposição no tecido ósseo (KIMMEL, 2007; MASARACHIA *et al.*, 1996). Os BFs entram no espaço extracelular por transporte paracelular e então ligam-se à hidroxiapatita disponível na superfície

óssea (CREMERS & PAPADOULOS, 2011). Esses compostos têm efeito cumulativo com doses que chegam a 90 mg/kg (KAMOUN-GODRAT *et al.*, 2008).

BFs são em maior parte adsorvidos na superficial óssea, mas também podem se depositar nos tecidos moles do fígado, rins ou baço (MÖNKKÖNEN *et al.*, 1990). Especificamente o amidronato pode se depositar no fígado e baço e afetar o sistema mononuclear fagocitário (MÖNKKÖNEN *et al.*, 1990), sendo pouco utilizado na atualidade. Diferentes tipos de BFs apresentam diferentes graus de afinidade ao tecido ósseo. A cadeia R2 parece influenciar nessa afinidade, já que compostos com cadeias diferentes têm diferentes níveis de afinidade pelo tecido. De tal forma que compostos com uma menor afinidade conseguem uma maior penetração na estrutura óssea e compostos com maior afinidade se localizam na superfície da matriz óssea (ROELOFS *et al.*, 2010).

Uma vez adsorvidos a superfície óssea, BFs entram em contato direto com osteoclastos e osteócitos. Durante a reabsorção óssea há dissociação dos BFs e subsequente endocitose pelos osteoclastos (COXON *et al.*, 2008). Uma vez internalizados pelos osteoclastos, NBFs e não-NBFs apresentam diferentes mecanismos de ação. Somente não-NBFs podem ser metabolizados nas células, e sua maior parte é eliminada sem ser lisada. Portanto, os BFs podem ser adsorvidos no osso e absorvidos pelos osteoclastos constantemente em lacunas de reabsorção. Ademais, sua eliminação pelo organismo é lenta sendo detectado na urina até muitos anos após sua administração (CREMERS & PAPAPOULOS, 2011; PAPAPOULOS, 2008) (Figura 4).

Quando absorvidos por osteoclastos não-NBFs podem ser incorporados ao ATP no lugar da metade β,γ pirofosfato (P-O-P) por sua semelhança com o PPi, formando análogos não hidrolisáveis do ATP tipo AppCp (ROGERS *et al.*, 2011). Esse análogo interfere de forma negativa nos ciclos intracelulares dependentes de ATP (SELANDER *et al.*, 1996) e causa a apoptose celular provavelmente devido a interposição na função da enzima ATP translocase (LEHENKARI *et al.*, 2002) (Figura 4).

Contudo, os bisfosfonatos nitrogenados são mais potentes na inibição da reabsorção óssea (ROGERS *et al.*, 2011). Seu mecanismo principal de ação é o de bloqueio da formação de intermediários ao longo da via do mevalonato, importante via metabólica biossintética de colesterol e outros esteróis. Especificamente, NBFs inibem a síntese de fanesil pirofosfato (FPP), uma enzima chave na via do mevalonato (EBETINO *et al.*, 2011). Essa inibição leva ao acúmulo de isopentenilo (IPP), o metabólito antecessor na produção de FPP, o que causa uma inflamação aguda transitória logo após o consumo do NBF. Lipídios isoprenóides como o FPP e geranylgeranyl difosfato (GGPP), gerados pela via do mevalonato são necessários para prenilação de proteínas, como proteínas pequenas de ligação a GTP, que por sua vez são

essenciais na função osteoclástica. Por consequência, há alterações importantes nas características e funções do osteoclasto, incluindo a deformação no arranjo do citoesqueleto, perda da borda pregueada e distúrbio no tráfego de vesículas intracelulares, podendo levar à apoptose (COXON & ROGERS, 2003). Ademais NBFs levam a produção de um análogo do ATP, o Apppl, que inibe a função da enzima adenosina nucleotídeo translocase (ANT), resultando na apoptose do osteoclasto (MÖNKKÖNEN *et al.*, 2006) (Figura 4).

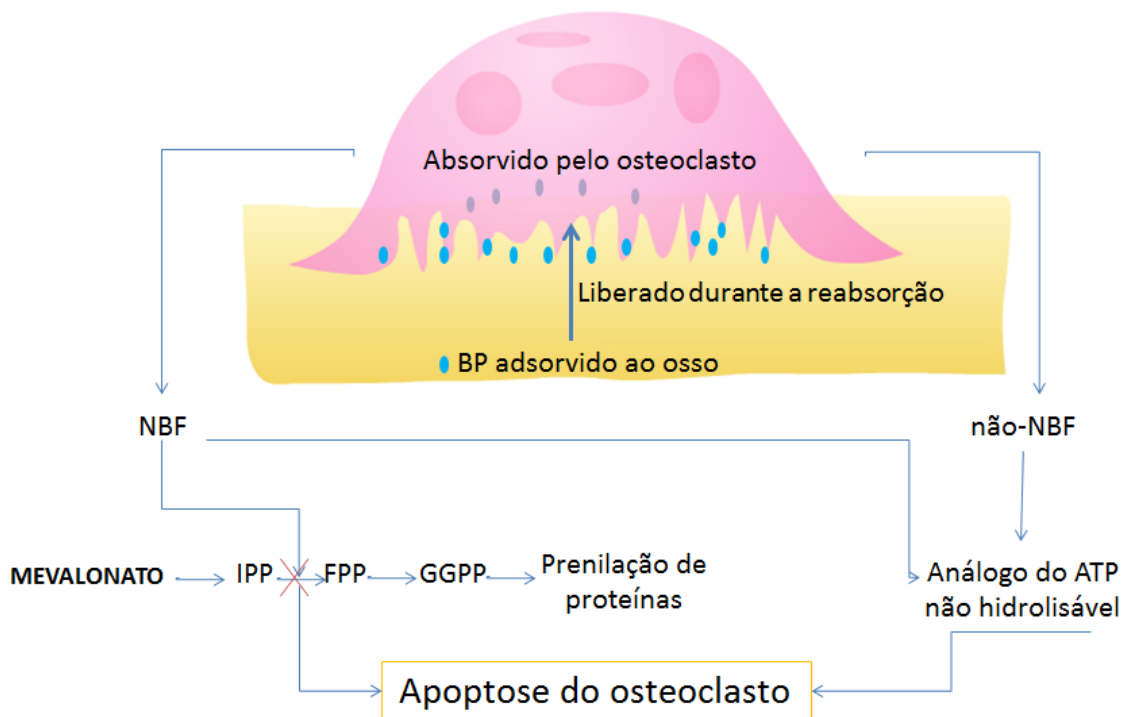


Figura 4 – Representação sumária dos mecanismos de ação dos NBFs e não-NBFs nos osteoclastos. NBFs e não-NBFs, ao serem absorvidos pelo osteoclasto, formam análogos não hidrolisáveis do ATP. NBF interfere na via do mevalonato, causando o acúmulo de isopentenilo (IPP) por impedir a formação de farnesil pirofosfato (FPP), essencial para a formação de geranylgeranyl difosfato (GGPP), por sua vez responsável pela prenilação de proteínas essenciais à viabilidade do osteoclasto. Estes mecanismos de ação levam à apoptose do osteoclasto.

Um efeito secundário do uso de BFs é a prevenção da apoptose de osteoblastos e osteócitos. Acredita-se que por meio do aumento das junções gap entre essas células (JEONG *et al.*, 2013). De forma diferente da promoção de apoptose dos osteoclastos, menores doses de BFs parecem ser mais efetivas na preservação de osteoblastos e osteócitos (BELLIDO & PLOTKIN, 2011). Já o efeito apoptótico dos osteoclastos é cumulativo, com doses mais altas gerando uma matriz mais calcificada (BELLIDO & PLOTKIN, 2011).

2.2.1 Bisfosfonatos e amelogênese

Cronologicamente, a formação da dentição decídua começa na sétima semana de gestação e sua amelogênese é finalizada por volta do final do primeiro ano de vida, enquanto que a dentição permanente é iniciada no quinto mês de gestação e o esmalte do primeiro molar é finalizado por volta dos 7 anos de idade (EL NESR & AVERY, 2002). Formação e erupção dentária ocorrem enquanto o osso adjacente é reabsorvido por osteoclastos e cálcio e fosfato séricos são atraídos para formação dos cristais de hidroxiapatita, portanto, é esperado que o uso de BFs afete o desenvolvimento dos dentes de pacientes pediátricos (WISE & KING, 2008).

Uma consequência do uso de BFs durante o desenvolvimento dentário pode ser o retardo da erupção (GRIER & WISE, 1998), que se apresenta diretamente proporcional à dose aplicada durante o tratamento (HIRAGA *et al.*, 2010; KAMOUN-GOLDRAT *et al.*, 2008).

A análise da literatura revela que quase todos os estudos associando BFs a defeitos dentários referem-se ao etidronato (um não-NBF) e/ou alendronato (um NBF). SIMMELINK (1987) descreveu que injeções sucessivas de etidronato (0,5 a 10 mg/kg) em ratos tinham induzido linhas hipomineralizadas no esmalte maduro. Alterações estruturais do esmalte de incisivos de rato (incluindo bandas incrementais hipomineralizadas) foram evidenciadas após injeções únicas de etidronato em doses de 0,5 a 10 mg/kg de peso corpóreo (FEJERSKOV *et al.*, 1990; WEILE *et al.*, 1993). WAKAMATSU (1991) procedeu uma análise de micrografias de luz e eletrônicas de ameloblastos e seu esmalte em formação de incisivos superiores de ratos que tinham sido submetidos a injeção diária de etidronato (4 ou 8 mg/Kg) por sete dias. As referidas micrografias denunciavam uma formação do esmalte completamente desordenada, com ilhotas de esmalte ao longo da superfície dentinária alternadas com zonas livres de esmalte. Regiões internas do esmalte mostraram bastões morfológicamente alterados e bandas hipomineralizadas paralelas à superfície do esmalte. Glóbulos densamente corados com toluidina e vacúolos foram observados na camada ameloblástica associada às ilhotas de esmalte. Esses resultados foram atribuídos não só à inibição físico-química do crescimento dos cristais de hidroxiapatita, mas também ao efeito inibidor do fármaco sobre as funções de ameloblastos durante a formação da matriz do esmalte.

Dez anos mais tarde, FUANGTHARNTHIP e colaboradores (2000) confirmaram os achados relatados por WAKAMATSU (1991) e adicionalmente investigaram com autorradiografia as atividades sintética e secretora de ameloblastos associados às ilhotas e zonas livres de esmalte (neste caso, que repousavam diretamente sobre a dentina do manto anormalmente não mineralizada), traçando o destino das proteínas marcadas radioativamente. Uma vez que os ratos tratados com etidronato e os

controles apresentaram resultados semelhantes para todos os ameloblastos, os autores concluíram que etidronato não afetou a atividade dos ameloblastos na síntese de proteínas e que o fracasso completo da formação do esmalte em regiões específicas foi provavelmente devido à falha na secreção e deposição de proteínas da MOES. Além disso, esse estudo forneceu evidências adicionais de que a mineralização da dentina é um fator essencial para o sucesso da secreção e da deposição da MOES. YAMADA e colaboradores (2000) também analisaram incisivos maxilares de ratos nos quais etidronato tinha sido injetado durante 7 dias em doses diárias de 8 mg/kg, utilizando-se hibridação *in situ* e coloração imuno-histoquímica para detecção da expressão do gene e localização da proteína amelogenina, respectivamente. Os resultados do referido estudo confirmaram que a hipoplasia do esmalte naquela situação não se devia a distúrbio na síntese de amelogenina, mas ao comprometimento de sua secreção. Há também relatos científicos de alteração na morfologia dos ameloblastos (FEJERSKOV *et al.*, 1990; JOSEPHSEN *et al.*, 1990) e hipoplasia do esmalte associada à formação de cistos subameloblásticos induzidos por etidronato em doses que variaram de única a múltiplas doses de 10mg/kg (FEJERSKOV *et al.*, 1990; FOU DA *et al.*, 1991; FOU DA *et al.*, 1989).

Publicações anteriores indicam que os distúrbios no processo de mineralização induzidos por BFs parecem ser devido a efeitos físico-químicos destes fármacos sobre formação e agregação de cristais (FLEISCH, 2007; FLEISCH, 1997). Um estudo recente realizado por NELSON-FILHO e colaboradores (2012) analisou o esmalte maduro de incisivos superiores de ratos tratados com alendronato de sódio (2 doses semanais de 1 mg/kg durante 60 dias), usando espectroscopia de fluorescência, microscopia eletrônica de varredura, microscopia de luz de campo claro e testes de microdureza. E demonstrou que, embora o alendronato tenha sido incorporado ao esmalte maduro, não causou alterações significativas na morfologia e microdureza daquela estrutura.

Em pesquisa recente foram analisados a MOES e o esmalte maduro de incisivos maxilares de ratos tratados com o etidronato (8 mg/kg/dia) ou alendronato (30 mg/kg/dia) durante 42 dias (DO ESPÍRITO SANTO *et al.*, 2010). Ratos tratados com etidronato exibiram grandes alterações morfológicas na MOES, como linhas incrementais não birrefringentes. Ratos tratados com alendronato não mostraram alterações morfológicas na MOES, que por sua vez exibiu diminuição significativa no brilho de birrefringência. Os grupos alendronato e etidronato exibiram reduções estatisticamente significativas de cerca de 6 a 10% na microdureza interna do esmalte maduro. Microscopia eletrônica de varredura mostraram extensas alterações no esmalte maduro do grupo etidronato com ausência de prismas do esmalte. Nossos achados sugeriram que alterações na birrefringência da MOES são um mecanismo plausível pelo

qual fatores ambientais podem causar defeitos de esmalte (DO ESPÍRITO SANTO *et al.*, 2010). A redução do brilho de birrefringência da MOES de ratos tratados com alendronato (2,5 mg/kg/dia por 3 dias) pode ser explicada por mudanças nas propriedades de agregação dos componentes daquela matriz, como reveladas pela presença de grandes partículas de material granular formado por moléculas de amelogeninas intactas na MOES de ratos recém-nascidos no estudo por MASSA e colaboradores (2006).

Os BFs mais amplamente utilizados em pacientes pediátricos são alendronato, pamidronato e zoledronato. Há um debate importante na literatura sobre os possíveis efeitos dos BFs no desenvolvimento e na erupção dos dentes. Com base nos dados científicos relatados que são relevantes para área odontológica, a utilização clínica de etidronato deve ser sistematicamente descartada, enquanto que o uso de alendronato em crianças parece ser segura. Por outro lado, os efeitos de zoledronato e pamidronato em erupção e formação dentárias permanecem pouco evidentes e merecem ser exaustivamente estudados.

2.2.2 Pamidronato

O pamidronato, também conhecido por ácido pamidrônico ou (3-amino-1-hidroxil-1-fosfonopropil) ácido fosfônico é um NBF (Figura 3). O pamidronato dissódico comumente utilizado é obtido pela combinação do ácido pamidrônico com hidróxido de sódio. Sua utilização faz parte do tratamento padrão de crianças com desordens osteoporóticas (BARROS *et al.*, 2012; CHIBULE & MADHURI, 2012). Uma dessas desordens, a mais comum, é a osteogênese imperfeita (OI), que tem a casuística de 1 a 2 casos em 20.000 nascimentos (CASTILLO *et al.*, 2009). A sua severidade pode variar entre assintomática e de risco a vida (BACHRACH & WARD, 2008).

O pamidronato dissódico tem sido utilizado como medicação padrão para tratamento de osteogênese imperfeita (OI) desde o estudo de GLORIEUX e colaboradores (1998). Seu uso tem como objetivo a melhora da qualidade de vida do paciente (KITAOKA *et al.*, 2011) e faz parte de um tratamento multidisciplinar que inclui cirurgias, fisioterapia e terapia ocupacional (BASEL & STEINER, 2009). No entanto, não há consenso quanto à idade do início do tratamento, dose a ser administrada, tempo do tratamento ou até mesmo se o pamidronato é a melhor droga a ser utilizada (BACHARACH & WRAD, 2009; BARROS *et al.*, 2012; BASEL & STEINER, 2009; CASTILLO *et al.*, 2009; GLORIEUX *et al.*, 1998).

A maioria das publicações acerca do uso de BFs por pacientes com OI mostra que o tratamento é iniciado por volta dos 4 anos de idade. Há evidências de quanto mais cedo iniciado o tratamento, menor a incidência de fraturas ósseas (GLORIEUX *et al.*, 1998). Existem relatos de crianças iniciando o uso com duas semanas de vida (DWANK *et al.*, 2014).

3. JUSTIFICATIVA

Considerando que os defeitos na formação do esmalte dentário estão entre as alterações mais comuns na dentição humana e que comprovadamente aumentam a predisposição à cárie, tornam-se relevantes trabalhos que possam esclarecer de que maneira fatores genéticos e ambientais promovem o desenvolvimento de defeitos naquela estrutura. Reiteramos aqui que a cárie ainda constitui um problema de saúde pública no Brasil e em diversos outros países em desenvolvimento. Nesse contexto, justifica-se o estudo dos efeitos do pamidronato dissódico, um NBF largamente prescrito por médicos pediatras para crianças com OI durante a época de desenvolvimento dos dentes, sobre a formação do esmalte dentário.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Investigar em modelo animal possível associação entre o uso do pamidronato dissódico e o desenvolvimento de alterações na MOES e de defeitos no esmalte maduro.

4.2 Objetivos específicos

Analisar, em cortes de 5 μm de espessura da MOES de incisivos superiores tratados com pamidronato dissódico: 1. O retardo ótico do brilho de birrefringência por meio de microscopia de luz polarizada; 2. A quantidade de proteínas por meio de método histoquímico, microscopia de luz de campo claro e análise de imagem digital.

Avaliar, em regiões internas do esmalte maduro transversalmente seccionado dos incisivos referidos no parágrafo anterior: 1. A microdureza interna por meio de testes com microdurômetro Knoop automático; 2. A ultraestrutura por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Analisar, na superfície externa do esmalte maduro vestibular dos incisivos aqui mencionados: 1. A composição química por meio de espectroscopia de energia dispersiva de raios x (EDS); 2. A ultraestrutura por meio de MEV.

5. METODOLOGIA

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências da Saúde da UFBA (protocolo nº 007/2010).

5.1 Animais, tratamento com pamidronato dissódico e obtenção das amostras

Trinta e um (31) ratos Wistar machos com 45 dias de idade e pesando aproximadamente 200g foram aleatoriamente divididos em 4 grupos (2 grupos testes, p21 e p56; e 2 grupos controles, c21 e c56), que foram acompanhados por 21 ou 56 dias. O acompanhamento durante 21 dias foi realizado com objetivo de se observar os efeitos do pamidronato dissódico na MOES em um espaço curto de tempo. Já a observação dos efeitos da droga após 56 dias de experimento foi realizada com intuito de se analisar as consequências da administração do pamidronato tanto na MOES após 8 semanas de injeções semanais, quanto no esmalte maduro, já que é tempo suficiente para renovação completa do esmalte sob influência da droga (DO ESPÍRITO SANTO *et al.*, 2010; NELSON-FILHO *et al.*, 2012). Os animais foram mantidos e tratados em condições ambientais adequadas, rigorosamente controladas no Biotério da Escola de Medicina Veterinária da UFBA (Campus Federação/São Lázaro, Salvador/BA). Ração e água foram fornecidas *ad libitum* aos animais durante todo o experimento. Semanalmente, os animais foram pesados e tiveram mensuradas as taxas de erupção dos incisivos superiores. Os animais p21 e p56 foram submetidos a injeções semanais intraperitoneais de pamidronato dissódico a uma dose de 0,5 mg/Kg de peso corpóreo (Eurofarma Laboratórios Ltda., Itapevi-SP, Brasil) dissolvido em solução tampão fosfato 0,2 M pH 7,2. Esta dosagem foi estabelecida com base em estudo prévio (RAO *et al.*, 2008), nas informações contidas na bula do medicamento e no mecanismo de erupção contínua dos incisivos de roedores. Os animais c21 e c56 receberam injeções semanais intraperitoneais de solução tampão fosfato 0,2 M pH 7,2, em volume equivalente àquele recebido pelos animais dos grupos testes. A manipulação dos animais foi padronizada e ocorria aos sábados para pesagem e marcação da taxa de erupção e aos domingos no mesmo horário para administração da droga nos animais. Decorridos 21 dias, ratos dos grupos p21 e c21 foram eutanasiados. Cinquenta e seis (56) dias após o início do experimento, ratos dos grupos p56 e c56 eutanasiados. Em todos os grupos, a primeira injeção ocorreu no primeiro dia do experimento e a última, 24 horas antes do sacrifício. Para este procedimento, todos os animais foram adequadamente anestesiados com solução xilazina a 2% e cetamina a 10% na proporção 1:1 (0,3 ml/100g de peso corpóreo) e perfundidos com mistura fixadora de paraformaldeído 2% com glutaraldeído 0,5% em solução tampão fosfato 0,2 M pH 7,2.

A perfusão foi procedida com abertura da cavidade torácica do animal para acesso ao ventrículo esquerdo, onde era inserida uma agulha de 40x12 mm cortada em 5 mm de comprimento acoplada a um equipo microgotas de 60 gotas/minuto. Um talho era realizado no átrio direito para saída da substância a ser injetada. Primeiramente o animal era perfundido com soro fisiológico por 2 minutos. Em seguida, procedia-se a perfusão com a solução fixadora já mencionada por 15 minutos (DO ESPÍRITO SANTO *et al.*, 2006).

As hemimaxilas direita e esquerda de cada rato foram removidas cuidadosamente após o procedimento de perfusão e cortadas transversalmente 2 mm acima da crista óssea alveolar. Os fragmentos anteriores dos incisivos dos animais p56 e c56 foram mantidos mineralizados e utilizados para as análises do esmalte maduro. Os fragmentos posteriores de todos os animais permaneceram imersos na mesma solução fixadora utilizada na perfusão por mais 24 horas, sendo em seguida processados para o estudo da MOES por meio de microscopias de luz polarizada e de campo claro.

