



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara

Juliana Feltrin de Souza

**EFEITO DA AMOXICILINA E DO
FLUORETO NO DESENVOLVIMENTO DO
ESMALTE DENTÁRIO DE RATOS**

Araraquara

2013



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara

Juliana Feltrin de Souza

**EFEITO DA AMOXICILINA E DO FLUORETO NO
DESENVOLVIMENTO DO ESMALTE DENTÁRIO DE
RATOS**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas - Área de Odontopediatria, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista, para obtenção do título de Doutor em Ciências Odontológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia Loiola Cordeiro

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri

ARARAQUARA

2013

Souza, Juliana Feltrin de

Efeito da amoxicilina e do fluoreto no desenvolvimento do esmalte de ratos / Juliana Feltrin de Souza.-- Araraquara: [s.n.], 2013.

108 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientador: Profa. Dra. Rita de Cássia Loiola Cordeiro

1. Esmalte dentário 2. Amelogênese 3. Hipoplasia do esmalte dentário 4. Amoxicilina 5. Fluoreto de sódio 6. Ratos I. Título

Juliana Feltrin de Souza

**Efeito da amoxicilina e do fluoreto e no desenvolvimento do esmalte dentário de
ratos**

Presidente e Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Rita de Cassia Loiola Cordeiro (FOAr-UNESP)

1^º Examinador: Prof^ª. Dr^ª. Lourdes dos Santos-Pinto (FOAr-UNESP)

2^º Examinador: Prof^ª. Dr^ª. Ângela Cristina Cilense Zuanon (FOAr-UNESP)

3^º Examinador: Prof^ª Dr^ª. Soraya Leal (UNB)

4^º Examinador: Prof. Dr. Victor Arana- Chaves (Universidade de São Paulo)

DADOS CURRICULARES
JULIANA FELTRIN DE SOUZA

Nascimento: 15/04/1986 – Rio Claro/ SP

Filiação: Odair Apolinário de Souza e Célia Maria Feltrin de Souza

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2004-2007: Curso de Graduação

Faculdade de Odontologia de Araraquara

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

2008-2010: Curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de

Concentração em Odontopediatria, nível Mestrado,

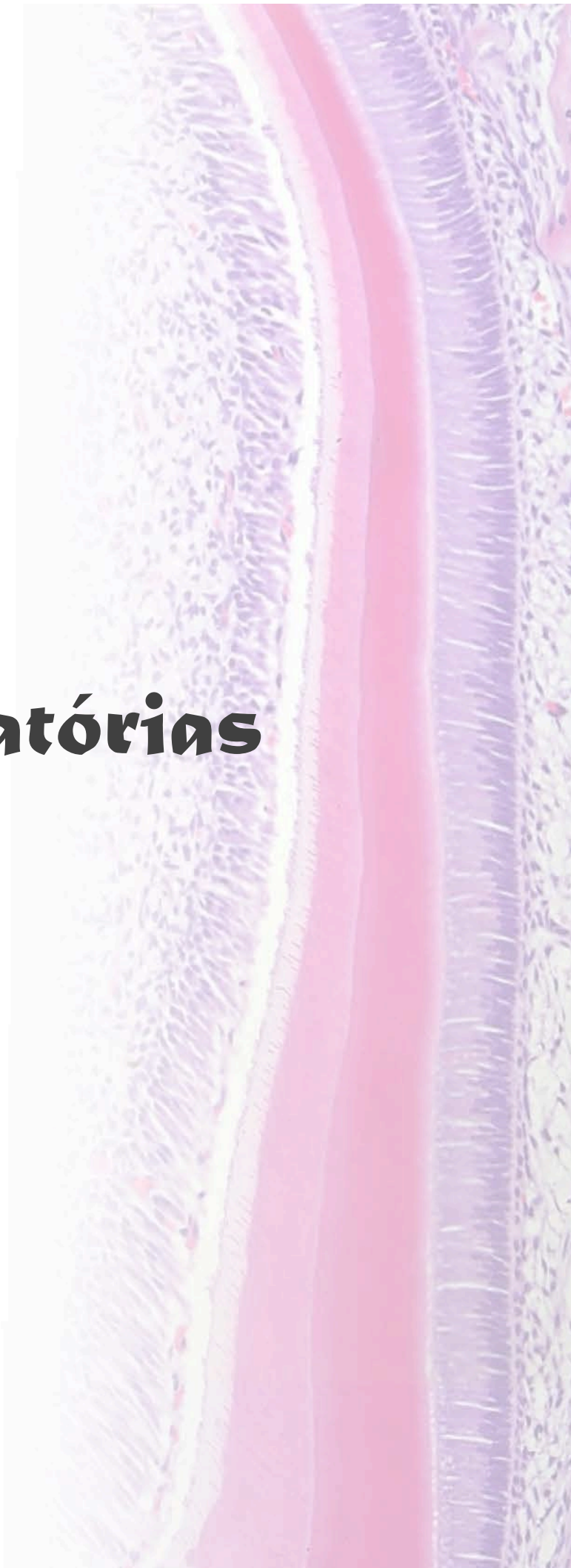
Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