5.2 Taxa de erupção dentária

A taxa de erupção dentária foi medida semanalmente em milímetros. Para este procedimento, os animais eram anestesiados com Isothane (Isoflurano, AstraZeneca, São Paulo, Brasil) e uma marca transversal era realizada no incisivo direito dos animais usando uma boca diamantada cilíndrica em caneta de alta rotação com refrigeração (MRS 400 PB, Dabi Atlante, Brasil). Uma lupa milimetrada (Ernest Leitz Wetzlar Germany 12,5x) adaptada a uma lupa estereoscópica e calibrada com uma régua milimetrada (Carl Zeiss 5+ 100/100 mm) era usada para registrar a distância entre a marca e a margem cervical. Toda semana uma nova marca era feita já que a marca realizada na semana anterior já se aproximava da borda incisal e certamente seria perdida (DE ARAÚJO *et al.*, 2014).

5.3 Microscopia de polarização da MOES

Os fragmentos posteriores das hemimaxilas perfundidas de todos os ratos foram desmineralizados em mistura de ácido nítrico 5% e formalina 10% por 12 horas sob agitação contínua. Após desidratação, as amostras descalcificadas foram infiltradas e incluídas em parafina, e cortes longitudinais de 5 µm de espessura foram obtidos. Os cortes foram tratados com xilol para remoção da parafina e posteriormente hidratados para então serem submetidos às análises em microscopia de luz polarizada. Todo o processamento histológico foi realizado no Laboratório de Histotecnologia do Instituto de Ciências da Saúde da UFBA (Campus Canela, Salvador/BA).

Em média, vinte cortes seriados de cada hemimaxila foram analisados de modo a se obter o retardo ótico (nm) do brilho de birrefringência da MOES. Os cortes foram imersos em glicerina 80% por 30 min e em cada um deles foram tomadas 10 medidas, utilizando-se um microscópio Leica DMLP, equipado com filtros polarizadores, luz policromática e compensador de Brace-Köhler (DO ESPÍRITO SANTO *et al.*, 2006).

Após o registro dos retardos óticos de todos os cortes selecionados para tal análise, quatro lâminas representativas dos grupos foram utilizadas para construção de curvas de dispersão de birrefringência, com o objetivo de identificar a birrefringência intrínseca da MOES dos grupos em estudo. Curvas de dispersão de birrefringência foram obtidas em função dos índices de refração dos seguintes meios de embebição, utilizados na sequência a seguir: água, solução aquosa de glicerina 80%, solução aquosa de glicerina 100% e resina Entellan[®] (Merck, Darmstadt, Germany).

Alguns cortes também representativos dos grupos analisados foram corados por hematoxilina e eosina (HE) e fotografados em microscopia de luz de campo claro para comprovação de adequada preservação estrutural.

5.4 Análise da quantidade de proteínas na MOES

Noventa por cento dos cortes utilizados para a análise da birrefringência da MOES foram corados com solução de Ponceau SS (solução a 0,025%) por 5 minutos seguidos de lavagem em ácido acético 3% por 1 minuto e, logo após, água corrente por 1 minuto. Após secagem, os cortes foram tratados com xilol e montados utilizando-se bálsamo do Canadá natural (VIDAL & MELLO, 2005).

Os cortes foram fotografados com câmera digital (Leica DFC280 com resolução de 96 DPI e dimensões 1280 x 1024 pixels, Leica Microsystems[®]) em microscópio Leica DMLP equipado com filtro verde (546 nm) em aumento de 400 vezes. As imagens foram convertidas em escala de cinza com 8-bit. O *software* ImageJ (1.42q version; National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA) foi usado para análise das imagens capturadas e quantificação das proteínas coradas em três áreas diferentes de 1280x100 pixels na MOES: A (próxima aos ameloblastos), M (centro) e D (próxima à dentina) (MOFATTO *et al.*, 2011). Valores de absorvância em escala cinza foram então registrados para cada lâmina analisada.

O estudo das lâminas em microscopias de luz polarizada e de campo claro e a obtenção das imagens para análise de absorvância foram conduzidos no Laboratório de Histologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP.

5.5 Testes de microdureza e MEV do esmalte maduro transversalmente cortado

Os fragmentos anteriores dos incisivos superiores não descalcificados esquerdos dos grupos p56 (9 espécimes) e c56 (9 espécimes) foram submetidos aos testes de microdureza e à MEV do esmalte maduro em corte transversal. Os dentes foram seccionados em fragmentos com aproximadamente 5 mm de espessura utilizando um disco diamantado em baixa rotação e com sistema de resfriamento por água (*Isomet Buehler LTD, Lake Bluff, IL, USA*). Estes fragmentos foram embutidos em blocos circulares de resina acrílica com 30 mm de diâmetro (Embutidora Pre30Mi Arotec[®]). A porção apical de cada fragmento ficou voltada para a face do bloco que foi polida. Os blocos foram polidos utilizadas lixas não adesivas de grana 400, 600 e 1200 em carbureto de silício, com diâmetro de 200 mm (Dispositivo de Polimento Múltiplo Arotec[®]). O polimento final foi feito no mesmo equipamento utilizando-se feltro com suspensão de diamante. Os blocos foram lavados em ultra-som com água destilada entre a utilização das lixas e com solução detergente após a utilização do feltro.

Os valores de microdureza do esmalte vestibular foram obtidos através de cinco endentações a 40 µm e a 80 µm da junção amelo-dentinária separadas umas das outras por 50 µm. Nove endentações foram feitas no esmalte lateral (5 a 30 µm e 4 a 60 µm da junção amelo-dentinária). Para este procedimento, foi utilizado um microdurômetro Knoop automático (*Model FMA-ARS, Future Tech Corp., Tokyo, Japan*). A carga utilizada foi de 25 g por 5 s (GERLACH *et al.*, 2002). Registraram-se valores médios ou medianos de microdureza Knoop para cada profundidade/região do esmalte analisada em cada animal.

O processamento de amostras de esmalte maduro e a obtenção dos valores de microdureza foram realizados no Laboratório de Bioquímica Oral da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP.

Os mesmos blocos utilizados para os testes de microdureza foram submetidos a novo desgaste, inicialmente com lixa não adesiva de grana 400 em carbureto de silício até desaparecerem as endentações. Em seguida, foram utilizadas lixas não adesivas de grana 600 e 1200 em carbureto de silício. Finalmente, utilizou-se o feltro com suspensão de diamante. Da mesma forma, os blocos foram lavados em ultra-som com água destilada entre a utilização das lixas e com solução detergente após a utilização do feltro. As amostras foram submetidas a ataque ácido da superfície exposta o esmalte em corte transversal (ácido tricloroacético a 3%). Em seguida, procedeu-se lavagem, desidratação, metalização com ouro (BAL-TEC SCD 050) e análise em microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM-5600 V. Eletromicrografias dos espécimes foram obtidas em regiões representativas com aumento de até 3.500 vezes (DO ESPÍRITO SANTO *et al.*, 2010).

Tanto as análises com EDS quanto a aquisição de eletromicrografias de varredura foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP.

5.6 EDS e MEV da superfície externa vestibular do esmalte maduro

A superfície externa vestibular do esmalte dos fragmentos anteriores não descalcificados de incisivos superiores direitos dos animais p56 (9 espécimes) e c56 (9 espécimes) foi submetida a EDS e MEV. Para estas análises, os dentes foram limpos, expostos a ácido tricloroacético a 3%, lavados em água destilada e desidratadas com álcool a 70%. Os dentes foram fixados em plataformas acrílicas com fita adesiva de carbono. As amostras foram revestidas por pulverização catódica com carbono (*Denton Vacuum Desk II*) e analisadas em microscópio eletrônico Jeol JSM-5600 V usando 15 kV. Os valores percentuais de sódio (Na), magnésio (Mg), silício (Si), fósforo (P), enxofre (S), cloro (Cl), potássio (K), cálcio (Ca) e ferro (Fe) foram registrados em duas áreas por amostra e computados para comparação entre os grupos p56 e c56.

Após as análises com EDS, a mesmas amostras mencionadas no parágrafo anterior foram metalizadas com ouro (*BAL-TEC SCD 050*) e tiveram sua topografia analisada por meio de microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM-5600 V. As eletromicrografias dos espécimes foram obtidas em regiões representativas com aumento de até 1.500 vezes.

5.7 Análise dos resultados

Os valores de taxa de erupção, retardo ótico, absorbância, microdureza e percentuais obtidos por EDS foram comparados entre os grupos teste e controle utilizando-se teste t ou teste de Mann-Whitney, dependendo da normalidade dos dados. O software utilizado para as análises foi o BioStat 5.0. O nível de significância foi definido em $p < 0,05$.

Os aspectos morfológicos observados por microscopia de luz de campo claro e MEV foram comparados de forma descritiva.

6. RESULTADOS

Trinta e um (31) ratos Wistar machos com 45 dias de idade e peso aproximado de 200 g foram aleatoriamente distribuídos nos grupos c21, p21, c56 e p56. Os grupos c21, p21, c56 e p56 apresentaram, respectivamente, os seguintes tamanhos de amostrais: cinco (05), oito (08), nove (09) e nove (09).

6.1 Taxa de erupção dos incisivos superiores

Os grupos apresentaram taxas de erupção dos incisivos superiores semelhantes (Gráfico 1). Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$; teste t) entre os valores obtidos, ao serem comparados os grupos p21 com c21 ($p = 0,5907$; teste t) e p56 com c56 ($p = 0,1979$; teste t).

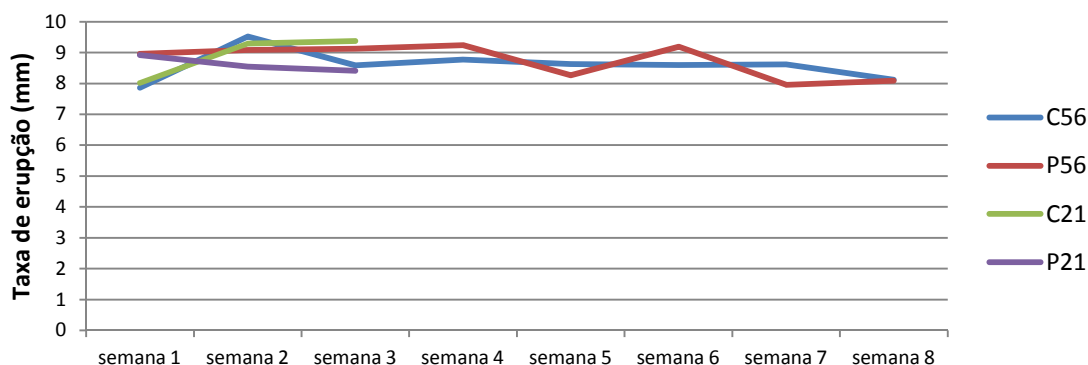


Gráfico 1 – taxas de erupção representadas na linha de tempo do experimento. Os dados apresentados são os valores brutos das medidas da lupa estereoscópica: c56 (azul), p56 (vermelho), c21 (verde) e p21 (roxo).

6.2 Microscopia de polarização da MOES

A MOES apresentou birrefringência mensurável em todos os grupos (c21, p21, c56 e p56; Gráfico 2). Animais do grupo p21 mostraram redução estatisticamente significativa nos valores de retardo ótico do brilho de birrefringência quando comparados aos ratos do grupo c21 ($p = 0,0175$; teste t; Gráfico 2). Animais tratados com pamidronato por 56 dias exibiram uma redução estatisticamente expressiva nos valores de retardo ótico ao serem comparados aos ratos do grupo c56 ($p = < 0,0001$; teste t; Gráfico 2; Figura 5). Os dois grupos pamidronato, 21 e 56 dia também demonstraram diferença estatisticamente significativa ($p=0,0001$, teste t; Gráfico 3). Microscopia de luz de campo claro mostrou que o pamidronato não induziu alterações morfológicas na MOES de ratos tratados por 21 e 56 dias (Figura 5B, D). Animais incluídos no grupo c56 exibiram curvas de dispersão de birrefringência semelhantes,

que foram claramente mais altas quando comparadas aos dados de ratos p56 (Gráfico 4). Notou-se que o maior (birrefringência de forma) e o menor (birrefringência intrínseca) retardo ótico para os índices de refração dos meios de embebição utilizados foram observados, respectivamente, com os meios solução aquosa de glicerina a 80 % (n = 1,435) e resina Entellan[®] (n = 1,495) nesta ordem. Animais do grupo p56 apresentaram birrefringências de forma e intrínseca mais fracas quando comparados a ratos c56.

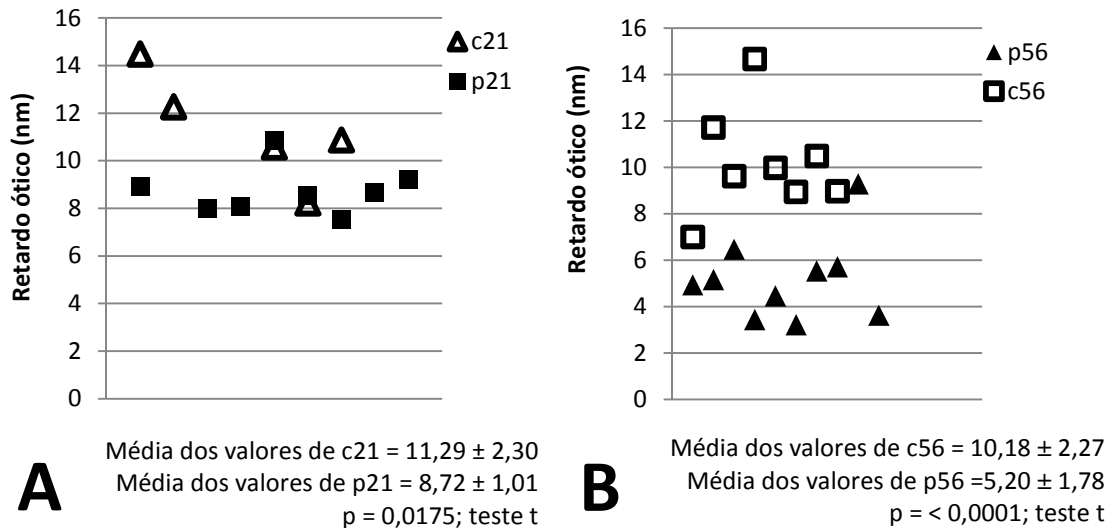


Gráfico 2. Retardos óticos de brilho de birrefringência (nm) de cortes não corados de 5 µm de espessura da MOES de animais incluídos nos grupos c21, p21, c56 e p56. Notou-se que o pamidronato induziu uma diminuição estatisticamente significativa dos retardos óticos de brilhos de birrefringência.

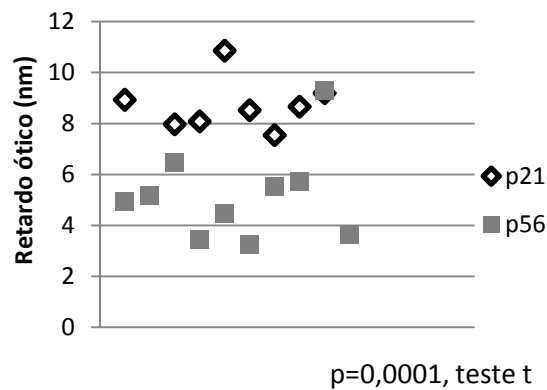


Gráfico 3. Retardos óticos de brilho de birrefringência (nm) de cortes não corados de 5 µm de espessura da MOES de animais incluídos nos grupos p21 e p56. Notou-se que o pamidronato em um maior tempo de tratamento induziu uma diminuição estatisticamente significativa dos retardos óticos de brilhos de birrefringência.

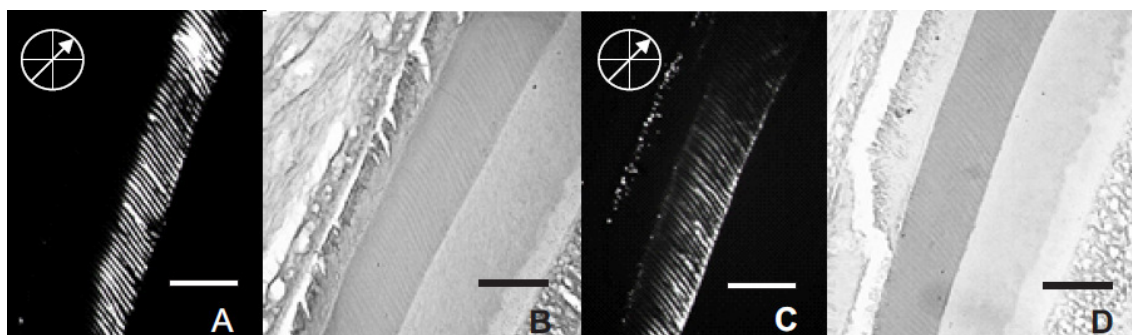


Figura 5. Micrografias de luz polarizada e de campo claro da MOES de ratos dos grupos c56 e p56. Os filtros polarizadores estão representados pelas barras cruzadas. Seta em 45° em relação aos filtros polarizadores indicam posição de máxima birrefringência. A barra em posição inferior direita representa 100 μm . A. Birrefringência da MOES de animal c56 em corte não corado de 5 μm de espessura de incisivo superior. B. Campo claro do corte A, após coloração com HE. C. Birrefringência da MOES de animal p56 em corte não corado de 5 μm de espessura de incisivo superior. D. Campo claro do corte C, após coloração com HE. Notou-se que o pamidronato não promoveu alterações morfológicas na MOES, porém esteve associado a uma expressiva redução no brilho de birrefringência daquela estrutura.

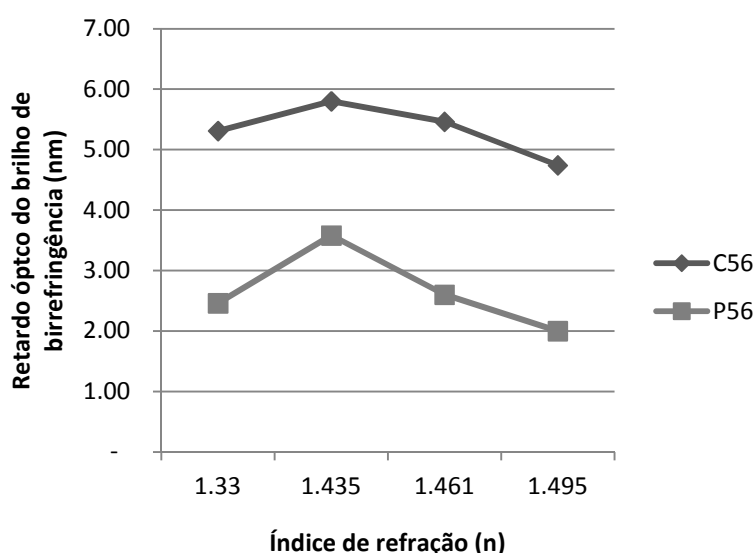
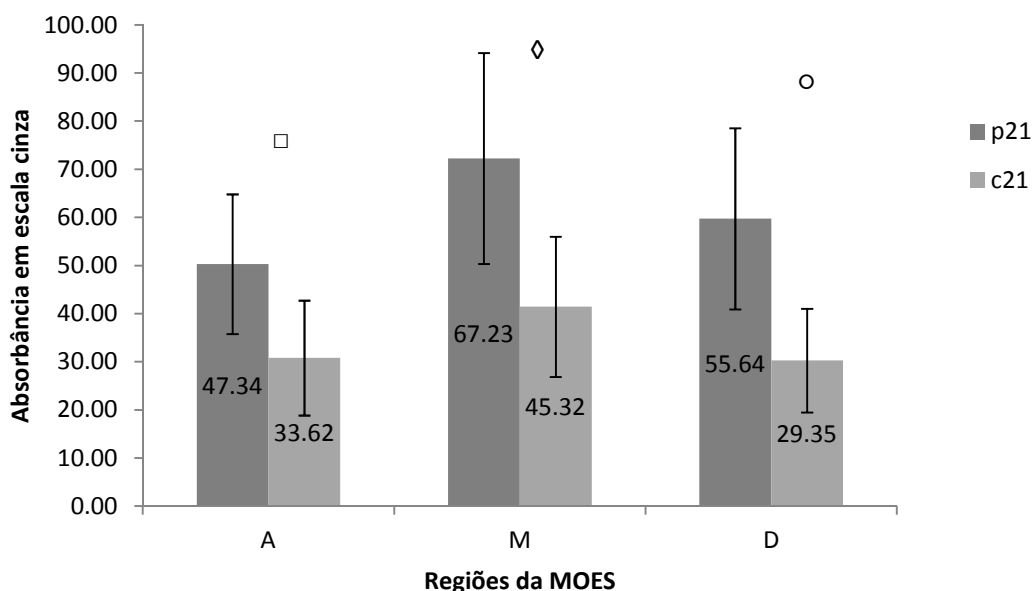


Gráfico 4. Curvas de dispersão de birrefringência de ratos c56 e p56. Retardos ópticos (nm) do brilho de birrefringência da MOES em cortes não corados de 5 μm de espessura de incisivos superiores, em função dos índices de refração (n) dos seguintes meios de embebição: água (n = 1,333), solução aquosa de glicerina a 80% (n = 1,435), glicerina 100% (n = 1,461) e resina Entellan® (n = 1,495). As medidas foram tomadas com o auxílio do compensador de Brace-Köhler. Cada ponto na curva corresponde à média de 10 mensurações.

6.3 Quantidade de proteínas na MOES

Ratos tratados com pamidronato por 21 dias mostraram um aumento estatisticamente expressiva na quantidade de proteínas das regiões M e D da MOES

quando comparados a animais c21 ($p = 0,0429$, $p = 0,0096$, respectivamente, ambos usando teste t; Gráfico 5). Animais dos grupos c56 e p56 exibiram valores estatisticamente semelhantes de absorvância em escala cinza nas regiões A ($p > 0,05$, teste t; Tabela 1), M e D ($p > 0,05$, teste de Mann-Whitney; Tabela 1).



□ $p = 0,0855$ (teste t); ◇ $p = 0,0429$ (teste t); ○ $p = 0,0096$ (teste t)

Gráfico 5. Quantidade de proteínas em cortes de 5 μm de espessura da MOES dos grupos c21 e p21 (valores representam médias de absorvância mensurada). Notou-se que o grupo p21 apresentou aumento expressivo na quantidade de proteínas nas regiões M e D daquela matriz.