2010-2013: Curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de

Concentração em Odontopediatria, nível Doutorado, Faculdade de

Odontologia de Araraquara - UNESP

Dedicatórias



Dedico este trabalho ...

Primeiramente, a **Deus**, pelo dom da vida, por ser tão generoso comigo, pela família que tenho, e pelos amigos que colocou em minha vida.

Agradeço-te Senhor, por sustentar-me diante dos momentos difíceis, fortalecendo-me e confortando meu coração diante dos obstáculos.

Agradeço-te pela benignidade e paz em minha vida. Por guiar meus passos nos momentos decisivos, e pelas oportunidades que tem me dado.

Ao meu querido esposo **Thiago,**

Pelo incentivo constante, por acreditar em mim e em meus objetivos. Agradeço pelo apoio emocional e pelas palavras positivas que me fazem seguir em frente. Agradeço pelo companheirismo, amizade e por sempre cuidar de mim. Por compreender os momentos de ausência, pelo amor, dedicação e por se fazer sempre presente. Te amo!

Aos meus amados pais, **Célia e Odair,**

Dedico este trabalho a vocês, que com amor incondicional sempre me incentivaram, apoiaram e proporcionaram meios para eu alcançar meus sonhos. Agradeço por transmitir os verdadeiros valores de vida, sendo exemplos de caráter, humildade, honestidade, dignidade e amor. Agradeço a confiança que sempre depositaram em mim, e a presença constante em minha vida. Amo vocês.

Aos meus irmão **Junior** e minha cunhada **Elisângela,**

Agradeço pelo amor fraterno, amizade, companheirismo e união mesmo que à distância. À **Elisangela,** és a irmã que Deus me deu, muito obrigada pela amizade, carinho e apoio. Agradeço a vocês por ajudarem sempre que precisei. Ao pequeno **Théo,** agradeço por preencher nossos dias de alegria, tornando nossas vidas mais leves.

Ao meu Co-orientador, ***Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri,***

Agradeço imensamente por abrir as portas do seu laboratório, e me sinto feliz por tê-lo como co-orientador, e por todo apoio que me dispensa, pelos ensinamentos, pela paciência em ensinar as técnicas e o estudo em animais. Agradeço por participar ativamente em todas as fases desse estudo e pelo convívio harmonioso. Por me confortar e transmitir segurança durante a realização dessa pesquisa. Por me incentivar e motivar ao aprimoramento. Parableno-te pelo caráter e dedicação no exercício da docência e da pesquisa, e pela valorização dos seus alunos.

A minha querida orientadora ***Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia Loiola Cordeiro***

Agradeço Tia Rita pela pessoa que és, e me sinto feliz em tê-la como orientadora, pela confiança que sempre depositou em mim, pelo constante incentivo e apoio desde o mestrado. Por me ensinar tanto com suas experiências pessoais e profissionais. Por apoiar na realização desta e de outras pesquisas. Pelas palavras que sempre me confortaram e me incentivaram, e por dispor de meios para que eu alcançasse meus objetivos.

Muito obrigada pela sua valiosa orientação, que foi fundamental para minha formação acadêmica, pelo exemplo de humanismo e generosidade. Agradeço pela amizade, pelo convívio harmônico e alegre, por sua dedicação na minha formação durante esses anos.



Agradecimentos

Especiais

Aos professores da Disciplina de Odontopediatria, **Prof^ª. Dr^ª. Lourdes dos Santos-Pinto, Prof^ª. Dr^ª. Rita de Cássia Loiola Cordeiro, Prof^ª. Dr^ª. Angela Cristina Cilense Zuanon, Prof. Dr. Cyneu Aguiar Pansani, Prof^ª. Dr^ª. Josimeri Hebling Costa, Prof^ª. Dr^ª. Elisa Maria Aparecida Giro, Prof. Dr. Fábio César Braga de Abreu e Lima, Prof^ª. Dr^ª. Fernanda Lourenção Brighenti** pela dedicação que dispensaram em minha formação, por ensinar o exercício da Odontopediatria.

À **Prof^ª. Dr^ª. Lourdes dos Santos-Pinto**, pelo apoio durante esses anos de pós-graduação, obrigada pelo incentivo, pelas oportunidades oferecidas, pela amizade, por nos ensinar com suas experiências profissionais, e pelo tempo dispensado em valiosas discussões.

Aos professores da Disciplina de Histologia e Embriologia, **Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri, Prof^ª. Dr^ª. Estela Sasso Cerri, Prof. Dr. Breno Henrique Caneguim** por todo suporte e assistência prestados no desenvolvimento dessa pesquisa, pela amizade e convívio harmonioso.

As professoras da **Prof^ª. Dr^ª. Sato Alaluusua e a Prof^ª. Dr^ª. Carin Sahlberg**, agradeço o apoio para realização dessa pesquisa, a troca de experiência científica, a recepção e hospitalidade durante meu estágio na Universidade de Helsinque. Agradeço por esta oportunidade.

Aos Professores **Jayme A. Cury e Livia M. Tenuta**, da Universidade de Campinas, agradeço por ter aberto as portas do laboratório de Bioquímica realização desse estudo, dispor de técnicos e meios para a realização dos experimentos, pela colaboração nesse estudo.

Ao meus orientadores de iniciação científica, **Prof^ª. Dr^ª. Cinara Maria Camparis, Prof^ª. Dr^ª. Ana Lúcia Machado e Prof. Dr. Paulo Bolini**, agradeço por despertar em mim o interesse pela pesquisa, pelo incentivo para seguir a carreira acadêmica. À **Prof^ª. Dr^ª. Cinara**, agradeço a amizade, os conselhos, por acreditar em meu potencial.

Ao Grupo de Estudos da **Hipomineralização Molar-Incisivo, Prof^ª. Dr^ª. Lourdes dos Santos-Pinto, Prof^ª. Dr^ª. Rita de Cássia Loiola Cordeiro, Prof^ª. Dr^ª. Angela Cristina Cilense Zuanon, Cristiane Maria Costa Silva, Camila Bullio Fragelli, Fabiano Jeremias, Marco Aurélio Benini Paschoal, Manuel Restrepo**. Agradeço pela oportunidade do trabalho em equipe, juntos compartilhamos não apenas trabalhos científicos, trocamos experiência pessoais e profissionais, aprendemos muitos, e tudo isso foi fundamental para meu crescimento acadêmico e abriu portas para muitas oportunidades profissionais.