Grupos	n	Regiões da MOES							
		A		M			D		
		Absorbância em escala cinza		Absorbância em escala cinza			Absorbância em escala cinza		
		Média	DP	Mediana	q1	q3	Mediana	q1	q3
c56	9	41,66 ^a	8,16	43,49 ^a	39,18	46,48	42,67 ^a	37,68	46,38
p56	9	41,26 ^a	4,15	43,19 ^a	40,81	45,20	43,20 ^a	42,61	46,45
		$p = 0,8928$, teste t		$p = 1,000$, teste de Mann-Whitney			$p = 0,534$, teste de Mann-Whitney		

Tabela 1. Quantidade de proteínas em cortes de 5 μm de espessura da MOES dos grupos c56 e p56. Diferenças estatísticas não foram observadas. DP = desvio padrão; q = quartil. Regiões da MOES: A (próxima aos ameloblastos); M (centro); D (próxima à dentina).

6.4 Microdureza e MEV do esmalte maduro transversalmente cortado

O esmalte maduro interno transversalmente seccionado de ratos c56 e p56 mostraram, por meio de MEV, um padrão regular de organização e orientação dos bastões de cristais de hidroxiapatita carbonatada. (Figura 6B, D). Regiões internas do

esmalte maduro também exibiram valores estatisticamente semelhantes de microdureza Knoop em todas as regiões e profundidades analisadas, ao ser realizada comparação entre os grupos c56 e p56 ($p > 0,05$; teste t ou de Mann-Whitney; Tabela 2). Estes resultados demonstraram que a administração de pamidronato dissódico não alterou a ultraestrutura e microdureza do esmalte interno.

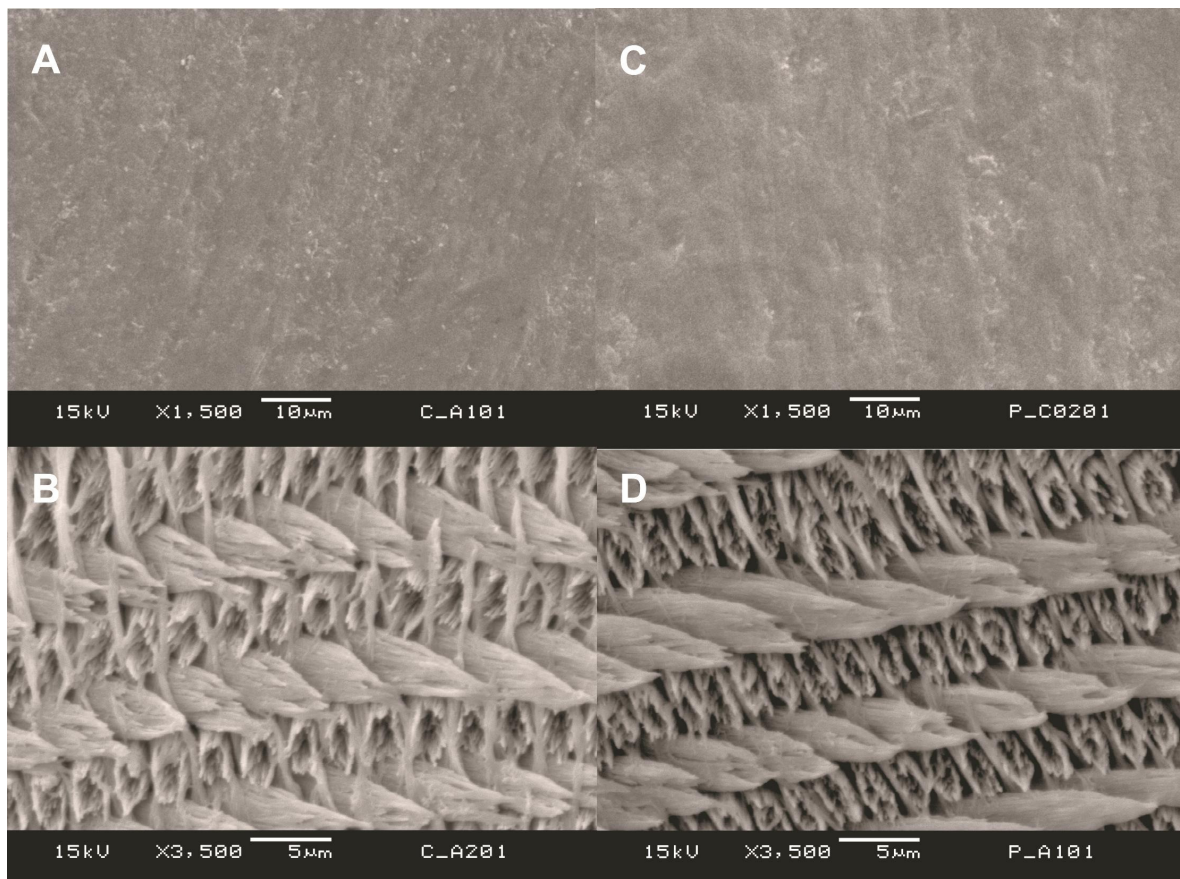


Figura 6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do esmalte maduro de incisivos maxilares dos ratos dos grupos c56 e p56. Animais dos grupos controle (A, B) e pamidronato (C, D) exibiram esmaltes maduros com aspectos externos e internos similares. Todos os espécimes exibiram um esmalte vestibular como contorno regular e sem modificações morfológica (A, C). Os esmaltes seccionados dos ratos c56 e p56 mostraram um padrão de organização e orientação regular dos prismas (B, D).

Grupos	n	Número de microdureza Knoop									
		Esmalte maduro vestibular					Esmalte maduro lateral				
		Distância da JAD					Distância da JAD				
		40 µm			80 µm		30 µm		60 µm		
		Mediana	q1	q3	Média	DP	Média	DP	Mediana	q1	q3
c56	9	272,52 ^a	262,63	282,88	354,69 ^a	26,11	281,21 ^a	37,68	292,54 ^a	289,63	297,22
p56	9	263,05 ^a	257,40	270,86	359,70 ^a	13,24	275,96 ^a	42,62	287,45 ^a	281,39	291,80
p = 0,265, teste de Mann-Whitney				p = 0,5893, teste t			p = 0,3938, teste t		p = 0,1551, teste de Mann-Whitney		

Tabela 2. Valores de microdureza Knoop do esmalte maduro em corte transversal (números de microdureza Knoop) dos grupos c56 e p56. Diferenças significantes não foram observadas. JAD = junção amelodentinária; q = quartil; DP = desvio padrão.

6.5 EDS e MEV da superfície externa vestibular do esmalte maduro

EDS mostrou que a quantidade de fósforo no esmalte maduro externo vestibular foi menor nos ratos p56 ao serem comparados ao grupo c56 ($p < 0,01$, teste de Mann-Whitney; Tabela 3). Conseqüentemente, a razão cálcio/fósforo foi maior no grupo p56 ($p < 0,05$, teste t; Gráfico 6). Micrografias eletrônicas de varredura da superfície externa vestibular de animais c56 e p56 mostraram que o pamidronato não causou alteração ultraestrutural significativa (Figura 6A, C). Todas as amostras exibiram superfície vestibular do esmalte maduro com contornos regulares e sem modificações morfológicas.

Grupos	n	EDS		
		Quantidade de fósforo (%)		
		Mediana	q1	q3
c56	9	28,55 ^a	28,18	29,25
p56	9	27,31 ^b	26,45	27,64
p = < 0,0001, teste de Mann-Whitney				

Tabela 3. Quantidade de fósforo no esmalte maduro dos grupos c56 e p56. Uma diminuição estatisticamente significativa deste elemento químico foi observada no grupo p56. q = quartil.

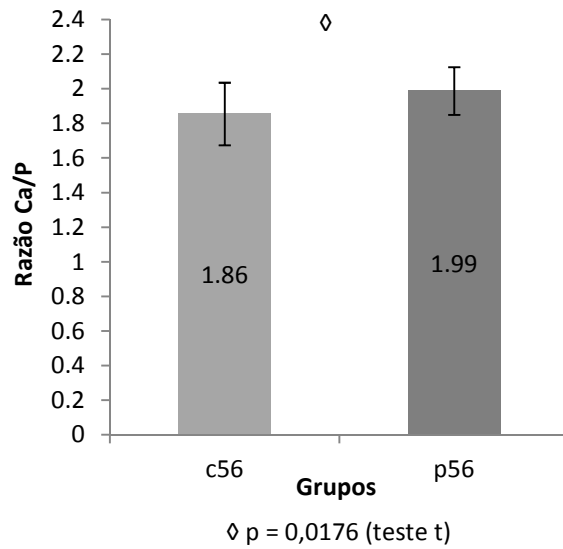


Gráfico 6. Razão cálcio/fósforo no esmalte maduro superficial vestibular dos grupos c56 e p56. Notou-se que o grupo p56 exibiu pequeno aumento estatisticamente significativo desta razão.

7. DISCUSSÃO

A amelogenese é caracterizada pela secreção de uma mistura complexa de proteínas singulares ao esmalte que é processada, clivada e substituída por cristais de hidroxiapatita carbonatada, formando a estrutura mais dura dos vertebrados (BARTLETT, 2013; EISENMANN *et al.*, 1979). Pesquisas recentes a respeito da biologia estrutural da MOES indicam que proteínas intactas do esmalte (amelogeninas, enamelinas e ameloblastinas) e/ou produtos proteolíticos C-terminais estão presentes apenas nas regiões daquela matriz de início de mineralização (próximas aos ameloblastos) e não são localizados em camadas profundas, depositadas a mais tempo (próximas a dentina) (BARTLETT, 2013). Subsequentemente, elas são clivadas por enamelinina (Mmp20) e os seus produtos proteolíticos N-terminais acumulam-se em áreas mais profundas da MOES formando molde que define a forma, tamanho e orientação dos cristalitos em crescimento (BARTLETT, 2013). Uma vez que o fim da fase secretora é atingido e fitas de cristalitos param de crescer em comprimento, a peptidase 4 relacionada à calicreína (Klk4) é secretada para clivar as proteínas daquele molde que possam ser extensivamente removidas para o completo endurecimento do esmalte, com os cristalitos em maturação finalizando seu alargamento, fusionando-se formando uma estrutura prismática coesa (BARTLETT, 2013).

Relatos científicos prévios mostram que a MOES acima descrita, composta principalmente por amelogeninas, é fortemente birrefringente em microscopia de luz polarizada (DO ESPÍRITO SANTO *et al.*, 2006). O uso de luz polarizada denuncia em materiais biológicos ou minerais o brilho de birrefringência, cuja intensidade pode ser mensurada, sendo diretamente proporcional ao retardo ótico em nanômetros (DA SILVA *et al.*, 2006). Valores de retardo ótico são diretamente proporcionais à organização ordenada de macromoléculas de tecidos filamentosos (VIDAL, 2003). A birrefringência da MOES parece ser desencadeada pela polimerização das nanosferas de amelogeninas e ser aumentada após a clivagem de cadeias amelogenina intactas pela MMP20 (DO ESPÍRITO SANTO *et al.*, 2007). Interessantemente, relatos aqui citados mostram que a birrefringência da MOES não é claramente observada perto do ameloblastos (onde as intactas proteínas do esmalte e/ou seus produtos proteolíticos C-terminais estão presentes), mas nas camadas de esmalte mais profundas (onde os produtos proteolíticos N-terminais das referidas proteínas estão localizados) (DO ESPÍRITO SANTO *et al.*, 2007; DO ESPÍRITO SANTO *et al.*, 2006). Uma vez que a birrefringência ocorre como consequência da polimerização ordenada de macromoléculas, mudanças nesta propriedade anisotrópica podem refletir alterações qualitativas e/ou quantitativas na organização supramolecular de seus componentes. Estas modificações podem ser o ponto de partida para distúrbios na forma, tamanho e

orientação dos cristalitos do esmalte em desenvolvimento, levando a defeitos no esmalte maduro. Dessa forma, hipotetizamos que alterações na birrefringência da MOES é um possível mecanismo pelo qual os fatores ambientais podem causar defeitos na estrutura mais mineralizada dos organismos vertebrados como descrito em trabalho prévio realizado por DO ESPÍRITO SANTO e colaboradores (2010).

Uma análise da literatura revela que todos os estudos investigando os efeitos dos BFs sobre o esmalte utilizam o etidronato e/ou alendronato (DO ESPÍRITO SANTO *et al.*, 2010; FEJERSKOV *et al.*, 1990; FOU DA *et al.*, 1989; FOU DA *et al.*, 1991; FUANGTHARNTHIP *et al.*, 2000; JOSEPHSEN *et al.*, 1990; NELSON-FILHO *et al.*, 2012; SIMMELINK, 1987; WAKAMATSU, 1991; WEILE *et al.*, 1993; YAMADA *et al.*, 2000). Pesquisas com etidronato em ratos usam doses que variam entre 0,5 mg/kg e 10 mg/kg em dose única ou múltiplas, com apresentação constante de um efeito deletério à formação do esmalte (FEJERSKOV *et al.*, 1990; FOU DA *et al.*, 1989; FOU DA *et al.*, 1991; FUANGTHARNTHIP *et al.*, 2000; JOSEPHSEN *et al.*, 1990; SIMMELINK, 1987; WAKAMATSU, 1991; WEILE *et al.*, 1993). Com base nesses dados, o uso clínico de etidronato deve ser sistematicamente descartado. Os resultados de pesquisas utilizando o alendronato apresentam indícios de que apesar dessa droga poder influenciar na formação do esmalte, ou aumentando a quantidade de amelogenina presente na MOES (MASSA *et al.*,) ou se incorporando ao esmalte maduro (NELSON-FILHO *et al.*, 2012) seus efeitos não afetam as características morfológicas (DO ESPÍRITO SANTO *et al.*, 2010; NELSON-FILHO *et al.*, 2012) ou as propriedades físicas (NELSON-FILHO *et al.*, 2012) dessa estrutura. Portanto, o uso de alendronato em crianças parece ser seguro no que se refere aos efeitos sobre a formação do esmalte.

O presente trabalho é o primeiro estudo que avalia os efeitos do pamidronato dissódico, um NBF amplamente prescrito para crianças assim como o alendronato, na formação do esmalte dentário. Não há consenso hoje acerca da dose ideal a ser utilizada por pacientes pediátricos de pamidronato dissódico (CHIBULE & MADHURI, 2012). Efeitos colaterais podem se apresentar após a administração dessa medicação (CHIBULE & MADHURI, 2012). Por ser um bisfosfonato nitrogenado e interferir no ciclo do mevalonato, o pamidronato leva à uma elevação no isopentenilo, uma substância pró-inflamatória (COXON & ROGERS, 2003), e o paciente pode apresentar febre após a administração do fármaco (CHIBULE & MADHURI, 2012). Assim como pode sofrer uma diminuição da quantidade de osteoclastos ativos, e uma consequente hipocalcemia pode se instalar (CHIBULE & MADHURI, 2012). No presente trabalho, a dosagem da droga seguiu as normas relatadas na bula da Eurofarma, assim como analisamos o uso dessa medicação em estudo prévio (RAO *et al.*, 2008). No presente estudo não foi observada nenhuma reação inflamatória nos animais. Os ratos tratados por 21 dias foram usados para análise do pamidronato na MOES, já os ratos com

eutanazados em 56 dias de experimento foram utilizados para análise tanto da MOES quanto do esmalte maduro. Ratos tratados com pamidronato por 21 e 56 dias, não apresentaram alterações morfológicas na MOES como revelado por microscopia de luz polarizada e de campo claro, mas eles mostraram birrefringências intrínseca e de forma significativamente mais fracas quando comparados com os animais dos grupos controles (Gráficos 2 e 4; Figura 5).

Ratos pamidronato e controle apresentaram o brilho máximo birrefringência quando os prismas orientavam-se em 45° em relação aos filtros polarizadores (Figura 5). A diminuição dos valores de retardo óptico nos ratos p21 pode ser explicada por um aumento estatisticamente significativo na quantidade de proteínas detectado nas regiões M e D da MOES (Gráfico 4). Estas descobertas estão de acordo com o relato anterior sobre a diminuição da birrefringência induzida por outro NBF (alendronato) e com evidências anteriores de maior síntese/secreção de amelogeninas por ameloblastos de ratos tratados com o alendronato, quando comparado com animais controles, bem como de inibição da atividade da MMP20 pelo pamidronato e outros BFs (DO ESPÍRITO SANTO *et al.*, 2010; HEIKKILÄ *et al.*, 2002; MASSA *et al.*, 2006). De fato, já foi demonstrado que a clivagem proteolítica de amelogeninas por Mmp20 está relacionada com a formação de uma MOES mais fortemente birrefringente (DO ESPÍRITO SANTO *et al.*, 2007). Curiosamente, uma maior diminuição estatisticamente significativa nos valores de retardo óptico foi comprovada em ratos p56 (Gráficos 2, 3 e 4), que mostrou valores estatisticamente semelhantes de proteínas nas regiões A, M e D da MOES quando comparado com os animais c56 (Tabela 1). É possível que devido ao fato dos BFs serem drogas de eliminação lenta, e dos ratos do grupo p56 terem recebido uma dose total maior de pamidronato (4 semanas a mais que se traduzem em 20 mg/kg a mais de medicação), que o efeito da sua administração no esmalte tenha sido acumulativo. Os resultados aqui apresentados indicam que o pamidronato dissódico possivelmente induziu alterações no estado de agregação da MOES, mas não na quantidade e na orientação dos seus componentes.

Os ratos no presente estudo foram tratados por até 56 dias para se examinar o efeito do pamidronato sobre o esmalte maduro, já que é tempo suficiente para renovação completa do esmalte sob influência da droga (DO ESPÍRITO SANTO *et al.*, 2010; NELSON-FILHO *et al.*, 2012). Como a taxa de erupção dentária pode ser afetada pelo uso do pamidronato (KAMOUN-GOLDRAT *et al.*, 2008) ela foi registrada no intuito de se averiguar se o esmalte maduro havia realmente se renovado por completo. Como não houve diferença estatisticamente significativa (diferença entre p21 e c21 de $p=0.5907$; diferença entre p56 e c56 de $p=0.1979$, ambos com teste t) entre os grupos quanto à taxa de erupção, conclui-se que a dose do pamidronato utilizada não afetou a

erupção dentária dos ratos e logo, os dados coletados acerca do esmalte maduro foram coerentes com o proposto nos objetivos da presente dissertação.

A EDS é uma técnica que analisa a composição química de um material de forma não destrutiva. Quando usada no presente trabalho, a EDS demonstrou uma alteração na composição química do esmalte. A análise com o EDS revelou um pequeno aumento da razão cálcio/fósforo como consequência de uma leve diminuição na quantidade de fósforo no esmalte maduro superficial vestibular de ratos tratados com pamidronato por 56 dias, quando comparado ao grupo c56 (Gráfico 6 e Tabela 2, respectivamente). Estes achados podem estar associados com relato anterior sobre a incorporação de alendronato na estrutura cristalina do esmalte de incisivos maxilares de ratos tratados sistemicamente com aquele fármaco (NELSON-FILHO *et al.*, 2012). Não houve variação estatisticamente significativa na quantidade de cálcio no esmalte maduro, algo que poderia ter sucedido já que essa medicação pode induzir a uma hipocalcemia após sua administração (CHIBULE & MADHURI, 2012). A relevância clínica dos dados de EDS aqui apresentados deve ser investigada, explorando, por exemplo, o efeito de uma maior relação cálcio/fósforo induzida por pamidronato sobre a resistência do esmalte aos ácidos produzidos por bactérias cariogênicas.

O pamidronato não induziu alterações ultraestruturais em áreas internas e na superfície externa do esmalte maduro vestibular, como pela MEV (Figura 6). Isto está de acordo com os de microscopias de luz polarizada e de campo claro do presente trabalho, e com os estudos de DO ESPÍRITO SANTO e colaboradores (2010) e NELSON-FILHO e colaboradores (2012), que não mostraram alterações morfológicas na superfície externa e em regiões internas do esmalte maduro em incisivos superiores de ratos tratados com alendronato.

A microdureza está relacionada ao grau de mineralização e a quantidade de matriz restante no esmalte maduro, quanto maior a quantidade de matriz remanescente no esmalte, menor sua microdureza (MARGOLIS *et al.*, 2014). A microdureza de todas as regiões analisadas de esmalte maduro interno em corte transversal mostrou que o pamidronato não induziu uma redução de microdureza daquela estrutura (Tabela 3), confirmando relatórios anteriores sobre o efeito do alendronato sobre as propriedades mecânicas do esmalte maduro (NELSON-FILHO *et al.*, 2012), e contrapondo-se a achados anteriores sobre o efeito de um NBF na microdureza interna do esmalte (DO ESPÍRITO SANTO *et al.*, 2010).

8. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo sugerem que o pamidronato dissódico pode alterar a quantidade e a organização da MOES, afetando a sua birrefringência, assim como pode influenciar na composição química do esmalte maduro, induzindo a um leve aumento da razão cálcio/fósforo. Estas alterações, no entanto, parecem não estar associadas a modificações nas propriedades morfológicas e/ou mecânicas daquela estrutura, sugerindo que o uso clínico dessa droga em crianças pode ser seguro no que se refere às preocupações com alterações dentárias e susceptibilidade à cárie.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALLGROVE, J. Biphosphonates. **Archives of disease in childhood**, London, v.76, n.1, p.73-5, 1997.
2. BACHRACH, L.K.; WARD L.M. Clinical review 1: Bisphosphonate use in childhood osteoporosis. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, Springfield, v.94, n.2, p 400-9, 2009.
3. BARROS E.R.; SARAIVA, G.L.; DE OLIVEIRA, T.P.; LAZARETTI-CASTRO, M. Safety and efficacy of a 1-year treatment with zoledronic acid compared with pamidronate in children with osteogenesis imperfecta. **Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM**, Berlim, v.25, n.5-6, p.485-91, 2012.
4. BARTLETT, J.D. Dental enamel development: proteinases and their enamel matrix substrates. **ISRN dentistry**, Cairo, v.16, n.1, p.4-24, 2013.
5. BASEL, D.; STEINER R.D. Osteogenesis imperfecta: recent findings shed new light on this once well-understood condition. **Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics**, Baltimore, v.11, n.6, p.375-85, 2009.
6. BELLIDO, T.; PLOTKIN, L.I. Novel actions of bisphosphonates in bone: preservation of osteoblast and osteocyte viability. **BONE**, Elmsford, v.49, n.1, p.50-5, 2011.
7. CASTILLO, H.; SAMSON-FANG, L. American Academy for Cerebral Palsy and Developmental Medicine Treatment Outcomes Committee Review Panel. Effects of bisphosphonates in children with osteogenesis imperfecta: an AACPDMD systematic review. **Developmental medicine and child neurology**, Oxford, v.51, n.1, p.17-29, 2009.
8. CHILBULE, S.K.; MADHURI, V. Complications of pamidronate therapy in paediatric osteoporosis. **Journal of children's orthopaedics**, Heidelberg, v.6, n.1, p.37-43, 2012.
9. COXON, F.P.; ROGERS, M.J. The role of prenylated small GTP-binding proteins in the regulation of osteoclast function. **Calcified tissue international**, Berlim, v.72, n.1, p.80-4, 2003.
10. COXON, F.P.; THOMPSON, K.; ROELOFS, A.J.; EBETINO, F.H.; ROGERS, M.J. Visualizing mineral binding and uptake of bisphosphonate by osteoclasts and non-resorbing cells. **BONE**, Elmsford, v.42, n.5, p.848-60, 2008.
11. CREMERS, S.; PAPAPOULOS, S. Pharmacology of bisphosphonates. **BONE**, Elmsford, v.49, n.1, p.42-9, 2011.
12. DA SILVA, D. DE F.; VIDAL, B. DE C.; ZECELL, D.M.; ZORN, T.M.; NÚÑEZ, S.C.; RIBEIRO, M.S. Collagen birefringence in skin repair in response to red polarized-laser therapy. **Journal of biomedical optics**, Bellingham, v.11, n.2, p. 10-16, 2006
13. DE ARAUJO, A.M.; GOMES, C.C.; DE ALMEIDA, S.M.; KLAMT, C.B. NOVAES, P.D. Effect of radiotherapy on the eruption rate and morphology of the

- odontogenic region of rat incisors. **Archives of oral biology**, Oxford, v.59, n.11, p.1242-8, 2014.
14. DO ESPÍRITO SANTO, A.R.; FROZONI, M.R.; RAMOS-PEREZ, F.M.; NOVAES, P.D.; LINE, S.R. Birefringence of the secretory-stage enamel organic extracellular matrix from rats submitted to successive injections of bisphosphonates. **Connective tissue research**, New York, v.51, n.3, p.208-15, 2010.
 15. DO ESPÍRITO SANTO, A.R.; BARTLETT, J.D.; GIBSON, C.W.; LI, Y.; KULKARNI, A.B.; LINE, S.R. Amelogenin- and enamelysin (Mmp-20)-deficient mice display altered birefringence in the secretory-stage enamel organic extracellular matrix. **Connective tissue research**, New York, v.48, n.1, p.39-45, 2007.
 16. DO ESPÍRITO SANTO, A.R.; NOVAES, P.D.; LINE, S.R. Anisotropic properties of the enamel organic extracellular matrix. **European journal of oral sciences**, Chichester, v.114, n.1, p.333-7, 349-50, 382, 2006.
 17. DWAN, K.; PHILLIPI, C.A.; STEINER, R.D.; BASEL, D. Bisphosphonate therapy for osteogenesis imperfecta. **The Cochrane database of systematic reviews**, Oxford, v.23, n.7, p. 1-49, 2014.
 18. EBETINO, F.H.; HOGAN, A.M.; SUN, S.; TSOUMPRA, M.K.; DUAN, X.; TRIFFITT, J.T.; KWAASI, A.A.; DUNFORD, J.E.; BARNETT, B.L.; OPPERMAN, U.; LUNDY, M.W.; BOYDE, A.; KASHEMIROV, B.A.; MCKENNA, C.E.; RUSSELL, R.G. The relationship between the chemistry and biological activity of the bisphosphonates. **BONE**, Elmsford, v.49, n.1, p.20-33, 2011.
 19. EISENMANN, D.R.; ASHRAFI, S.; NEIMAN, A. Calcium transport and the secretory ameloblast. **The anatomical record : advances in integrative anatomy and evolutionary biology**, Hoboken, v.193, n.3, p.403-22, 1979.
 20. EL NESR, N.M.; AVERY, J.K. **Tooth eruption and shedding**. In: Avery J.K. (ed) Oral development and histology. Thieme, New York, 2002. p. 123–140.
 21. ELLWOOD, R.P.; O'MULLANE, D. The association between developmental enamel defects and caries in populations with and without fluoride in their drinking water. **Journal of public health dentistry**, Raleigh, v.56, n.2, p.76-80, 1996.
 22. FEJERSKOV, O.; JOSEPHSEN, K.; WEILE, V. The effect of a single dose of 1-hydroxyethylidene-1, 1-bisphosphonate (HEBP) on secretory ameloblasts and enamel formation in rat incisors. **Journal de biologie buccale**, Paris, v. 18, n. 4, p. 339-54, 1990.
 23. FLEISCH, H. Bisphosphonates – History and experimental basis. **BONE**, Elmsford, v.8, n.1, p.23-8, 2007.
 24. FLEISCH, H. Bisphosphonates: mechanisms of action and clinical use in osteoporosis--an update. **Hormone and metabolic research**, Stuttgart, v.29, n.3, p.145-50, 1997.
 25. FOUDA, N.; CARACATSANIS, M.; HAMMARSTRÖM, L. Developmental disturbances of the rat molar induced by two diphosphonates. **Advances in dental research**, Washington, v.3, n.2, p.234-40, 1989.

26. FOUDA, N.; CARACATSANIS, M.; KUT, I.A.; HAMMARSTRÖM, L. Mineralization disturbances of the developing rat molar induced by mono- and bisphosphonates. **Journal de biologie buccale**, Paris, v.19, n.1, p.106-15, 1991.
27. FUANGTHARNTHIP, P.; YAMADA, Y.; TAKAGI, Y.; OHYA, K. Autoradiographic investigation of the effect of 1-hydroxyethylidene-1, 1-bisphosphonate on matrix protein synthesis and secretion by secretory ameloblasts in rat incisors. **Archives of oral biology**, Oxford, v.45, n.6, p.495-506, 2000.
28. GERLACH, R.F.; CURY, J.A.; KRUG, F.J.; LINE, S.R. Effect of lead on dental enamel formation. **Toxicology**, Limerick, v.175, n.1-3, p.27-34, 2002.
29. GLORIEUX, F.H.; BISHOP, N.J.; PLOTKIN, H.; CHABOT, G.; LANOUE, G.; TRAVERS, R. Cyclic administration of pamidronate in children with severe osteogenesis imperfecta. **The New England journal of medicine**, Boston, v.339, n.14, p.947-52, 1998.
30. GRIER, R.L. 4TH.; WISE, G.E. Inhibition of tooth eruption in the rat by a bisphosphonate. **Journal of dental research**, Thousand Oaks, v.77, n.1, p.8-15, 1998.
31. HEIKKILÄ, P.; TERONEN, O.; MOILANEN, M.; KONTTINEN, Y.T.; HANEMAAIJER, R.; LAITINEN, M.; MAISI, P.; VAN DER PLUIJM, G.; BARTLETT, J.D.; SALO, T.; SORSA, T. Bisphosphonates inhibit stromelysin-1 (MMP-3), matrix metalloelastase (MMP-12), collagenase-3 (MMP-13) and enamelysin (MMP-20), but not urokinase-type plasminogen activator, and diminish invasion and migration of human malignant and endothelial cell lines. **Anti-cancer drugs**, London, v.13, n.3, p.245-54, 2002.
32. HIRAGA, T.; NINOMIYA, T.; HOSOYA, A.; NAKAMURA, H. Administration of the bisphosphonate zoledronic acid during tooth development inhibits tooth eruption and formation and induces dental abnormalities in rats. **Calcified tissue international**, New York, v.86, n.6, p.502-10, 2010.
33. IWAI, T.; ISOMATSU, Y.; IWAMOTO, M.; TOHNAI, I. Bisphosphonate-related enamel hypoplasia in a child with idiopathic arterial calcification of infancy. **The British journal of oral & maxillofacial surgery**, Edinburgh, v.51, n.7, p.186-7, 2013.
34. JEONG, H.M.; JIN, Y.H.; CHOI, Y.H.; CHUNG, J.O.; CHO, D.H.; CHUNG, M.Y.; CIVITELLI, R.; CHUNG, D.J.; LEE, K.Y. Risedronate increases osteoblastic differentiation and function through connexin43. **Biochemical and biophysical research communications**, New York, v.432, n.1, p.152-6, 2013.
35. JOSEPHSEN, K.; FEJERSKOV, O.; BAELUM, V.; WEILE, V. The effect of a single dose of 1-hydroxyethylidene-1, 1-bisphosphonate (HEBP) on presecretory ameloblast differentiation in rat incisors. **Journal de biologie buccale**, Paris, v.18, n.4, p.321-37, 1990.
36. KAMOUN-GOLDRAT, A.; GINISTY, D.; LE MERRER, M. Effects of bisphosphonates on tooth eruption in children with osteogenesis imperfecta. **European journal of oral sciences**, Chichester, v.116, n.3, p.195-8, 2008.

37. KIMMEL, D.B. Mechanism of action, pharmacokinetic and pharmacodynamic profile, and clinical applications of nitrogen-containing bisphosphonates. **Journal of dental research**, Thousand Oaks, v.86, n.11, p.1022-33, 2007.
38. KITAOKA T, NAMBA N, MIURA K, KUBOTA T, OHATA Y, FUJIWARA M, HIRAI H, YAMAMOTO T, OZONO K. Decrease in serum FGF23 levels after intravenous infusion of pamidronate in patients with osteogenesis imperfecta. **Journal of bone and mineral metabolism**, Tóquio, v.29, n.5, p.598-605, 2011.
39. LEHENKARI, P.P.; KELLINSALMI, M.; NÄPÄNKANGAS, J.P.; YLITALO, K.V.; MÖNKKÖNEN J.; ROGERS, M.J.; AZHAYEV, A.; VÄÄNÄNEN, H.K.; HASSINEN, I.E. Further insight into mechanism of action of clodronate: inhibition of mitochondrial ADP/ATP translocase by a nonhydrolyzable, adenine-containing metabolite. **Molecular pharmacology**, Bethesda, v.61, n.5, p.1255-62, 2002.
40. MARGOLIS, H.C.; KWAK, S.Y.; YAMAZAKI, H. Role of mineralization inhibitors in the regulation of hard tissue biomineralization: relevance to initial enamel formation and maturation. **Frontiers in physiology**, Lausanne, v.10, n.5, p.339, 2014.
41. MASARACHIA, P.; WEINREB, M.; BALENA, R.; RODAN, G.A. Comparison of the distribution of 3H-alendronate and 3H-etidronate in rat and mouse bones. **BONE**, Elmsford, v.19, n.3, p.281-90, 1996
42. MASSA, L.F.; BRADASCHIA-CORREA, V.; ARANA-CHAVEZ, V.E. Immunocytochemical study of amelogenin deposition during the early odontogenesis of molars in alendronate-treated newborn rats. **Journal of histochemistry & cytochemistry**, Baltimore, v.54, n.6, p.713-25, 2006.
43. MODESTO, A.; KLEIN, O.; TENUTA, L.M.; GERLACH, R.F.; VIEIRA, A.R. Summary of the IADR Cariology Research, Craniofacial Biology, and Mineralized Tissue Groups Symposium, Iguazu Falls, Brazil, June 2012: Gene-environment Interactions and Epigenetics in Oral Diseases: Enamel Formation and its Clinical Impact on Tooth Defects, Caries, and Erosion. *Dent 3000*. 2013. 1:pii:http://dentistry3000.pitt.edu/ojs/inde. 2012.
44. MOFATTO, L.S.; FROZONI, M.R.; DO ESPÍRITO SANTO, A.R.; GUIMARÃES, G.N.; DE SOUZA, A.P.; DE CAMPOS VIDAL, B.; LINE, S.R. Fluoride effect on the secretory-stage enamel organic extracellular matrix of mice. **Connective tissue research**, London, v.52, n.3, p.212-7, 2011.
45. MÖNKKÖNEN, H.; AURIOLA, S.; LEHENKARI, P.; KELLINSALMI, M.; HASSINEN, I.E.; VEPSÄLÄINEN, J.; MÖNKKÖNEN, J. A new endogenous ATP analog (ApppI) inhibits the mitochondrial adenine nucleotide translocase (ANT) and is responsible for the apoptosis induced by nitrogen-containing bisphosphonates. **British journal of pharmacology**, London, v.147, n.4, p.437-45, 2006.
46. MÖNKKÖNEN, J.; KOPONEN, H.M.; YLITALO, P. Comparison of the distribution of three bisphosphonates in mice. **Pharmacology & toxicology**, Copenhagen, v.66, n.4, p.294-8, 1990.

47. MORADIAN-OLDAK, J.; DU, C.; FALINI, G. On the formation of amelogenin microribbons. **European journal of oral sciences**, Chichester, v.114, n.1, p.289-96, 327-9, 382, 2006.
48. NAGANO, T.; KAKEGAWA, A.; YAMAKOSHI, Y.; TSUCHIYA, S.; HU, J.C.; GOMI, K.; ARAI, T.; BARTLETT, J.D.; SIMMER, J.P. Mmp-20 and Klk4 cleavage site preferences for amelogenin sequences. **Journal of dental research**, Thousand Oaks, v.88, n.9, p.823-8, 2009.
49. NANJI, A. **Ten Cate's Oral Histology, Development, Structure, and Function**, Mosby, St. Louis, Mo, USA, 2003.
50. NELSON-FILHO, P.; LUCISANO, M.P.; DA SILVA, R.A.; DA SILVA, R.S.; SERRA, M.C.; GERLACH, R.F.; NETO, F.C.; CARNEIRO, Z.A.; ZAMARIOLI, A.; MORSE, L.; BATTAGLINO, R. Systemically alendronate was incorporated into dental tissues but did not cause morphological or mechanical changes in rats teeth. **Microscopy research and technique**, New York, v.75, n.9, p.1265-71, 2012.
51. PAINE, M.L.; SNEAD, M.L. Protein interactions during assembly of the enamel organic extracellular matrix. **Journal of bone and mineral research** : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research, Washington, v.12, n.2, p.221-7, 1997.
52. PAINE, M.L.; WANG, H.J.; SNEAD, M.L. Amelogenin self-assembly and the role of the proline located within the carboxyl-teleopeptide. **Connective tissue research**, London, v.44, n.1, p.52-7, 2003.
53. PAPAPOULOS, S.E. Bisphosphonates: how do they work? Best practice & research. **Clinical endocrinology & metabolism**, Amsterdam, v.22, n.5, p.831-47, 2008.
54. RAO, S.H.; EVANS, K.D.; OBERBAUER, A.M.; MARTIN, R.B. Bisphosphonate treatment in the oim mouse model alters bone modeling during growth. **Journal of biomechanics**, New York, v. 41, n. 16, p. 3371-6, dez 2008.
55. RAVINDRANATH, H.H.; CHEN, L.S.; ZEICHNER-DAVID, M.; ISHIMA, R.; RAVINDRANATH, R.M. Interaction between the enamel matrix proteins amelogenin and ameloblastin. **Biochemical and biophysical research communications**, New York, v.323, n.3, p.1075-83, 2004.
56. ROELOFS, A.J.; COXON, F.P.; EBETINO, F.H.; LUNDY, M.W.; HENNEMAN, Z.J.; NANCOLLAS, G.H.; SUN, S.; BLAZEWSKA, K.M.; BALA, J.L.; KASHEMIROV, B.A.; KHALID, A.B.; MCKENNA, C.E.; ROGERS, M.J. Fluorescent risedronate analogues reveal bisphosphonate uptake by bone marrow monocytes and localization around osteocytes in vivo. **Journal of bone and mineral research** : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research, Washington, v.25, n.3, p.606-16, 2010.
57. ROGERS, M.J.; CROCKETT, J.C.; COXON, F.P.; MÖNKKÖNEN, J. Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. **BONE**, Elmsford, v.49, n.1, p.34-41, 2011.
58. RUSSELL, R.G. Bisphosphonates: the first 40 years. **BONE**, Elmsford, v.49, n.1, p.2-19, 2011.

59. SELANDER, K.S.; MÖNKKÖNEN, J.; KARHUKORPI, E.K.; HÄRKÖNEN, P.; HANNUNIEMI, R.; VÄÄNÄNEN, H.K. Characteristics of clodronate-induced apoptosis in osteoclasts and macrophages. **Molecular pharmacology**, Bethesda, v.50, n.5, p.1127-38, 1996.
60. SIMMELINK, J.W. Ultrastructural effects of diphosphonates on dental enamel. **Advances in dental research**, Washington, v.1, n.2, p.356-65, 1987.
61. SIMMER, J.P.; HU, J.C. Dental enamel formation and its impact on clinical dentistry. **Journal of dental education**, Washington, v.65, n.9, p.896-905, 2001.
62. THESLEFF, I. Tooth morphogenesis. **Advances in dental research**, Washington, v.9, n.3, 1995.
63. VIDAL, B. Image analysis of tendon helical superstructure using interference and polarized light microscopy. **Micron : the international research and review journal for microscopy**, Oxford, v.34, n.8, p.423-32, 2003.
64. VIDAL, B.C.; MELLO, M.L. Supramolecular order following binding of the dichroic birefringent sulfonic dye Ponceau SS to collagen fibers. **Biopolymers**, New York, v.78, n.3, p.121-8, 2005.
65. WAKAMATSU, H. A study of the effects of successive injections of 1-hydroxyethylidene-1, 1-bisphosphonate (HEBP) on the enamel formation of rat incisor. **Journal of oral biology**, Northborough, v.33, n.1, p.82-96, 1991.
66. WEILE, V.; JOSEPHSEN, K.; FEJERSKOV, O. Scanning electron microscopy of final enamel formation in rat mandibular incisors following single injections of 1-hydroxyethylidene-1,1-bisphosphonate. **Calcified tissue international**, Berlin, v.52, n.4, p.318-24, 1993.
67. WISE G, KING G. Mechanisms of tooth eruption and orthodontic tooth movement. **Journal of dental research**, Thousand Oaks, v.87, n.5, p.414–434, 2008.
68. YAMADA, Y.; FUANGTHARNTHIP, P.; TAMURA, Y.; TAKAGI, Y.; OHYA, K. Gene expression and immunolocalization of amelogenin in enamel hypoplasia induced by successive injections of bisphosphonate in rat incisors. **Archives of oral biology**, Oxford, v.45, n.3, p.207-15, 2000.

10. ANEXOS

ANEXO A

Bisphosphonates: pharmacokinetics, bioavailability, mechanisms of action, clinical applications in children, and effects on tooth development

Ana Prates Soares^a, Renan Fernandes do Espírito Santo^b, Sérgio Roberto Peres Line^c, Maria das Graças Farias Pinto^d, Pablo de Moura Santos^e, Maria Betânia Pereira Toralles^f, Alexandre Ribeiro do Espírito Santo^{g,*}

^a Multidisciplinary Institute of Health, Federal University of Bahia – UFBA, Rua Rio de Contas, 58, Quadra 17, Lote 58, Candeias, Vitória da Conquista/BA, Brasil, CEP 45.029-094. anapratess@hotmail.com.

^b Faculty of Pharmacy, Federal University of Bahia – UFBA, Rua Barão de Jeremoabo, S/N, Campus Universitário de Ondina, Ondina, Salvador/BA, Brasil, CEP 40.170-115. r.fernandes88@hotmail.com.

^c Piracicaba Dental School, University of Campinas – UNICAMP, Av. Limeira, 901, Areião, Piracicaba/SP, Brasil, CEP 13.414-903. serglin@unicamp.br.

^d School of Veterinary Medicine and Zootechny, Federal University of Bahia – UFBA, Av. Ademar de Barros, 500, Ondina, Salvador/BA, Brasil, CEP 40.170-110. pintogra@ufba.br.

^e Professor Edgard Santos University Hospital, Federal University of Bahia – UFBA, Rua Augusto Viana, S/N, Canela, Salvador/BA, Brasil, CEP 40.110-060. pablomoura@ufba.br.

^f Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia – UFBA, Av. Reitor Miguel Calmon, S/N, Vale do Canela, Salvador/BA, Brasil, CEP 40.110-902. m.toralles@uol.com.br.

^g Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia – UFBA, Av. Reitor Miguel Calmon, S/N, Vale do Canela, Salvador/BA, Brasil, CEP 40.110-902. arespirtosanto@ufba.br.

* **Corresponding author.** Tel.: +55 71 32838939.

Abstract

ANEXO A

Bisphosphonates (BPs) avidly bind to calcium crystals and inhibit osteoclastic bone resorption, making them useful for treatment of skeletal disorders such as osteoporosis, Paget's disease, osteogenesis imperfecta and metastatic bone diseases. BPs therapeutically act by causing toxic effects on osteoclasts or interfering with specific intracellular pathways in those cells. BPs that possess nitrogen in their composition are called nitrogen-containing BPs (NBPs) and include alendronate, pamidronate, risedronate, ibandronate, and zoledronate. Simple BPs or non-NBPs don't have nitrogen in their composition, include etidronate and clodronate, and were the first to be tested in animals and clinically used. Because BPs may be administered to pregnant women or children during deciduous and permanent teeth development, it is expected that they might disturb tooth eruption and development. It is presented a review of current knowledge on BPs' pharmacokinetics, bioavailability, mechanisms of action, clinical applications in children, and effects on tooth eruption and development.

Keywords: bisphosphonates, tooth, odontogenesis, dentin, dental enamel.

1. Introduction

ANEXO A

Bisphosphonates (BPs) avidly bind to calcium crystals and inhibit osteoclastic bone resorption (Fleisch, 2007), making them useful for treatment of skeletal disorders such as osteoporosis, Paget's disease, osteogenesis imperfecta (OI) and metastatic bone diseases (Baroncelli and Bertelloni, 2014; Russell, 2011; Cremers and Papapoulos, 2011; Fleisch, 1998; Massa et al., 2006). BPs therapeutically act by causing toxic effects on osteoclasts or interfering with specific intracellular pathways in those cells (Fleisch, 1998; van Beek et al., 1999; van Beek et al., 2002). These chemical compounds are analogues of pyrophosphate (PPi; P-O-P) in which the geminal oxygen has been substituted by carbon, originating the P-C-P bond, which is resistant to enzymatic hydrolysis (Rodan and Fleisch, 1996). They were first studied as inhibitors of calcification that would resist to hydrolysis by alkaline phosphatase.