A vocês **Fabiano Jeremias, Camila Maria Fragelli, Manuel Restrepo, Diego Giroto e Marco Benini**, muito obrigado pela amizade fraternal e trabalho em equipe. Agradeço a convivência diária, pelo incentivo mútuo.

Aos amigos do Laboratório de Histologia e Embriologia **Priscila Oliveira, Breno Henrique Caneguim, Flávia Beltrame, Guilherme Ferreira da Silva, Rafael Ferino e Tiago Fonseca**, agradeço a amizade fraternal, incentivo mútuo, trabalho em equipe, a paciência em ensinar e pela convivência alegre, muito obrigada pela ajuda de vocês e carinho.

Aos queridos amigos da pós-graduação, curso de doutorado, **Débora Salles, Fabiano Jeremias, Marco Benini, Letícia Lemos, Marcia Tanaka, Sandra Palomiro e Marília Correia**, pela amizade, apoio, e pelo convívio agradável ao longo de todo esse período.

Às queridas **amigas, Gisele Amaral, Elcilaine Azevedo, Natália Aguiar, Sarah Sakima, Ana Livia Cornélio, Chaine Pavone, Guiga Alves e Hérica Ricci**, muito obrigada pelo apoio, companheirismo, carinho e por tornar meus dias mais agradáveis. À **Gisele**, muito obrigada por sua hospitalidade e apoio no período final do curso de doutorado. Amo vocês.

À **Marina Gramasco (aluno de graduação)**,

Agradeço imensamente sua participação nesse estudo, sua colaboração foi fundamental para realização desse trabalho. Agradeço por se dispor a me ajudar com os animais, independente do horário, tratando-os com carinho. Muito obrigada!

A **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP**, na pessoa de seu Magnífico Reitor **Prof. Dr. Julio Cezar Durigan** e Vice-Reitora, **Prof^a. Dr^a. Marilza Vieira Cunha Rudge**.

A **Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr**, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, na pessoa de seu Diretor **Prof^a. Dr^a. Andreia Affonso Barreto Montandon** e seu vice-Diretor **Prof^a. Dr^a. Elaine Maria Sgavioli Massucato**.

Ao **Departamento de Clínica Infantil** da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr, representado pelo chefe **Prof^a. Dr^a. Lídia Parsekian Martins** e pelo Vice-Chefe **Prof. Dr. Fábio Cesar Braga de Abreu e Lima**.

Ao **Departamento de Morfologia** da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr, representado pelo chefe **Prof^a. Dr^a. Ana Maria Minarelli Gaspar** e pelo Vice-Chefe **Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri**.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas** coordenado pelo **Prof. Dr. Osmir Batista de Oliveira Junior** (coordenador) e pela **Prof^a. Dr^a. Lídia Parsekian Martins** (vice-coordenadora).

Aos professores da Disciplina de Ortodontia, **Prof. Dr. Ary dos Santos-Pinto**, **Prof. Dr. Dirceu Barnabé Ravelli**, **Prof. Dr. João Roberto**

Gonçalves, Profª. Drª. Lídia Parsekian Martins, Prof. Dr. Luiz Gonzaga Gandini Junior e Prof. Dr. Maurício Tatsuei Sakima.

Aos **funcionários da Biblioteca** da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, **Adriano Ferreira Luiz, Ceres Maria Carvalho Galvão de Freitas, Maria Inês Carlos, Silvia Helena Acquarone Lavras**, por estarem sempre dispostos a nos ajudar. Em especial à **Maria Helena Matsumoto Komasti Leves**, pelo auxílio na formatação desse trabalho, e **Marley Cristina Chiusoli Montagnoli**, pela elaboração da ficha catalográfica.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Infantil, **Antônio Parciaseppe Cabrini, Dulce Helena de Oliveira, Sônia Maria Tircailo, Odete Amaral, Marcia Elena Carvalho Held, Cristina Ferreira Affonso, Pedro César Alves, Diego Cardoso Pendenza, Regina Aparecida Favarin e Tânia Ap. Moreira dos Santos**, pela assistência e atenção em todos esses anos de pós-graduação.

Aos funcionários da Disciplina de Histologia e Embriologia, **Luis Antônio Potenza e Pedro Sérgio Simões** por todo suporte e assistência prestados no desenvolvimento dessa pesquisa.

Aos funcionários da Seção de Pós-graduação, **Mara Candida Munhoz do Amaral, José Alexandre Garcia e Mauricio Fernando Pioto Casellato**, pelo apoio, atenção prestada, paciência e carinho que sempre me dispensaram.

A todos os meus **familiares**, agradeço a presença constante, os sábios conselhos, os momentos alegres, e por sempre torcer por minhas conquistas.

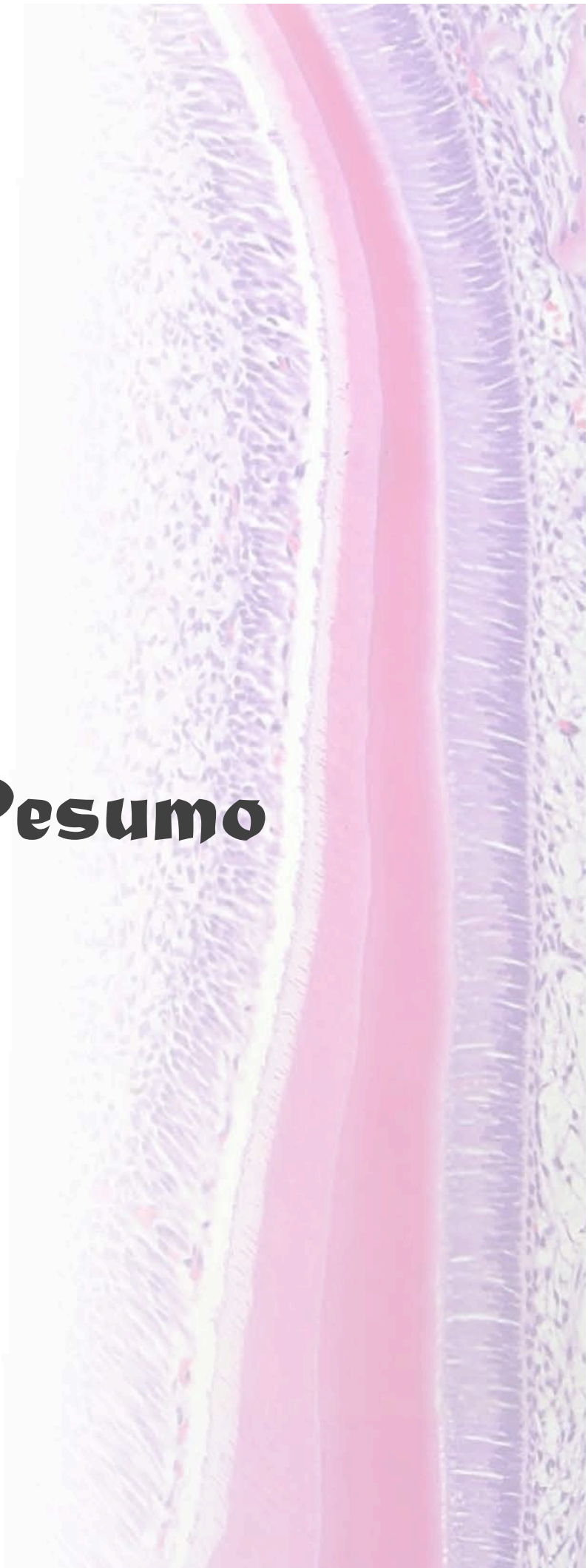
Aos colegas do curso de **pós-graduação em Ciências Odontológicas - Área Odontopediatria**, pelas experiências compartilhadas e pelo incentivo.