BPs are effective inhibitors of bone resorption depending on the dosage (Russell, 2011; Cremers and Papapoulos, 2011). These drugs have a molecule formed by one central carbon atom (C) linked to two phosphate atoms (P) plus two side chains (R1 and R2). The presence of these side chains enables the synthesis of numerous compounds with different properties. The basic P-C-P structure allows a great number of variations, either by changing the two side chains R1 and R2 on the carbon atom, or by esterifying or altering the phosphate groups (Fleisch, 1998). In general, a hydroxyl substitution at R1 enhances the affinity of BPs for calcium crystals, while the presence of a nitrogen atom in R2 enhances their potency and determines their mechanism of action (Russell, 2011). BPs that possess nitrogen in their composition are called nitrogen-containing BPs (NBPs) and include alendronate, pamidronate, risedronate, ibandronate, and zoledronate. Simple BPs or non-NBPs don't have nitrogen in their composition, include etidronate and clodronate, and were the first to be tested in animals and clinically used.

Because BPs are used in many bone pathologies and may be administered to pregnant women or children during deciduous and permanent teeth development (Massa et al., 2006; McCarthy et al., 2002; Maasalu et al., 2003), it is expected that they might disturb odontogenesis and lead to defects in dental structures. Although BPs' mechanisms of action have been exhaustively studied in bone, little is known about their effects on tooth development, and just a few studies on the association between dental defects and the use of those chemical compounds are available (Simmelink, 1987; Wakamatsu, 1991; Weile et al., 1990; Weile et al., 1993; Yamada et al., 2000; Fuangtharnthip et al., 2000; do Espírito Santo AR et al., 2010; Nelson-Filho et al., 2012).

ANEXO A

This paper presents a review of current knowledge on BPs' pharmacokinetics, bioavailability, mechanisms of action, clinical applications in children and effects on tooth development.

2. Pharmacokinetics, bioavailability and mechanisms of action

BPs can be administered either orally or intravenously. They are poorly absorbed in humans (NBPs have an absorption of about 0.7%, whereas non-NBPs have a slightly higher gastrointestinal absorption of 2–2.5%) (Cremers and Papapoulos, 2011; Baroncelli and Bertelloni, 2014). Since they exhibit a poor bioavailability via the oral route, most BPs are usually administered via parenteral route (Baroncelli and Bertelloni, 2014). They are distributed widely throughout the body – primarily in bone, but also in soft tissues such as the liver, kidney and spleen (Cremers and Papapoulos, 2011; Baroncelli and Bertelloni, 2014). BPs bind preferentially to bones with high turnover rates thus their distribution in bones is not homogeneous (Baroncelli and Bertelloni, 2014).

The overall pharmacological effects of bisphosphonates on bone appear to depend upon two key properties: affinity for bone mineral and inhibitory effects on osteoclasts (Ebetino et al., 2011). BPs enter the extracellular space by paracellular transport and bind to free hydroxiapatite that is available on the surface of bone. Though the knowledge is still incomplete, there has been significant progress in understanding the binding properties of BPs (Cremers and Papapoulos, 2011). Studies indicate that BPs can be located in bone forming and resorbing surfaces (Masarachia et al., 1996). Different mineral affinities between BPs can influence their distribution, and lower affinity compounds have more penetrating factor to the osteocyte network (Roelofs et al., 2010).

Once adsorbed to bone mineral surfaces, BPs enter into close extracellular contact with osteoclasts, osteoblasts and osteocytes. The bone resorption process promoted by osteoclasts causes the disassociation of BPs from the bone surface followed by intracellular uptake into osteoclasts by fluid phase endocytosis (Coxon et al., 2008).

Inside osteoclasts, non-NBPs and NBPs present different mechanisms of action. The former can be incorporated into ATP in place of the β,γ pyrophosphate, producing AppCp-type (a non-hydrolysable ATP analogue). This incorporation occurs due to the similarity of the non-NBPs to PPI, which leads into the accommodation in the class II of aminoacyl-tRNA ligase active site in place of PPI. This allows a back-reaction involving the condensation of a non-NBP with AMP thus resulting in the AppCp-type, which

ANEXO A

interferes with ATP-dependent intracellular pathways leading to osteoclast apoptosis (Lehenkari et al., 2002; Rogers et al., 2011). NBPs are much more potent than non-NBPs in inhibiting bone resorption. They can block the formation of intermediates along the mevalonate biosynthesis pathway that leads to synthesis of cholesterol and other sterols. Specifically, it inhibits farnesyl pyrophosphate synthase (FPPS), a key branch-point enzyme in the mevalonate pathway that generates isoprenoid lipids utilized in sterol synthesis and for the post-translational modification of small GTP-binding proteins essential for osteoclast function (Ebetino et al., 2011; Baroncelli and Bertelloni, 2014; Luckman et al., 1998). Inhibition of FPPS generates the accumulation of isopentenyl pyrophosphate (IPP), the metabolite immediately upstream of FPPS in the mevalonate pathway. This accumulation causes a transient inflammatory acute phase response soon after intravenous administration of the drug and also leads to the production of Apppl (a non-hydrolysable ATP analogue), which inhibits the mitochondrial adenine nucleotide translocase (ANT) and can result in apoptosis (Mönkkönen et al., 2006). Isoprenoid lipids like farnesyl pyrophosphate (FPP) and geranylgeranyl diphosphate (GGPP), generated by the mevalonate pathway, are required for post-translational modification (prenylation) of proteins. As aforementioned, prenylation of small GTP-binding proteins is essential for osteoclast function. Inhibition of FPPS impairs the prenylation process thus causing alterations on important functions of osteoclasts, including cytoskeletal arrangement, membrane ruffling, trafficking of intracellular vesicles and apoptosis (Coxon and Rogers, 2003). In addition to intracellular uptake by osteoclasts, bone marrow monocytes have shown to internalize relatively large amounts of fluorescently labeled bisphosphonate in vivo, suggesting that monocytes also may be directly affected by BPs (Roelofs et al., 2010).

Recent works indicate that non-NBPs and especially NBPs prevent osteoblast and osteocyte apoptosis as part of their beneficial effects on bone (Bellido and Plotkin, 2011; Ebetino et al., 2011). This pro-survival effect is strictly dependent on the expression of connexin 43 (Bellido and Plotkin, 2011; Ebetino et al., 2011). These findings may be associated with a significant impact in the number and function of osteoblasts present at sites of bone formation, as well as in the number and function of osteocytes present at sites of bone maintenance. The anti-apoptotic effect of BPs is separate from the effect of the drugs on osteoclasts, and is dose dependent with lower constant dosage being more beneficial (Bellido and Plotkin, 2011). Preservation of the bone forming function of mature osteoblasts and maintenance of the osteocytic network, in combination with lack of anti-catabolic actions, open new therapeutic possibilities for bisphosphonates in the treatment of osteopenic conditions in which

ANEXO A

decreased bone resorption is not desired (Bellido and Plotkin, 2011; Ebetino et al., 2011).

Intravenous BPs disappear from plasma rapidly, showing a half-life of 1–2 h according to the renal clearance and bone uptake (Baroncelli and Bertelloni, 2014). Once taken up by the bone, BPs are desorbed from the hydroxyapatite during bone resorption and are taken up by osteoclasts, but they can also be taken up again by the skeleton or can be released in the circulation (Baroncelli and Bertelloni, 2014). Adsorbed BPs are released and reabsorbed constantly in resorption lacunae. They are usually eliminated very slowly and are detected in urine up to many years after treatment cessation (Cremers and Papapoulos, 2011). This may be a crucial issue in pediatric patients (Baroncelli and Bertelloni, 2014). Renal excretion is the main mechanism by which BPs are excreted and it is correlated with renal function, so that their dose should be corrected by creatinine clearance (Baroncelli and Bertelloni, 2014). They are excreted unchanged in urine and a very small percentage is excreted in the bile (Cremers and Papapoulos, 2011; Baroncelli and Bertelloni, 2014).

Almost all the published studies on the effects of BPs on dental structures have inspected bisodic etidronate and/or sodium alendronate. Bisodic etidronate and sodium alendronate have different chemical structures that are associated with different antiresorptive potencies (Russell, 2011). Bisodic etidronate is a non-NBP that presents two Na atoms substituting one H atom from each phosphate group and its R1 and R2 are respectively OH and CH₃. Sodium alendronate is a NBP that exhibits a Na atom substituting one H atom from a phosphate group and its R1 and R2 are respectively OH and (CH₂)₃NH₂. Although these two drugs avidly bind to hydroxyapatite crystals, the presence of a nitrogen atom in R2 of sodium alendronate makes this drug much more potent than bisodic etidronate in regards to antiresorptive action in bone (van Beek et al., 1999; van Beek et al., 2002; Russell, 2011). These drugs are both internalized by osteoclasts during bone resorption and perturb metabolism of those cells, inducing apoptosis (Russell, 2011). Etidronate, as a non-NBP, is metabolically incorporated into non-hydrolysable analogs of ATP that may inhibit ATP-dependent intracellular enzymes. Alendronate, which is a NBP and is 100 to 1,000 fold more potent than etidronate (Baroncelli and Bertelloni, 2014), is not metabolized this way but can inhibit prenylation of GTP-binding proteins that are especially responsible for cytoskeletal integrity and intracellular signaling of osteoclasts.

It is important to note that etidronate does not present expressive clinical relevance in dentistry (except for its association with osteonecrosis) because they are rarely prescribed for children and pregnant women. This is possibly the reason for few reports on human dental alterations as consequence of etidronate use (Iwai et al.,

ANEXO A

2013). Alendronate, pamidronate and zoledronate are certainly the most clinically important BPs in dentistry since they are widely prescribed for children under treatment of a variety of bone diseases, especially OI (Baroncelli and Bertelloni, 2014; August et al., 2011; Bachrach and Ward, 2009; Bajpai et al., 2007; Barros et al., 2012; Bishop et al., 2013; Castillo and Samson-Fang, 2009; Chilbule and Madhuri, 2012; Dwan et al., 2014; Glorieux et al., 1998; Hiraga et al., 2010; Kamoun-Goldrat et al., 2008; Kitaoka et al., 2011; Maasalu et al., 2003; Phillipi et al., 2008; Plotkin et al., 2000; Sukumar et al., 2013; Ward et al., 2011). Pamidronate also known as pamidronic acid or (3-amino-1-hydroxy-1-phosphonopropyl) phosphonic acid is a NBP with the molecular formula of $C_3H_{11}NO_7P_2$, and zoledronate also known as zoledronic acid or (1-hydroxy-2-imidazol-1-yl-1-phosphonoethyl) phosphonic acid is also a NBP with the molecular formula of $C_5H_{10}N_2O_7P_2$ (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Pamidronate and zoledronate, as NBPs, present mechanism of action on bone matrix and cells similar to that exhibited by alendronate. Pamidronate is 100 fold more potent than etidronate and zoledronate is over 10,000 fold more potent than etidronate (Baroncelli and Bertelloni, 2014).

3. Clinical applications in children

A limited body of published data suggests that maternal use of bisphosphonates before or during pregnancy does not have serious fetal or neonatal adverse effects (Green and Pappas, 2014). Moreover, clinical use of BPs in women is generally interrupted in pregnancy (Stathopoulos et al., 2011). To the best of our knowledge, there is no report on the dental defects caused by BPs that crossed the placenta in humans or animal models. For these reasons, here we focus only on clinical administration of BPs in children.

BPs have been used in children and been shown to be effective in: 1. improving the acquisition of bone mass and reducing fracture rate in some primary or secondary forms of osteoporosis; 2. treating severe hypercalcemia caused by excessive bone resorption or increased intestinal calcium absorption; 3. reducing existing calcifications and avoiding new ectopic ossifications in some disorders associated with heterotopic calcifications; and 4. reducing osteolytic lesions and bone pain in patients with fibrous dysplasia in bone, chronic recurrent multifocal osteomyelitis and osteonecrosis-related chemotherapy (Baroncelli and Bertelloni, 2014).

Primary forms of osteoporosis are due to an intrinsic alteration of bone structure and some of them are familial or genetically determined, like it occurs in the case of OI (Baroncelli and Bertelloni, 2014). This is the most common of inherited disorders with incidence estimated at 1-2 per 20.000 births that results in most cases from a genetic

ANEXO A

mutation in the synthesis of type I collagen causing deficiencies related to amount or quality of produced collagen, or even in the combination of both (Castillo et al., 2009). It represents a heterogeneous group of conditions characterized by low bone mass and fragility fractures. Severity of OI may vary from life threatening skeletal weakness to asymptomatic low bone mass (Bachrach and Ward, 2009). It was originally classified into four types based on clinical findings and mode of inheritance, however it has expanded, being classified into eight types now (I-VIII) (Van Dijk and Sillence, 2014). Intravenous pamidronate, neridronate or zoledronate are the treatment of choice for patients with moderate-to-severe OI, whereas, bisphosphonate treatment is discussed for patients with mild forms of OI (Baroncelli and Bertelloni, 2014; Escobar et al., 2013; Barros et al., 2012; Kitaoka et al., 2011; Bishop, 2010; Ward et al., 2011; Phillipi et al., 2008; Bajpai et al., 2007; Plotkin et al., 2000; Glorieux et al., 1998). Treatment of OI with BPs aims to improve the quality of life by increasing mineral bone density and decreasing number of fractures, it is not a curative treatment, and it is part of a coordinated multidisciplinary approach, which includes surgery, physiotherapy and occupational therapy (Kitaoka et al., 2011; Glorieux et al., 1998).

BPs are usually well tolerated and safe both orally and intravenously. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws (BRONJ) has been detailed extensively in adults but to date there have been no similar cases in children, suggesting that pediatric patients are likely to have a different BRONJ risk profile compared with adults (Baroncelli and Bertelloni, 2014; Christou et al., 2013).

4. Effects on tooth development

In most papers the average age of infants beginning treatment of OI with BPs is about 4 years old. However, there are reports of children starting treatment as early as two weeks old (Dwan et al., 2014). The formation of deciduous dentition begins before birth and that of permanent dentition is completed at approximately 15-16 years (EINesr and Avery, 2002). Tooth development and eruption occur as adjacent bone is resorpted by osteoclasts, and serum calcium and phosphate are attracted to form hydroxyapatite in dental developing structures (Wise and King, 2008). For those reasons, it is expected that BPs may affect tooth eruption and development.

Tooth development comprises highly regulated complex events characterized by cell-cell and cell-extracellular matrix (ECM) interactions (Thesleff et al., 1995). These interactions result in the differentiation of odontoblasts and ameloblasts, which form dentin and enamel, respectively (Thesleff et al., 1995; Nelson-Filho et al., 2012). Disturbances in teeth eruption, development and mineralization are among the

ANEXO A

reported side effects of some BPs (Grier and Wise, 1998; Kamoun-Goldrat et al., 2008; Iwai et al., 2013; Hiraga et al., 2010).

Tooth eruption requires normal osteoclastic bone resorption (Wise and King, 2008). Induction of osteoclasts apoptosis by NBP is probably the reason for the findings reported by Hiraga et al. (2010) on the impairment of tooth eruption in zoledronate-treated rats. Bradaschia-Correa et al. (2007) exhibited effective inhibition of molar root formation and eruption in alendronate-treated young growing rats showing compromised activation of osteoclasts, which remained in a latent stage. Six years later, the same group of researchers published experimental findings indicating that reduced expression of receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) inhibits osteoclast activation and tooth eruption in alendronate-treated rats (Bradaschia-Correa et al., 2013). The study by Hiraga et al. (2010) also indicated relationship between zoledronate administration and induction of several types of dental abnormalities in rats, including defects of the enamel.

Careful analysis of the literature reveals that almost all the studies associating BPs with dental defects address etidronate and/or alendronate.

Some authors have reported effects of etidronate (a non-NBP) or alendronate (a NBP) on collagen fibrillogenesis, matrix synthesis, and mineralization of dentin. Beertsen et al. (1985) observed that etidronate had inhibited deposition of mineral crystallites in newly formed dentin matrix. Larsson (1974) showed expressive morphological alterations of odontoblasts and their extracellular matrix, and complete inhibition of crystal formation in dentin from etidronate-treated rats. Etidronate has also been shown to produce hypomineralized incremental bands in dentine of rat incisor in a dose-dependent manner, characterized by reduced number of collagen fibrils (Ogawa et al., 1989). Investigations on dentin mineralization process have used etidronate properties and revealed that injections of the drug in rats (8 mg/Kg/day) induced a series of alternating rows of mineralized and non-mineralized dentin islands in the newly formed portion of the crown and root analogues of incisors (Sakai et al., 1999; Takano et al., 1998). A recent study (Nelson-Filho et al., 2012) analyzed dentin of maxillary incisors from chemically pure sodium alendronate-treated rats (2 weekly doses of 1 mg/kg) using fluorescence spectroscopy, scanning electron microscopy, bright field microscopy, and cross-sectional microhardness testing. The authors concluded that while alendronate was incorporated into dentin it did not cause significant alterations in the morphology and microhardness of that mineralized tissue in rat incisor. Interestingly, Basso et al. (2013) showed that zoledronate, the highly potent NBP prescribed for children, presents dose-dependent cytotoxic effect on

ANEXO A

cultured odontoblast-like cells MDPC-23, suggesting that under clinical conditions this drug can cause damage to the pulpo-dentin complex.

Some investigators have also reported the effects of etidronate or alendronate on the enamel formation. Simmelink (1987) described that successive injections of etidronate in rats had induced hypomineralized lines in the enamel. Structural alterations of rat incisor enamel (including hypomineralized incremental band) were shown to be induced by single injections of etidronate at doses from 0.5 to 10 mg/kg of body weight (Weile et al., 1990; Weile et al., 1993). Wakamatsu (1991) proceeded analysis using light and electronic microcopies of ameloblasts and their forming enamel in maxillary incisors from rats that had been submitted to daily injection of etidronate (4 or 8 mg/Kg) for seven days and noted completely disordered enamel formation. Islets of enamel that appeared along the incisor surface were found and enamel-free zones were observed between those islets. Inner enamel showed morphological altered rods and hypomineralized bands running parallel to enamel surface. Densely stained globules with toluidine and vacuoles were noted in the ameloblastic layer facing the aforementioned islets of enamel. Those findings were attributed not only to physico-chemical inhibition of the growth hydroxyapatite crystals but also to the inhibitory effect of the drug on the functions of ameloblasts during the enamel matrix formation.

Ten years later, Fuangtharnthip et al. (2000) confirmed the results that had been reported by Wakamatsu (1991) and additionally investigated using autoradiography the synthetic and secretory activity of ameloblasts facing islets of enamel and enamel-free zones (in this case laying directly on the abnormally non-mineralized mantle dentine) tracing the fate of the radioactively labelled proteins. Since drug-treated and control rats presented similar results for all ameloblasts, those authors concluded that etidronate did not affect the ameloblast activity in protein synthesis and that the complete failure of enamel-layer formation in some specific regions was probably due to the failure in protein secretion and deposition. Furthermore, that study provided additional evidence that the mineralization of dentine was an essential factor in successful enamel matrix secretion and deposition. Yamada et al. (2000) also analyzed maxillary incisors from rats that had been injected with etidronate for 7 days using an in situ hybridization technique and immunohistochemical staining to detect the gene expression and localization of amelogenin protein, respectively. The results of their investigation confirmed that the enamel hypoplasia might not be due to a disturbance in amelogenin synthesis but to a disturbance in its secretion. Etidronate has also been reported to affect ameloblast morphology (Fejerskov et al., 1990; Josephsen et al., 1990) and to induce enamel hypoplasia associated with the formation of subameloblastic cysts (Fejerskov et al., 1990; Fouda et al., 1989; Fouda et al., 1991).

ANEXO A

Previous publications indicate that disturbance in the mineralization process induced by BPs is believed to be due to physicochemical effects of the drug on crystal formation and aggregation (Fleisch, 2007; Fleisch, 1998). The study by Nelson-Filho et al. (2012) included analysis of mature enamel of maxillary incisors from chemically pure sodium alendronate-treated rats using fluorescence spectroscopy, scanning electron microscopy, bright field microscopy, and cross-sectional microhardness testing. The authors concluded that while alendronate was incorporated into enamel it did not cause significant alterations in the morphology and microhardness of that mineralized tissue in rat incisor. However, they also pertinently highlighted that further studies are needed to investigate what effects can appear after alendronate incorporation to the dental tissues, for example, whether it may alter their resistance to acid demineralization, making the tooth more or less susceptible to caries disease or erosive processes.

We have recently analyzed secretory and mature enamels of maxillary incisors from rats treated with etidronate (8 mg/Kg/day) or alendronate (30 µg/Kg/day) for 42 days (do Espírito Santo AR et al., 2010). Etidronate-treated rats exhibited extensive morphological changes in the secretory-stage enamel organic extracellular matrix (EOECM), inclusive nonbirefringent conspicuous incremental lines. Alendronate-treated rats did not show morphological alterations in the secretory-stage EOECM, which presented significant decrease in birefringence. Alendronate and etidronate groups exhibited statistically significant reductions of approximately 6-10% in mature enamel cross-sectional microhardness. Scanning electron microscopy showed extensive alterations in mature enamel only from etidronate group with absence of enamel rods. Our findings suggested that alterations in the birefringence of secretory-stage EOECM are a plausible mechanism by which environmental factors may cause enamel defects. Reduction in birefringence of the EOECM from alendronate-treated rats may be explained by changes in the aggregational properties of that matrix as revealed by the presence of large patches of granular material formed by amelogenin molecules in the EOECM from alendronate-treated newborn rats in the study by Massa et al. (2006).

5. Concluding remarks

The most widely used BPs in pediatric patients are alendronate, pamidronate and zoledronate. There is an important debate in the literature about the possible effects of BPs on tooth development and eruption. Based on the reported data that are relevant for dentistry, clinical use of etidronate should be systematically discarded whereas

ANEXO A

alendronate use in infants seems to be safe. On the other hand, the effects of pamidronate and zoledronate on dental eruption and formation remain unclear and should be exhaustively studied.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

This review is part of the Master's dissertation of the first author (Ana Prates Soares), who received a scholarship from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia – FAPESB (BOL0656/2014), and comprises part of a study supported by grants from FAPESB (PPP0065/2010).

References

- August, K.J., Dalton, A., Katzenstein, H.M., George, B., Olson, T.A., Wasilewski-Masker, K., Rapkin, L.B., 2011. The use of zoledronic acid in pediatric cancer patients. *Pediatr Blood Cancer*. 56, 610-614.
- Bachrach, L.K., Ward, L.M., 2009. Clinical review 1: Bisphosphonate use in childhood osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 94, 400-409.

ANEXO A

- Bajpai, A., Kabra, M., Gupta, N., Sharda, S., Ghosh, M., 2007. Intravenous pamidronate therapy in osteogenesis imperfecta: response to treatment and factors influencing outcome. *J Pediatr Orthop.* 27, 225-227.
- Baroncelli, G.I., Bertelloni, S., 2014. The use of bisphosphonates in pediatrics. *Horm Res Paediatr.* 82, 290-302.
- Barros, E.R., Saraiva, G.L., de Oliveira, T.P., Lazaretti-Castro, M., 2012. Safety and efficacy of a 1-year treatment with zoledronic acid compared with pamidronate in children with osteogenesis imperfecta. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 25, 485-491.
- Basso, F.G., Turrioni, A.P., Hebling, J., de Souza Costa, C.A., 2013. Effects of zoledronic acid on odontoblast-like cells. *Arch Oral Biol.* 58, 467-473.
- Beertsen, W., Niehof, A., Everts, V., 1985. Effects of 1-hydroxyethylidene-1,1-bisphosphonate (HEBP) on the formation of dentin and the periodontal attachment apparatus in the mouse. *Am J Anat.* 174, 83-103.
- Bellido, T., Plotkin, L.I., 2011. Novel actions of bisphosphonates in bone: preservation of osteoblast and osteocyte viability. *Bone.* 49, 50-55.
- Bishop, N., 2010. Characterising and treating osteogenesis imperfecta. *Early Hum Dev.* 86, 743-746.
- Bishop, N., Adami, S., Ahmed, S.F., Antón, J., Arundel, P., Burren, C.P., Devogelaer, J.P., Hangartner, T., Hosszú, E., Lane, J.M., Lorenc, R., Mäkitie, O., Munns, C.F., Paredes, A., Pavlov, H., Plotkin, H., Raggio, C.L., Reyes, M.L., Schoenau, E., Semler, O., Sillence, D.O., Steiner, R.D., 2013. Risedronate in children with osteogenesis imperfecta: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* 382, 1424-1432.
- Bradaschia-Correa, V., Massa, L.F., Arana-Chavez, V.E., 2007. Effects of alendronate on tooth eruption and molar root formation in young growing rats. *Cell Tissue Res.* 330, 475-485.
- Bradaschia-Correa, V., Moreira, M.M., Arana-Chavez, V.E., 2013. Reduced RANKL expression impedes osteoclast activation and tooth eruption in alendronate-treated rats. *Cell Tissue Res.* 353, 79-86.
- Castillo, H., Samson-Fang, L., American Academy for Cerebral Palsy and Developmental Medicine Treatment Outcomes Committee Review Panel., 2009. Effects of bisphosphonates in children with osteogenesis imperfecta: an AACPDM systematic review. *Dev Med Child Neurol.* 51, 17-29.
- Chilbule, S.K., Madhuri, V., 2012. Complications of pamidronate therapy in paediatric osteoporosis. *J Child Orthop.* 6, 37-43.

ANEXO A

- Christou, J., Johnson, A.R., Hodgson, T.A., 2013. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws and its relevance to children--a review. *Int J Paediatr Dent.* 23, 330-337.
- Coxon, F.P., Rogers, M.J., 2003. The role of prenylated small GTP-binding proteins in the regulation of osteoclast function. *Calcif Tissue Int.* 72, 80-84.
- Coxon, F.P., Thompson, K., Roelofs, A.J., Ebetino, F.H., Rogers, M.J., 2008. Visualizing mineral binding and uptake of bisphosphonate by osteoclasts and non-resorbing cells. *Bone.* 42, 848-860.
- Cremers, S., Papapoulos, S., 2011. Pharmacology of bisphosphonates. *Bone.* 49, 42-49.
- do Espírito Santo, A.R., Frozoni, M.R., Ramos-Perez, F.M., Novaes, P.D., Line, S.R., 2010. Birefringence of the secretory-stage enamel organic extracellular matrix from rats submitted to successive injections of bisphosphonates. *Connect Tissue Res.* 51, 208-215.
- Dwan, K., Phillipi, C.A., Steiner, R.D., Basel, D., 2014. Bisphosphonate therapy for osteogenesis imperfecta. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, Issue 7. Art. No.: CD005088. doi: 10.1002/14651858.CD005088.pub3.
- Ebetino, F.H., Hogan, A.M., Sun, S., Tsoumpra, M.K., Duan, X., Triffitt, J.T., Kwaasi, A.A., Dunford, J.E., Barnett, B.L., Oppermann, U., Lundy, M.W., Boyde, A., Kashemirov, B.A., McKenna, C.E., Russell, R.G., 2011. The relationship between the chemistry and biological activity of the bisphosphonates. *Bone.* 49, 20-33.
- EINesr, N.M., Avery, J.K., 2002. Tooth eruption and shedding, in: Avery, J.K. (Ed.), *Oral development and histology*. Thieme, New York, pp. 123-140.
- Escobar, C., Malveiro, D., Salgado, A., Santos, M.I., Lameirão Campagnolo, J., Cassiano Neves, M., 2013. Osteogenesis imperfecta--experience of Dona Estefânia's Hospital orthopedics' department. *Acta Med Port.* 26, 5-11.
- Fejerskov, O., Josephsen, K., Weile, V., 1990. The effect of a single dose of 1-hydroxyethylidene-1, 1-bisphosphonate (HEBP) on secretory ameloblasts and enamel formation in rat incisors. *J Biol Buccale.* 18, 339-354.
- Fleisch, H., 1998. Bisphosphonates: mechanisms of action. *Endocrine Rev.* 19, 80-100.
- Fleisch, H., 2007. Bisphosphonates – History and experimental basis. *Bone.* 8(Suppl 1), S23-S28.
- Fouda, N., Caracatsanis, M., Hammarstrom, L., 1989. Developmental disturbances of the rat molar induced by two diphosphonates. *Adv Dent Res.* 3, 234-240.

ANEXO A

- Fouda, N., Caracatsanis, M., Kut, I.A., Hammarstrom, L., 1991. Mineralization disturbances of the developing rat molar induced by mono- and bisphosphonates. *J Biol Buccale*. 19, 106-115.
- Fuangtharnthip, P., Yamada, Y., Takagi, Y., Ohya, K., 2000. Autoradiographic investigation of the effect of 1-hydroxyethylidene, 1-bisphosphonate on matrix protein synthesis and secretion by secretory ameloblasts in rat incisors. *Arch Oral Biol*. 45, 495-506.
- Glorieux, F.H., Bishop, N.J., Plotkin, H., Chabot, G., Lanoue, G., Travers, R., 1998. Cyclic administration of pamidronate in children with severe osteogenesis imperfecta. *N Engl J Med*. 339, 947-952.
- Green, S.B., Pappas, A.L., 2014. Effects of maternal bisphosphonate use on fetal and neonatal outcomes. *Am J Health Syst Pharm*. 71, 2029-2036.
- Grier, R.L. 4th, Wise, G.E., 1998. Inhibition of tooth eruption in the rat by a bisphosphonate. *J Dent Res*. 77, 8-15.
- Hiraga, T., Ninomiya, T., Hosoya, A., Nakamura, H., 2010. Administration of the bisphosphonate zoledronic acid during tooth development inhibits tooth eruption and formation and induces dental abnormalities in rats. *Calcif Tissue Int*. 86, 502-510.
- Iwai, T., Isomatsu, Y., Iwamoto, M., Tohnai, I., 2013. Bisphosphonate-related enamel hypoplasia in a child with idiopathic arterial calcification of infancy. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 51, e186-e187.
- Josephsen, K., Fejerskov, O., Baelum, V., Weile, V., 1990. The effect of a single dose of 1-hydroxyethylidene-1,1-bisphosphonate (HEBP) on presecretory ameloblast differentiation in rat incisors. *J Biol Buccale*. 18, 321-337.
- Kamoun-Goldrat, A., Ginisty, D., Le Merrer, M., 2008. Effects of bisphosphonates on tooth eruption in children with osteogenesis imperfecta. *Eur J Oral Sci*. 116, 195-198.
- Kitaoka, T., Namba, N., Miura, K., Kubota, T., Ohata, Y., Fujiwara, M., Hirai, H., Yamamoto, T., Ozono, K., 2011. Decrease in serum FGF23 levels after intravenous infusion of pamidronate in patients with osteogenesis imperfecta. *J Bone Miner Metab*. 29, 598-605.
- Larsson, A., 1974. The short-term effects of high doses of ethylene-1-hydroxy-1,1-diphosphonates upon early dentin formation. *Calcif Tissue Res*. 16, 109-127.
- Lehenkari, P.P., Kellinsalmi, M., Napankangas, J.P., Ylitalo, K.V., Monkkonen, J., Rogers, M.J., Azhayevev, A., Vaananen, H.K., Hassinen, I.E., 2002. Further insight into mechanism of action of clodronate: inhibition of mitochondrial ADP/ATP translocase by a nonhydrolyzable, adenine-containing metabolite. *Mol Pharmacol*. 61, 1255-1262.

ANEXO A

- Luckman, S.P., Hughes, D.E., Coxon, F.P., Graham, R., Russell, G., Rogers, M.J., 1998. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras. *J Bone Miner Res.* 13, 581-589.
- Maasalu, K., Haviko, T., Martson, A., 2003. Treatment of children with osteogenesis imperfecta in Estonia. *Acta Paediatr.* 92, 452-455.
- Masarachia, P., Weinreb, M., Balena, R., Rodan, G.A., 1996. Comparison of the distribution of ³H-alendronate and ³H-etidronate in rat and mouse bones. *Bone.* 19, 281-290.
- Massa, L.F., Bradaschia-Correa, V., Arana-Chavez, V.E., 2006. Immunocytochemical study of amelogenin deposition during the early odontogenesis of molars in alendronate-treated newborn rats. *J Histochem Cytochem.* 54, 713-725.
- McCarthy, E.A., Raggio, C.L., Hossack, M.D., Miller, E.A., Jain, S., Boskey, A.L., Camacho, N.P., 2002. Alendronate treatment for infants with osteogenesis imperfecta: demonstration of efficacy in a mouse model. *Pediatr Res.* 52, 660-670.
- Mönkkönen, H., Auriola, S., Lehenkari, P., Kellinsalmi, M., Hassinen, I.E., Vepsäläinen, J., Mönkkönen J., 2006. A new endogenous ATP analog (Apppl) inhibits the mitochondrial adenine nucleotide translocase (ANT) and is responsible for the apoptosis induced by nitrogen-containing bisphosphonates. *Br J Pharmacol.* 147, 437-445.
- Nelson-Filho, P., Lucisano, M.P., Da Silva, R.A., Da Silva, R.S., Serra, M.C., Gerlach, R.F., Neto, F.C., Carneiro, Z.A., Zamarioli, A., Morse, L., Battaglino, R., 2012. Systemically alendronate was incorporated into dental tissues but did not cause morphological or mechanical changes in rats teeth. *Microsc Res Tech.* 75, 1265-1271.
- Ogawa, Y., Adachi, Y., Hong, S., Yagi, T., 1989. 1-hydroxyethylidene-1,1-bisphosphonate (HEBP) simultaneously induces two distinct types of hypomineralization in the rat incisor dentine. *Calcif Tissue Int.* 44, 46-60.
- Phillipi, C.A., Remington, T., Steiner, R.D., 2008. Bisphosphonate therapy for osteogenesis imperfecta. *Cochrane Database Syst Rev.* (4):CD005088. doi: 10.1002/14651858.CD005088.pub2.
- Plotkin, H., Rauch, F., Bishop, N.J., Montpetit, K., Ruck-Gibis, J., Travers, R., Glorieux, F.H., 2000. Pamidronate treatment of severe osteogenesis imperfecta in children under 3 years of age. *J Clin Endocrinol Metab.* 85, 1846-1850.
- Rodan, G.A., Fleisch, H.A., 1996. Bisphosphonates: mechanisms of action. *J Clin Invest.* 97, 2692-2696.

ANEXO A

- Roelofs, A.J., Coxon, F.P., Ebetino, F.H., Lundy, M.W., Henneman, Z.J., Nancollas, G.H., Sun, S., Blazewska, K.M., Bala, J.L., Kashemirov, B.A., Khalid, A.B., McKenna, C.E., Rogers, M.J., 2010. Fluorescent risedronate analogues reveal bisphosphonate uptake by bone marrow monocytes and localization around osteocytes in vivo. *J Bone Miner Res.* 25, 606-616.
- Rogers, M.J., Crockett, J.C., Coxon, F.P., Mönkkönen, J., 2011. Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Bone.* 49, 34-41.
- Russell, R.G., 2011. Bisphosphonates: the first 40 years. *Bone.* 49, 2-19.
- Sakai, H., Takano, Y., Ohya, K., Kurosaki, N., 1999. Intermittent inhibition of dentin mineralization of rat incisors under continual infusion of 1-hydroxyethylidene-1,1-bisphosphonate (HEBP) using subcutaneous mini osmotic pump. *Arch Histol Cytol.* 62, 171-179.
- Simmelink, J.W., 1987. Ultrastructural effects of diphosphonates on dental enamel. *Adv Dent Res.* 1, 356-365.
- Stathopoulos, I.P., Liakou, C.G., Katsalira, A., Trovas, G., Lyritis, G.G., Papaioannou, N.A., Tournis, S., 2011. The use of bisphosphonates in women prior to or during pregnancy and lactation. *Hormones (Athens).* 10, 280-291.
- Sukumar, S.P., Balachandran, K., Sahoo, J.P., Kamalanathan, S., 2013. Zebra lines in osteogenesis imperfecta on bisphosphonate therapy. *BMJ Case Rep.* pii: bcr2012008536. doi: 10.1136/bcr-2012-008536.
- Takano, Y., Sakai, H., Baba, O., Sakamoto, Y., Terashima, T., Ohya, K., Kurosaki, N., 1998. Demonstration of putative Ca-binding domains in dentin matrix of rat incisors after daily injections of 1-hydroxyethylidene-1,1-bisphosphonate (HEBP). *Eur J Oral Sci.* 106(Suppl1), 274-281.
- Thesleff, I., Vaahtokari, A., Kettunen, P., Aberg, T., 1995. Epithelial-mesenchymal signaling during tooth development. *Connect Tissue Res.* 32, 9-15.
- van Beek, E.R., Lowik, C., Papapoulos, S., 2002. Bisphosphonates suppress bone resorption by a direct effect on early osteoclast precursors without affecting the osteoclastogenic capacity of osteogenic cells: the role of protein geranylgeranylation in the action of nitrogen-containing bisphosphonates on osteoclast precursors. *Bone.* 30, 64-70.
- van Beek, E.R., Pieterman, E., Cohen, L., Lowik, C., Papapoulos, S., 1999. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit isopentenyl pyrophosphate isomerase/farnesyl pyrophosphate synthase activity with relative potencies corresponding to their antiresorptive potencies in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 263, 754-758.

ANEXO A

- Van Dijk, F.S., Silience, D.O., 2014. Osteogenesis imperfecta: clinical diagnosis, nomenclature and severity assessment. *Am J Med Genet A*. 164A, 1470-1481. Erratum in *Am J Med Genet A*. 2015. 167A(5), 1178.
- Wakamatsu, H., 1991. A study of the effects of successive injections of 1-hydroxyethylidene-1, 1-bisphosphonate (HEBP) on the enamel formation of rat incisor. *Jpn J Oral Biol*. 33, 82-96.
- Ward, L.M., Rauch, F., Whyte, M.P., D'Astous, J., Gates, P.E., Grogan, D., Lester, E.L., McCall, R.E., Pressly, T.A., Sanders, J.O., Smith, P.A., Steiner, R.D., Sullivan, E., Tyerman, G., Smith-Wright, D.L., Verbruggen, N., Heyden, N., Lombardi, A., Glorieux, F.H., 2011. Alendronate for the treatment of pediatric osteogenesis imperfecta: a randomized placebo-controlled study. *J Clin Endocrinol Metab*. 96, 355-364.
- Weile, V., Josephsen, K., Fejerskov, O., 1990. Effects of single doses of 1-hydroxyethylidene-1,1-bisphosphonate on the mineralizing front of rat incisor enamel: a microradiographic and scanning electron microscopic study. *Arch Oral Biol*. 35, 857-867.
- Weile, V., Josephsen, K., Fejerskov, O., 1993. Scanning electron microscopy of final enamel formation in rat mandibular incisors following single injections of 1-hydroxyethylidene-1,1-bisphosphonate. *Calcif Tissue Int*. 52, 318-324.
- Wise, G.E., King, G.J., 2008. Mechanisms of tooth eruption and orthodontic tooth movement. *J Dent Res*. 87, 414-434.
- Yamada, Y., Fuangtharnthip, P., Tamura, Y., Takagi, Y., Ohya, K., 2000. Gene expression and immunolocalization of amelogenin in enamel hypoplasia induced by successive injections of bisphosphonate in rat incisors. *Arch Oral Biol*. 45, 207-215.
- <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

ANEXO B



Universidade Federal da Bahia
Instituto de Ciências da Saúde (ICS)
Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-ICS)



CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo número **007/2010**, intitulado “**Efeitos do diabetes mellitus tipo 1 e do pamidronato dissódico sobre a formação do esmalte dentário**”, sob a responsabilidade do Professor **Alexandre Ribeiro do Espírito Santo**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), tendo sido **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências da Saúde (CEUA-ICS) em **12 de agosto de 2010**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol number **007/2010**, entitled “**Effects of type 1 diabetes mellitus and disodium pamidronate on dental enamel formation**”, is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian Society of Laboratory Animal Science (SBCAL). This project was **APPROVED** by the Ethics Committee on Animal Use from the Institute of Health Sciences (CEUA-ICS, Federal University of Bahia - UFBA) on **August 12, 2010**.

Salvador, 12 de agosto de 2010

Profª Dra. Songeli Menezes Freire
Presidente da CEUA-ICS

CEUA-ICS
Av. Reitor Miguel Calmon, s/n
Vale do Canela – Salvador-BA
CEP: 40.110-902

Telefone: (71) 3283-8958
Telefax: (71) 3245-0917
E-mail: ceuaics@ufba.br

<http://www.moodle.ufba.br/course/view.php?id=10332>

ANEXO C

Effects of pamidronate disodium on dental enamel formation

Ana Prates Soares¹, Renan Fernandes do Espírito Santo², Sérgio Roberto Peres Line³, Maria das Graças Farias Pinto⁴, Pablo de Moura Santos⁵, Maria Betânia Pereira Toralles⁶, Alexandre Ribeiro do Espírito Santo⁷

¹ Multidisciplinary Institute of Health, Federal University of Bahia – UFBA

² Faculty of Pharmacy, Federal University of Bahia – UFBA

³ Piracicaba Dental School, University of Campinas – UNICAMP

⁴ Department of Veterinarian Anatomy, Pathology and Clinics, School of Veterinary Medicine and Zootechny, Federal University of Bahia – UFBA

⁵ Professor Edgard Santos University Hospital, Federal University of Bahia – UFBA

⁶ Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia – UFBA

⁷ Department of Biomorphology, Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia – UFBA

Running Title: Enamel formation in pamidronate-treated rats

Keywords: Bisphosphonates; Amelogenesis; Enamel Organic Extracellular Matrix

Correspondence to:

Alexandre Ribeiro do Espírito Santo

Departamento de Biomorfologia – ICS/UFBA

Avenida Reitor Miguel Calmon, S/N, Vale do Canela

CEP: 40.110-902

Salvador-BA, Brasil

Phone: +55-71-3283-8939

E-mail: arespiritosanto@ufba.br

Soares et al., 2015

Submitted to Microscopy Research and Technique – Wiley

ANEXO C

ABSTRACT

The aim of the present work was to investigate birefringence and morphology of the secretory stage enamel organic extracellular matrix (EOECM), and structural and mechanical properties of mature enamel of upper incisors from adult rats that had been treated with pamidronate disodium (0.5 mg/kg/wk for 56 days), using transmitted polarizing and bright field light microscopies (TPLM and BFLM), energy-dispersive x-ray (EDX) analysis, scanning electron microscopy (SEM) and microhardness testing (MHT). BFLM showed no morphological changes of the EOECM in pamidronate and control groups, but TPLM revealed a statistically significant reduction in optical retardation values of birefringence brightness of pamidronate-treated rats when compared to control animals ($p < 0.01$). EDX analysis showed that pamidronate induced statistically significant little decrease in phosphorus' quantity in outer mature enamel ($p < 0.01$) and slight increase of calcium/phosphorus ratio in that structure ($p < 0.05$). Pamidronate did not induce ultra-structural alterations in outer and inner enamels as revealed by SEM and did not cause a reduction in microhardness of cross-sectioned mature enamel ($p > 0.05$). The present study indicates that pamidronate can affect birefringence of the secretory stage EOECM, which does not seem to be associated with significant changes in morphological and/or mechanical properties of mature enamel. These findings suggest that clinical use of that drug in children could be safe in regards to dental concerns.

INTRODUCTION

Bisphosphonates (BPs) are chemical compounds analogues of pyrophosphate (PPi; P-O-P) in which the geminal oxygen has been substituted by carbon, originating the P-C-P bond, which is resistant to enzymatic hydrolysis (Rodan and Fleisch, 1996). Two side chains (R1 and R2) are also linked to central carbon atom of them (Fleisch, 1998). BPs avidly bind to calcium crystals and inhibit osteoclastic bone resorption (Fleisch, 2007) by causing toxic effects on osteoclasts or interfering with specific intracellular pathways in those cells (Fleisch, 1998; van Beek et al., 1999; van Beek et al., 2002). For this reason, they are widely used for treatment of skeletal disorders such as osteoporosis, Paget's disease, osteogenesis imperfecta (OI) and metastatic bone diseases (Baroncelli and Bertelloni, 2014; Russell, 2011; Cremers and Papapoulos, 2011; Fleisch, 1998; Massa, Bradaschia-Correa and Arana-Chavez, 2006). The basic P-C-P structure allows a great number of variations, either by changing the two side chains R1 and R2 on the carbon atom, or by esterifying or altering the phosphate groups (Fleisch, 1998). In general, a hydroxyl substitution at R1 enhances the affinity of BPs for calcium crystals, while the presence of a nitrogen atom in R2 enhances their potency and determines their mechanism of action (Russell, 2011). BPs that possess nitrogen in their composition are called nitrogen-containing BPs (NBPs) and include alendronate, pamidronate, risedronate, ibandronate, and zoledronate (Russell, 2011). Simple BPs or non-NBPs don't have nitrogen in their composition, include etidronate and clodronate, and were the first to be tested in animals and clinically used (Russell, 2011).

Almost all the reports on the effects of BPs on dental structures have addressed bisodic etidronate and/or sodium alendronate. These drugs are both internalized by osteoclasts during bone resorption and perturb metabolism of those cells, inducing apoptosis (Russell, 2011). Etidronate, as a non-NBP, is metabolically incorporated into non-hydrolysable analogs of ATP that may inhibit ATP-dependent intracellular enzymes. Alendronate, which is a NBP and is 100 to 1,000 fold more potent than etidronate (Baroncelli and Bertelloni, 2014), is not metabolized this way but can inhibit prenylation of GTP-binding proteins that are especially responsible for cytoskeletal integrity and intracellular signaling of osteoclasts. It is important to note that etidronate does not present expressive clinical relevance in dentistry (except for its association with osteonecrosis) because they are rarely prescribed for children and pregnant women during development of deciduous and permanent teeth. This is possibly the reason for few reports on human dental alterations as consequence of etidronate use

ANEXO C

(Iwai et al., 2013). Alendronate, pamidronate and zoledronate are certainly the most clinically important BPs in dentistry since they are widely prescribed for children under treatment of a variety of bone diseases, especially OI (Baroncelli and Bertelloni, 2014; August et al., 2011; Bachrach and Ward, 2009; Bajpai et al., 2007; Barros et al., 2012; Bishop et al., 2013; Castillo and Samson-Fang, 2009; Chilbule and Madhuri, 2012; Dwan et al., 2014; Glorieux et al., 1998; Hiraga et al., 2010; Kamoun-Goldrat, Ginisty and Le Merrer, 2008; Kitaoka et al., 2011; Maasalu, Haviko and Martson, 2003; Phillipi, Remington and Steiner, 2008; Plotkin et al., 2000; Sukumar et al., 2013; Ward et al., 2011). Pamidronate and zoledronate are NBPs with mechanism of action on bone matrix and cells similar to that exhibited by alendronate. Pamidronate is 100 fold more potent than etidronate and zoledronate is over 10,000 fold more potent than etidronate (Baroncelli and Bertelloni, 2014).

Tooth development comprises highly regulated complex events characterized by cell-cell and cell-extracellular matrix (ECM) interactions (Thesleff et al., 1995). These interactions result in the differentiation of odontoblasts and ameloblasts, which produce dentin and enamel, respectively (Thesleff et al., 1995; Nelson-Filho et al., 2012). Enamel is formed extracellularly by secretion, processing and self-assembly of a complex mixture of proteins that controls growth and morphology of the largest known biologically formed fluoride containing carbonated apatite crystals. After complete growth of these crystals in length, enamel mineralization develops further with the thickening of them to give rise to the hardest mineralized structure in the vertebrate body (Bartlett, 2013). In the case of rat incisor, these events take place in a time- and space-restricted fashion, as distinct zones of secreting, maturing and mature enamel are noted depending on the developmental stage of the tooth (Smith and Nanci, 1989). Enamel covers the crown of the teeth (Bartlett, 2013) and there is current evidence that altered enamel development is linked with increased susceptibility to dental caries (Modesto et al., 2013). Hence, it is important to investigate the effects of genetic and environmental factors, as systemically administration of BPs, on the formation of that structure. Some reports have shown possible adverse effects of these drugs on enamel development and all of them have inspected etidronate and/or alendronate (Nelson-Filho et al., 2012; do Espírito Santo et al., 2010; Fejerskov, Josephsen and Weile, 1990; Fouda, Caracatsanis and Hammarstrom, 1989; Fouda, Caracatsanis and Kut, 1991; Fuangtharnthip et al., 2000; Josephsen et al., 1990; Simmelink, 1987; Wakamatsu, 1991; Weile, Josephsen and Fejerskov, 1990, 1993; Yamada et al., 2000).

ANEXO C

To test the hypothesis that pamidronate disodium may disturb enamel formation, in the study reported here, we investigated birefringence and morphology of the secretory stage enamel organic ECM (EOECM), and structural and mechanical properties of mature enamel of upper incisors from adult rats that had been treated with that drug, using transmitted polarizing and bright field light microscopies, energy-dispersive x-ray analysis, scanning electron microscopy and microhardness testing.

MATERIALS AND METHODS

Animals, Treatments, and Tissue Preparation

Ethical approval for the present study was granted by Ethical Committees for Animal Research of University of Campinas – UNICAMP (Protocol 2061-1) and Institute of Health Sciences – Federal University of Bahia – UFBA (Protocol 007/2010), Brazil. The animals were housed in cages with natural lightening and mean temperature of $24 \pm 0.5^\circ\text{C}$, and were fed standard rat chow and water *ad libitum*.

Thirty-one male Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*) weighing ≈ 200 g were randomly assigned to four groups. Animals from control 21 (c21, $n = 5$) and pamidronate 21 (p21, $n = 8$) groups were sacrificed 21 days after the beginning of the experiment. Rats from control 56 (c56, $n = 9$) and pamidronate 56 (p56, $n = 9$) were killed 56 days after baseline of the treatment. Animal of p21 and p56 groups received intraperitoneal injections of pamidronate disodium (Eurofarma Laboratórios Ltda., Itapevi-SP, Brazil) dissolved of phosphate-buffered saline (PBS) solution at a dose of 0.5 mg/kg/wk. Animals from c21 and c56 groups received intraperitoneal injections of PBS solution weekly in equivalent volumes of those administered to pamidronate groups.

Twenty-four hours after the last injection, animals were effectively anesthetized with ketamine-xylazine and perfused with 2% paraformaldehyde, 0.5% glutaraldehyde in 0.2 M phosphate-buffered saline (PBS) solution, pH 7.2. Hemimaxillae were then extracted and immersed in fixative solution for 24 hr. Incisor tooth of each hemimaxilla was sectioned transversally at 2 mm above the alveolar bone crest, using a hard tissue microtome (South Bay Technology Inc., Model 650, USA).

Hemimaxillae containing posterior fragments of the incisors were subjected to decalcification by immersion in 5% nitric acid, 4% formaldehyde under continuous shaking for 24 hr. After dehydration and clarification, decalcified samples were

ANEXO C

embedded in paraffin, and 5 μm thick longitudinal sections were obtained using a Leica RM2155 microtome (Leica Microsystems, Germany). The sections were treated with xylene for removal of the paraffin, and hydrated. They were analyzed with transmitted polarizing light microscopy (TPLM) and used for quantitative analysis of the secretory stage EOECM as described below.

Anterior mineralized fragments from right upper incisors of c56 and p56 rats were used for study of mature enamel external surface chemical composition and topography by energy-dispersive x-ray (EDX) analysis and scanning electron microscopy (SEM), respectively. Anterior mineralized fragments from left upper incisors of c56 and p56 rats were used for microhardness testing (MHT) and SEM of cross-sectioned mature enamel (in order to assess morphology of internal regions of that structure).

TPLM and quantitative analysis of the secretory stage EOECM

Unstained longitudinal sections of the hemimaxillae from each animal were analyzed to determine optical retardation (nm) of birefringence brightness in the secretory stage EOECM of upper incisors. Twenty sections from each tooth were immersed in 80% glycerin for 30 min and 10 measurements were performed by an observer blind to the studied groups. A mean value was obtained for each animal. A Leica DM LP microscope (Leica Microsystems) equipped with polarizing filters, a Brace-Köhler compensator (Wild Leitz, Wetzlar, Germany), and polychromatic light were used. Measurements were submitted to statistical analysis (t test). Ten percent of the sections investigated with TPLM were also stained by hematoxylin and eosin (HE) and analyzed with bright field light microscopy in order to demonstrate satisfactory structural preservation.

Dispersion birefringence curves were obtained after determining optical retardations of the area that showed the highest birefringence brightness, as a function of each refractive index (n) of the following imbibing media: water ($n = 1.333$), 80% aqueous glycerin ($n = 1.435$), 100% glycerin ($n = 1.461$) and Entellan[®] resin ($n = 1.495$; Merck, Darmstadt, Germany). Sections were immersed in the each of these imbibing media for 30 min before measuring optical retardation. These fluids were used in the sequence they are quoted and were carefully removed from the sections with an appropriate solvent (water or xylene).

Ninety percent of the sections investigated with TPLM were also stained with Ponceau SS and analyzed with light microscopy. A Leica DM LP microscope equipped

ANEXO C

with a green filter (546 nm) was used. Images were captured by a Leica DFC280 digital camera, with 96 DPI resolution and 1280x1024 pixels. The images were converted into 8-bit grayscale. Image J software (1.42q version; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) was used to analyze the captured images and to measure the quantity of stained proteins in the following three 1280x100 pixels areas of the secretory stage EOECM: A (close to ameloblasts), M (in the middle of the secretory stage EOECM) and D (close to dentin). Absorbance values were submitted to statistical analysis (t or Mann-Whitney test, depending on the variability of the analyzed data).

EDX analysis and SEM of external surface of mature enamel

Anterior mineralized fragments from right maxillary incisors of c56 and p56 rats were cleaned with an ultrasound, dehydrated and mounted on acrylic stubs. First they were sputter coated with carbon and subjected to EDX analysis in order to assess chemical composition of the flat region of external surface of buccal mature enamel near the section line. A Jeol JSM-5600 V scanning electron microscope (JEOL LTD., Tokyo, Japan) was used. Proportional values of the detected chemical elements were submitted to statistical analysis (t or Mann-Whitney test, depending on the variability of the analyzed data). After EDX analysis, the same specimens were sputter coated with gold and submitted to SEM in order to analyze topography of external surface of buccal mature enamel using the aforementioned scanning electron microscope. Groups were compared by descriptive analysis.

MHT and SEM of Cross-Sectioned Mature Enamel

Anterior mineralized fragments from left maxillary incisors of c56 and p56 rats were embedded in acrylic resin and had their distal extremity polished for MHT with a Knoop microhardness tester (Model FMA-ARS, Future Tech Corp., Tokyo, Japan) of internal regions of mature enamel. Five indentations, each separated 50 μm from another, were made at 40 and 80 μm from dentin-enamel junction (DEJ) at the buccal enamel, as well as 30 and 60 μm at the lateral enamel, comprising a total of 20 indentations per tooth. The load used was 25 g and the time was 5 s. MHT was conducted by an observer blind to the studied groups. Groups were compared submitting Knoop microhardness values to statistical analysis (t or Mann-Whitney test, depending on the variability of the analyzed data). After MHT, the specimens were

ANEXO C

polished, acid treated, dehydrated, sputter-coated with gold and examined using a Jeol JSM-5600 V scanning electron microscope (JEOL LTD., Tokyo, Japan). Morphology of internal regions of mature enamel (rods' organization and orientation) from c56 and p56 groups was compared by descriptive analysis.

RESULTS

Secretory stage EOECM presented measurable birefringence in all groups (c21, p21, c56 and p56; Fig. 1). Rats of p21 group showed a statistically significant decrease in optical retardation of birefringence brightness when compared to rats of c21 group ($p < 0.05$, t test; Fig. 1). Pamidronate-treated rats for 56 days showed a statistically significant reduction in optical retardation values compared to rats of c56 group ($p < 0.01$, t test; Fig. 1; Fig. 2). Bright field light microscopy showed that pamidronate had not induced morphological alterations in the secretory stage EOECM of rats treated for 21 and 56 days (Fig. 2B, D). Animals assigned to c56 group exhibited similar dispersion birefringence curves, which were clearly higher when compared to data of p56 rats (Fig. 3). Note that the highest and the smallest retardations (form and intrinsic birefringences, respectively) for the series of refractive indices correspond to $n=1.435$ (80% aqueous glycerin) and $n= 1.495$ (Entellan[®] resin) in that order. Pamidronate-treated rats for 56 days showed weaker form and intrinsic birefringences when compared to c56 animals. Pamidronate-treated rats for 21 days showed a statistically significant increase in protein amount of the secretory stage EOECM when compared to c21 animals in regions M and D ($p < 0.05$, $p < 0.01$, respectively, t test; Fig. 4). Rats of c56 and p56 groups exhibited statistically similar values of protein amount in regions A ($p > 0.05$, t test; Table 1), M and D ($p > 0.05$, Mann-Whitney test; Table 1).

EDX analysis showed that the quantity of phosphorus in outer buccal enamel was smaller in p56 rats when compared to c56 group ($p < 0.01$, Mann-Whitney test; Table 2). Consequently, calcium/phosphorus ratio was higher in p56 group ($p < 0.05$, t test; Fig. 5). Scanning electron microcopies of the external surface of buccal enamel from c56 and p56 rats showed that pamidronate had not caused any significant ultrastructural alteration (Fig. 6A, C). All the specimens exhibited homogeneous outer mature buccal enamel with regular contour and no morphological modifications.

Cross-sectioned inner mature enamel of c56 and p56 rats showed, by means of SEM, a regular pattern of rods' organization and orientation (Fig. 6B, D). Inner regions of mature enamel also exhibited statistically similar values of Knoop microhardness in all the analyzed regions and depths when both groups were compared ($p > 0.05$, t or

ANEXO C

Mann-Whitney test; Table 3). These results demonstrated that administration of pamidronate disodium had not altered inner mature enamel morphology and microhardness.

DISCUSSION

Fact-based update on the structural biology of the secretory stage EOECM indicates that full-length enamel proteins (amelogenins, enamelin and ameloblastins) and/or their C-terminal cleavage products are only present at the mineralization front (near the ameloblasts) and are not localized in the older, deeper enamel layers (Bartlett, 2013). Subsequently, they are cleaved by enamelysin (MMP20) and their N-terminal cleavage products accumulate within the enamel to form a mold that establishes the shape, size, and orientation of the forming crystallites (Bartlett, 2013). Once the end of the secretory stage is attained and the crystallite ribbons stop growing in length, kallikrein-related peptidase-4 (KLK4) is secreted to cleave the enamel matrix protein mold so that it can be exported from the hardening enamel so that the maturing crystallites can interlock and form a cohesive rod structure (Bartlett, 2013).

We have previously reported that the secretory enamel matrix described above, which is mainly composed by amelogenins, is strongly birefringent as revealed by TPLM (do Espírito Santo, Novaes and Line, 2006). This finding seems to be triggered by polymerization of amelogenin nanospheres and be increased after cleavage of full-length amelogenins by MMP20 (Espírito Santo et al., 2007). Interestingly, our reports show that the birefringence of the secretory stage EOECM is not clearly observed close to ameloblasts (where full-length enamel proteins and/or their C-terminal cleavage products are present), but in the older, deeper enamel layers (where the N-terminal cleavage products of that proteins are located) (do Espírito Santo, Novaes and Line, 2006; Espírito Santo et al., 2007).

Since birefringence occurs as a consequence of ordered polymerization of macromolecules, changes in this anisotropic property of the secretory stage EOECM may reflect qualitative and/or quantitative alterations in the supramolecular organization of its components. These modifications may be the starting point for interfering shape, size, and orientation of the forming enamel crystallites, leading to defects in mature enamel. Therefore, we have proposed that disturbance in the birefringence of the secretory stage EOECM is a possible mechanism by which environmental factors may cause enamel defects (do Espírito Santo et al., 2010).

ANEXO C

Careful analysis of the literature reveals that all the studies investigating the effects of BPs on the enamel formation address etidronate and/or alendronate (Nelson-Filho et al., 2012; do Espírito Santo et al., 2010; Fejerskov, Josephsen and Weile, 1990; Fouda, Caracatsanis and Hammarstrom, 1989; Fouda, Caracatsanis and Kut, 1991; Fuangtharnthip et al., 2000; Josephsen et al., 1990; Simmelink, 1987; Wakamatsu, 1991; Weile, Josephsen and Fejerskov, 1990, 1993; Yamada et al., 2000). Based on the reported data in regards to effects on amelogenesis, clinical use of etidronate should be systematically discarded whereas alendronate use in infants seems to be safe. This is the first study that assesses the effects of pamidronate disodium, a widely prescribed NBP for children as well as alendronate, on the enamel formation. Pamidronate-treated rats for 21 and 56 days did not exhibit morphological alterations in the secretory stage EOECM as revealed by TPLM and bright field light microscopy, but they showed significantly weaker form and intrinsic birefringences in that structure when compared with control animals (Fig.1; Fig.2; Fig. 3). Pamidronate and control rats presented maximum birefringence brightness when enamel rods were oriented at 45° with respect to the polarizer and analyzer filters (Fig. 2). Decrease in optical retardation values of p21 rats may be explained by a statistically significant increase in the amount of proteins detected in regions M and D of the secretory stage EOECM of those animals (Fig. 4). These findings are in accordance with previous report on decrease of birefringence induced by another NBP (sodium alendronate) and with earlier evidences of higher synthesis/secretion of amelogenins by ameloblasts from alendronate-treated rats when comparing to control animals, as well as of inhibition of MMP20 activity by pamidronate and other BPs (do Espírito Santo et al., 2010; Massa, Bradaschia-Correa and Arana-Chavez, 2006; Heikkilä et al., 2002). Actually, we have demonstrated that proteolytic cleavage of amelogenin by MMP20 is related to the formation of a stronger birefringent secretory stage EOECM (Espírito Santo et al., 2007). Interestingly, a statistically significant larger decrease in optical retardation values was exhibited by p56 rats (Fig. 1; Fig. 2; Fig.3), which showed statistically similar amounts of proteins in regions A, M and D of the secretory stage EOECM when compared with c56 animals (Table 1). The results presented here indicate that pamidronate disodium have possibly induced changes in the aggregational properties of the EOECM, but not in amount and orientation of its components.

EDX analysis revealed a slight increase of calcium/phosphorus ratio as a consequence of little decrease in phosphorus' quantity in outer mature enamel of pamidronate-treated rats for 56 days when compared to control animals (Fig. 5; Table

ANEXO C

2). This may be associated with previous report on the incorporation of alendronate to enamel's crystalline structure of maxillary incisors from rats systemically treated with that drug (Nelson-Filho et al., 2012). Clinical relevance of EDX analysis' data presented here should be investigated, exploring for example the effect of a pamidronate-induced higher calcium/phosphorus ratio on enamel's resistance to acid released by cariogenic bacteria.

Pamidronate did not induce ultra-structural alterations in outer and inner enamels as revealed by SEM (Fig. 6). This is in accordance with the findings assessed by TPLM and bright field light microscopy, and with the studies by do Espírito Santo et al. (2010) and Nelson-Filho et al. (2012) showing no morphological changes in external surface and internal regions of the enamel in maxillary incisors from alendronate-treated rats.

MHT of all the analyzed regions of cross-sectioned inner mature enamel showed that pamidronate did not induce a reduction of that structure's microhardness (Table 3), corroborating previous report on the effect of alendronate on mechanical properties of mature enamel (Nelson-Filho et al., 2012) and discording from earlier findings observed by our group (Espírito Santo et al., 2010).

The present study indicates that pamidronate could affect birefringence of the secretory stage EOECM and induce a slight increase of calcium/phosphorus ratio in mature enamel. These pamidronate-induced alterations, however, do not seem to be associated with changes in morphological and/or mechanical properties of that structure, suggesting that clinical use of that drug in children could be safe in regards to dental concerns.

ANEXO C

ACKNOWLEDGEMENTS

This study is part of the Master's dissertation of the first author (Ana Prates Soares), who received a scholarship from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia – FAPESB, and comprises part of a research project supported by grants from FAPESB (PPP0065/2010). We thank Professor J.A. Cury from the Department of Physiological Sciences, Piracicaba Dental School, University of Campinas – UNICAMP, for the use of Knoop microhardness tester.

DECLARATION OF INTEREST

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

ANEXO C

REFERENCES

- August KJ, Dalton A, Katzenstein HM, George B, Olson TA, Wasilewski-Masker K, Rapkin LB. 2011. The use of zoledronic acid in pediatric cancer patients. *Pediatr Blood Cancer* 56:610-614.
- Bachrach LK, Ward LM. 2009. Clinical review 1: Bisphosphonate use in childhood osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 94:400-409.
- Bajpai A, Kabra M, Gupta N, Sharda S, Ghosh M. 2007. Intravenous pamidronate therapy in osteogenesis imperfecta: response to treatment and factors influencing outcome. *J Pediatr Orthop* 27:225-227.
- Baroncelli GI, Bertelloni S. 2014. The use of bisphosphonates in pediatrics. *Horm Res Paediatr* 82:290-302.
- Barros ER, Saraiva GL, de Oliveira TP, Lazaretti-Castro M. 2012. Safety and efficacy of a 1-year treatment with zoledronic acid compared with pamidronate in children with osteogenesis imperfecta. *J Pediatr Endocrinol Metab* 25:485-491.
- Bartlett JD. 2013. Dental enamel development: proteinases and their enamel matrix substrates. *ISRN Dent* 2013:ID684607.
- Bishop N, Adami S, Ahmed SF, Antón J, Arundel P, Burren CP, Devogelaer JP, Hangartner T, Hosszú E, Lane JM, Lorenc R, Mäkitie O, Munns CF, Paredes A, Pavlov H, Plotkin H, Raggio CL, Reyes ML, Schoenau E, Semler O, Sillence DO, Steiner RD. 2013. Risedronate in children with osteogenesis imperfecta: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 382:1424-1432.
- Castillo H, Samson-Fang L; American Academy for Cerebral Palsy and Developmental Medicine Treatment Outcomes Committee Review Panel. 2009. Effects of bisphosphonates in children with osteogenesis imperfecta: an AACPDM systematic review. *Dev Med Child Neurol* 51:17-29.
- Chilbule SK, Madhuri V. 2012. Complications of pamidronate therapy in paediatric osteoporosis. *J Child Orthop* 6:37-43.
- Cremers S, Papapoulos S. 2011. Pharmacology of bisphosphonates. *Bone* 49:42-9.
- do Espírito Santo AR, Frozoni MR, Ramos-Perez FM, Novaes PD, Line SR. 2010. Birefringence of the secretory-stage enamel organic extracellular matrix from rats submitted to successive injections of bisphosphonates. *Connect Tissue Res* 51:208-215.
- do Espírito Santo AR, Novaes PD, Line SR. 2006. Anisotropic properties of the enamel organic extracellular matrix. *Eur J Oral Sci* 114:333-337.

ANEXO C

- Dwan K, Phillipi CA, Steiner RD, Basel D. 2014. Bisphosphonate therapy for osteogenesis imperfecta. *Cochrane Database Syst Rev* 7:CD005088.
- Espírito Santo AR, Bartlett JD, Gibson CW, Li Y, Kulkarni AB, Line SR. 2007. Amelogenin- and enamelysin (Mmp-20)-deficient mice display altered birefringence in the secretory-stage enamel organic extracellular matrix. *Connect Tissue Res* 48:39-45.
- Fejerskov O, Josephsen K, Weile V. 1990. The effect of a single dose of 1-hydroxyethylidene-1, 1-bisphosphonate (HEBP) on secretory ameloblasts and enamel formation in rat incisors. *J Biol Buccale* 18:339-354.
- Fleisch H. 1993. Prospective use of bisphosphonates in osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 76:1397-1398.
- Fleisch H. 1997. Bisphosphonates: mechanisms of action and clinical use in osteoporosis--an update. *Horm Metab Res* 29:145-50.
- Fouda N, Caracatsanis M, Hammarstrom L. 1989. Developmental disturbances of the rat molar induced by two diphosphonates. *Adv Dent Res* 3:234-240.
- Fouda N, Caracatsanis M, Kut IA, Hammarstrom L. 1991. Mineralization disturbances of the developing rat molar induced by mono- and bisphosphonates. *J Biol Buccale* 19:106-115.
- Fuangtharnthip P, Yamada Y, Takagi Y, Ohya K. 2000. Autoradiographic investigation of the effect of 1-hydroxyethylidene, 1-bisphosphonate on matrix protein synthesis and secretion by secretory ameloblasts in rat incisors. *Arch Oral Biol* 45:495-506.
- Glorieux FH, Bishop NJ, Plotkin H, Chabot G, Lanoue G, Travers R. 1998. Cyclic administration of pamidronate in children with severe osteogenesis imperfecta. *N Engl J Med* 339:947-952.
- Heikkilä P, Teronen O, Moilanen M, Konttinen YT, Hanemaaijer R, Laitinen M, Maisi P, van der Pluijm G, Bartlett JD, Salo T, Sorsa T. 2002. Bisphosphonates inhibit stromelysin-1 (MMP-3), matrix metalloelastase (MMP-12), collagenase-3 (MMP-13) and enamelysin (MMP-20), but not urokinase-type plasminogen activator, and diminish invasion and migration of human malignant and endothelial cell lines. *Anticancer Drugs* 13:245-254.
- Hiraga T, Ninomiya T, Hosoya A, Nakamura H. 2010. Administration of the bisphosphonate zoledronic acid during tooth development inhibits tooth eruption and formation and induces dental abnormalities in rats. *Calcif Tissue Int* 86:502-510.
- Iwai T, Isomatsu Y, Iwamoto M, Tohnai I. 2013. Bisphosphonate-related enamel hypoplasia in a child with idiopathic arterial calcification of infancy. *Br J Oral Maxillofac Surg* 51:e186-187.

ANEXO C

- Josephsen K, Fejerskov O, Baelum V, Weile V. 1990. The effect of a single dose of 1-hydroxyethylidene-1,1-bisphosphonate (HEBP) on presecretory ameloblast differentiation in rat incisors. *J Biol Buccale* 18:321-337.
- Kamoun-Goldrat A, Ginisty D, Le Merrer M. 2008. Effects of bisphosphonates on tooth eruption in children with osteogenesis imperfecta. *Eur J Oral Sci* 116:195-198.
- Kitaoka T, Namba N, Miura K, Kubota T, Ohata Y, Fujiwara M, Hirai H, Yamamoto T, Ozono K. 2011. Decrease in serum FGF23 levels after intravenous infusion of pamidronate in patients with osteogenesis imperfecta. *J Bone Miner Metab* 29:598-605.
- Maasalu K, Haviko T, Martson A. 2003. Treatment of children with osteogenesis imperfecta in Estonia. *Acta Paediatr* 92:452-455.
- Massa LF, Bradaschia-Correa V, Arana-Chavez VE. 2006. Immunocytochemical study of amelogenin deposition during the early odontogenesis of molars in alendronate-treated newborn rats. *J Histochem Cytochem* 54:713-725.
- Modesto A, Klein O, Tenuta LM, Gerlach RF, Vieira AR. 2013. Summary of the IADR Cariology Research, Craniofacial Biology, and Mineralized Tissue Groups Symposium, Iguaçú Falls, Brazil, June 2012: Gene-environment Interactions and Epigenetics in Oral Diseases: Enamel Formation and its Clinical Impact on Tooth Defects, Caries, and Erosion. *Dent* 3000 1:pii:http://dentistry3000.pitt.edu/ojs/inde
- Nelson-Filho P, Lucisano MP, Da Silva RA, Da Silva RS, Serra MC, Gerlach RF, Neto FC, Carneiro ZA, Zamarioli A, Morse L, Battaglino R. 2012. Systemically alendronate was incorporated into dental tissues but did not cause morphological or mechanical changes in rats teeth. *Microsc Res Tech* 75:1265-1271.
- Phillipi CA, Remington T, Steiner RD. 2008. Bisphosphonate therapy for osteogenesis imperfecta. *Cochrane Database Syst Rev* 4:CD005088.
- Plotkin H, Rauch F, Bishop NJ, Montpetit K, Ruck-Gibis J, Travers R, Glorieux FH. 2000. Pamidronate treatment of severe osteogenesis imperfecta in children under 3 years of age. *J Clin Endocrinol Metab* 85:1846-1850.
- Rodan GA, Fleisch HA. 1996. Bisphosphonates: mechanisms of action. *J Clin Invest* 97:2692-2696.
- Russell RG. 2011. Bisphosphonates: the first 40 years. *Bone* 49:2-19.
- Simmelink JW. 1987. Ultrastructural effects of diphosphonates on dental enamel. *Adv Dent Res* 1:356-365.
- Smith CE, Nanci A. 1989. A method for sampling the stages of amelogenesis on mandibular rat incisors using the molars as a reference for dissection. *Anat Rec* 225:257-266.

ANEXO C

- Sukumar SP, Balachandran K, Sahoo JP, Kamalanathan S. 2013. Zebra lines in osteogenesis imperfecta on bisphosphonate therapy. *BMJ Case Rep* 2013;pii: bcr2012008536.
- Thesleff I, Vaahtokari A, Kettunen P, Aberg T. 1995. Epithelial-mesenchymal signaling during tooth development. *Connect Tissue Res* 32:9-15.
- van Beek ER, Lowik C, Papapoulos S. 2002. Bisphosphonates suppress bone resorption by a direct effect on early osteoclast precursors without affecting the osteoclastogenic capacity of osteogenic cells: the role of protein geranylgeranylation in the action of nitrogen-containing bisphosphonates on osteoclast precursors. *Bone* 30:64-70.
- van Beek ER, Pieterman E, Cohen L, Lowik C, Papapoulos S. 1999. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit isopentenyl pyrophosphate isomerase/farnesyl pyrophosphate synthase activity with relative potencies corresponding to their antiresorptive potencies in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 263: 754-758.
- Wakamatsu H. 1991. A study of the effects of successive injections of 1-hydroxyethylidene-1, 1-bisphosphonate (HEBP) on the enamel formation of rat incisor. *Jpn J Oral Biol* 33:82-96.
- Ward LM, Rauch F, Whyte MP, D'Astous J, Gates PE, Grogan D, Lester EL, McCall RE, Pressly TA, Sanders JO, Smith PA, Steiner RD, Sullivan E, Tyerman G, Smith-Wright DL, Verbruggen N, Heyden N, Lombardi A, Glorieux FH. 2011. Alendronate for the treatment of pediatric osteogenesis imperfecta: a randomized placebo-controlled study. *J Clin Endocrinol Metab* 96:355-364.
- Weile V, Josephsen K, Fejerskov O. 1990. Effects of single doses of 1-hydroxyethylidene-1,1-bisphosphonate on the mineralizing front of rat incisor enamel: a microradiographic and scanning electron microscopic study. *Arch Oral Biol* 35:857-867.
- Weile V, Josephsen K, Fejerskov O. 1993. Scanning electron microscopy of final enamel formation in rat mandibular incisors following single injections of 1-hydroxyethylidene-1,1-bisphosphonate. *Calcif Tissue Int* 52:318-324.
x.php/dentistry3000/article/view/16/17.
- Yamada Y, Fuangtharnthip P, Tamura Y, Takagi Y, Ohya K. 2000. Gene expression and immunolocalization of amelogenin in enamel hypoplasia induced by successive injections of bisphosphonate in rat incisors. *Arch Oral Biol* 45:207-215.

ANEXO C

TABLES

TABLE 1. Protein quantity in 5 µm thick sections of the secretory-stage EOECM of c56 and p56 groups. No significant differences were observed.

Groups	n	Regions in the secretory-stage EOECM								
		A			M			D		
		Absorbance in grayscale			Absorbance in grayscale			Absorbance in grayscale		
		Mean	SD		Median	q1	q3	Median	q1	q3
c56	9	41.66 ^a	8.16		43.49 ^a	39.18	46.48	42.67 ^a	37.68	46.38
p56	9	41.26 ^a	4.15		43.19 ^a	40.81	45.20	43.20 ^a	42.61	46.45
p = 0.8928, t test			p = 1.000, Mann-Whitney test					p = 0.534, Mann-Whitney test		

SD = standard deviation; q = quartile.

Regions in the secretory-stage EOECM: A (close to ameloblasts); M (middle); D (close to dentin).

TABLE 2. Phosphorus amount in mature enamel of c56 and p56 groups. A statistically significant reduction of this chemical element was observed in p56 group.

Groups	n	EDX analysis		
		Amount of phosphorus (%)		
		Median	q1	q3
c56	9	28.55 ^a	28.18	29.25
p56	9	27.31 ^b	26.45	27.64
p = < 0.0001, Mann-Whitney test				

EDX = energy dispersive x-ray; q = quartile.

TABLE 3. Mature enamel cross-sectional microhardness values (Knoop microhardness numbers) of c56 and p56 groups. No significant differences were observed.

Groups	n	Knoop microhardness number									
		Buccal mature enamel					Lateral mature enamel				
		Distance from DEJ					Distance from DEJ				
		40 µm			80 µm		30 µm		60 µm		
		Median	q1	q3	Mean	SD	Mean	SD	Median	q1	q3
c56	9	272.52 ^a	262.63	282.88	354.69 ^a	26.11	281.21 ^a	37.68	292.54 ^a	289.63	297.22
p56	9	263.05 ^a	257.40	270.86	359.70 ^a	13.24	275.96 ^a	42.62	287.45 ^a	281.39	291.80
p = 0.265, Mann-Whitney test					p = 0.5893, t test		p = 0.3938, t test		p = 0.1551, Mann-Whitney test		

DEJ = dentin-enamel junction; q = quartile; SD = standard deviation.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Optical retardations of birefringence brightness (nm) of unstained 5 μm thick sections of the secretory stage EOECM of animals assigned to c21, p21, c56 and p56 groups. Note that pamidronate induced statistical significant decrease in optical retardation of birefringence brightness.

Fig. 2. Bright field light and polarizing light microcopies of the secretory stage EOECM of rats assigned to c56 and p56 groups. The analyzer and polarizer are denoted by crossed bars. The arrow at 45° with the polarizer and analyzer indicates position of maximum birefringence. Bar on the right inferior side represents 100 μm . A. Birefringence of an unstained 5 μm thick section of the secretory stage EOECM of a c56 rat upper incisor. B. Bright field of section A, after staining with HE. C. Birefringence of an unstained 5 μm thick section of the secretory stage EOECM of a p56 rat upper incisor. D. Bright field of section C, after staining with HE. Note that pamidronate did not induce morphological alterations of the EOECM, but was associated with an expressive decrease in birefringence brightness of that structure.

Fig. 3. Dispersion birefringence curves of c56 and p56 rats. Optical retardations (nm) of birefringence brightness of unstained 5 μm thick sections of the secretory stage EOECM of rat upper incisors, as a function of the refractive indices (n) of the following imbibing media: water (n = 1.333), 80% aqueous glycerin (n = 1.435), 100% glycerin (n = 1.461) and Entellan® resin (n = 1.495). Measurements of optical retardations were made with Brace-Köhler compensator and polychromatic light. Each point in the curve is the mean of 10 measurements. Note that the highest and the smallest retardations (form and intrinsic birefringences, in that order) for the series of refractive indices correspond respectively to n = 1.435 (80% aqueous glycerin) and n = 1.495 (Entellan® resin). Rat assigned to p56 group shows weaker form and intrinsic birefringences.

Fig. 4. Protein quantity in 5 μm thick sections of the secretory stage EOECM of c21 and p21 groups (values represent means of absorbance measured). Note that p21 group showed an expressive increase in the amount of proteins in regions M and D of that matrix.

Fig. 5. Calcium/phosphorus ratio in mature enamel of c56 and p56 groups. Note that p56 group exhibited a slight increase of it, which was statistically significant.

ANEXO C

Fig. 6. Scanning electron micrographs of mature enamel of maxillary incisor teeth from rats included in c56 and p56 groups. Control (A, B) and pamidronate-treated (C, D) animals exhibited similar internal and external aspects of mature enamel. All the specimens exhibited homogeneous outer mature buccal enamel with regular contour and no morphological modifications (A, C). Cross-sectioned inner mature enamel of c56 and p56 rats showed a regular pattern of rods' organization and orientation (B, D).

Figure 1

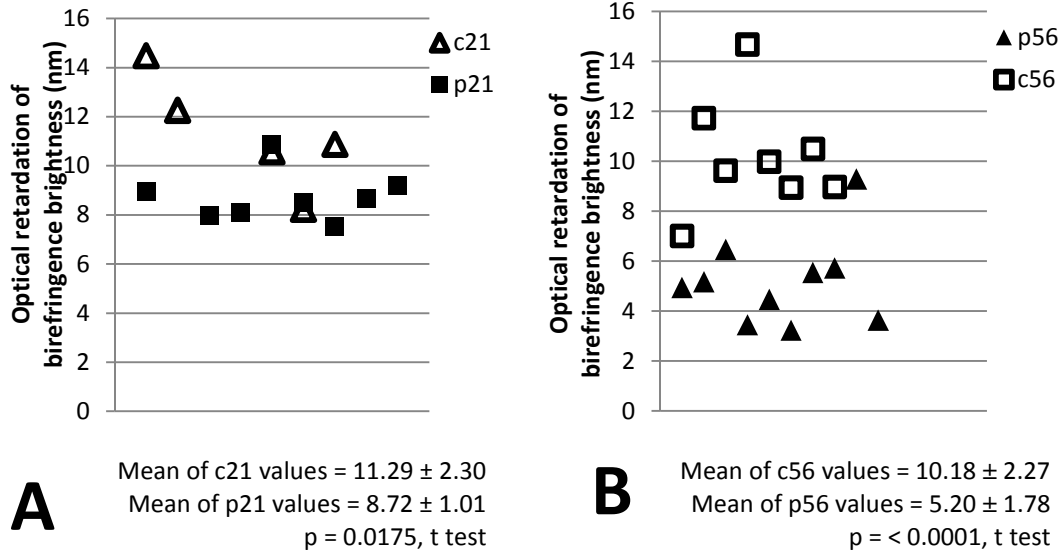
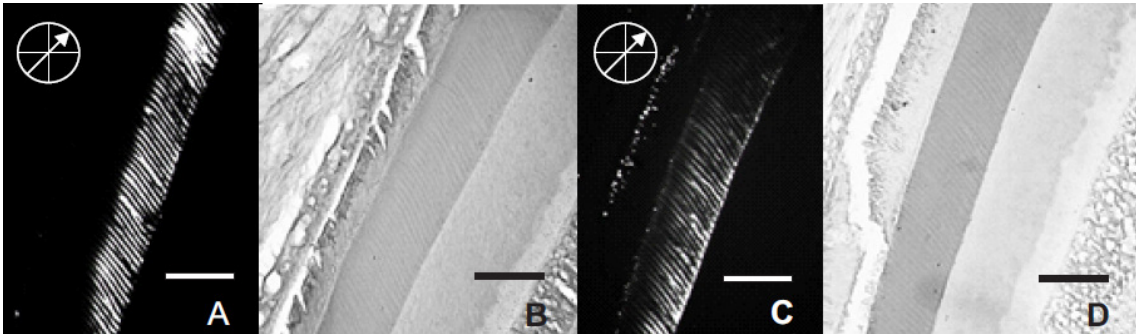


Figure 2



ANEXO C

Figure 3

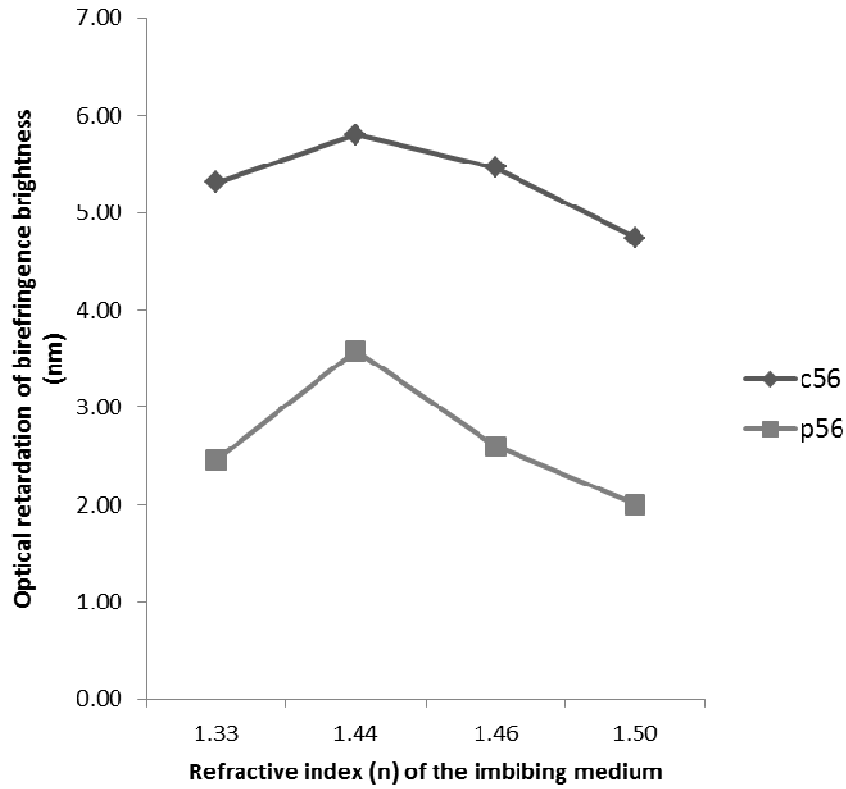
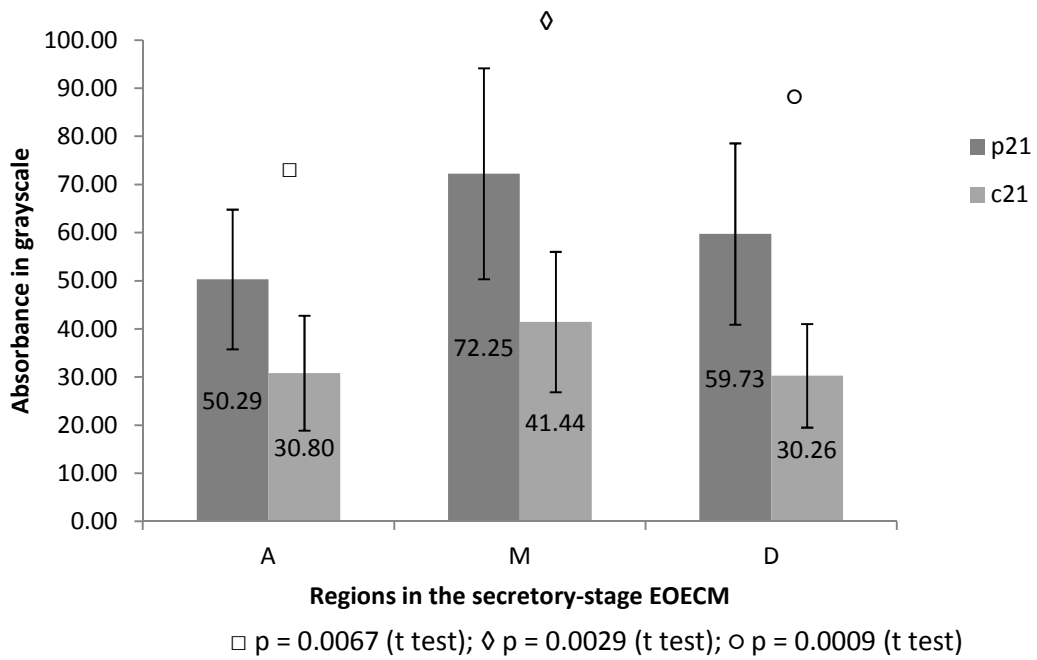


Figure 4



ANEXO C

Figure 5

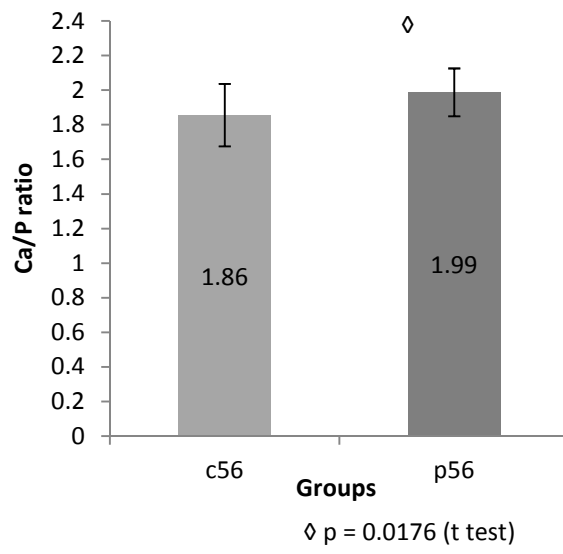


Figure 6