A **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo apoio financeiro fundamental para a realização e divulgação de todo o estudo.

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela bolsa concedida para realização desse curso de doutorado.

Muito obrigada a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

Resumo



Souza JF. Efeito da amoxicilina e do fluoreto no desenvolvimento do esmalte dentário de ratos [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2013.

Resumo

O uso da amoxicilina durante a primeira infância tem sido relacionado ao desenvolvimento de defeitos de esmalte denominados Hipomineralização Molar-Incisivo (HMI). Ademais, há relatos de possível potencialização dos efeitos do fluoreto no esmalte pela amoxicilina. **Objetivo:** A proposta do presente estudo foi avaliar o efeito da amoxicilina, e da associação amoxicilina com fluoreto no desenvolvimento do esmalte dentário de ratos. **Metodologia:** O experimento foi dividido em três capítulos. *Capítulo 1* - Quinze ratas prenhas (*Rattus norvegicus, albinus, Holtzman*) foram aleatoriamente distribuídas em três grupos que receberam, a cada 24 h, dose intragástrica de amoxicilina 100 mg/kg/dia (grupo GA100), amoxicilina 500 mg/kg/dia (grupo GA500) ou soro fisiológico (grupo GS), a partir do 13^o dia de prenhez. Após o nascimento, doze filhotes de cada grupo receberam o mesmo tratamento das respectivas mães durante os períodos de 7 dias (n=6) e 12 dias (n=6) de vida. Após a eutanásia, as cabeças dos ratos foram removidas, fixadas e processadas para inclusão em parafina. Os cortes frontais da cabeça exibindo os primeiros molares superiores foram em parte corados com H&E e em parte submetidos à reação imuno-histoquímica para detecção de amelogenina e metaloproteinasas da matriz-20 (MMP-20). Os cortes corados com H&E foram utilizados para análise morfológica e mensuração da espessura da camada de esmalte. A imunexpressão para amelogenina e MMP-20 foram avaliados por análise semi-quantitativa (H-score). Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste Tukey com nível de significância de 5%. *Capítulo 2* - Quinze ratas prenhas (*Rattus norvegicus, albinus, Holtzman*) foram aleatoriamente distribuídas em três grupos, que receberam, amoxicilina 100 mg/kg/dia (grupo GA100), amoxicilina 500 mg/kg/dia (grupo GA500) ou soro fisiológico (grupo GS), conforme descrito no capítulo 1. Após o nascimento, dez filhotes por grupo receberam o mesmo tratamento do 1^o ao 40^o dia de vida. Aos 40 dias, os animais sofreram eutanásia, os incisivos e molares foram extraídos, e submetidos às análises do conteúdo de cálcio, pelo método de titulação com EDTA, de fósforo por método colorimétrico usando espectrofotômetro. E a densidade eletrônica do esmalte nos

primeiros molares foi analisada pela tomografia micro-computadorizada (XRM).

Capítulo 3 - Quarenta ratos foram distribuídos, aleatoriamente, em quatro grupos, expostos ao fluoreto na água (100 ppm (mg F/L) ou à administração intragástrica de amoxicilina (500 mg/Kg peso), segundo as combinações: grupo controle (GS); grupo amoxicilina (GA), grupo fluoreto (GF) e grupo amoxicilina com fluoreto (GA+F). Após 60 dias, amostras de plasma e uma tibia foram coletados e analisados quanto a concentração de fluoreto por meio de eletrodo de íon seletivo. Os incisivos foram submetidos à quantificação do grau de fluorose (por um software de análise de imagens, *Dental fluorosis by Image Analysis – DFIA*), a análise de conteúdo de cálcio, pelo método de titulação com EDTA, de fósforo por método colorimétrico usando espectrofotômetro, e determinações da espessura do esmalte e de sua microdureza.

Resultados: *Capítulo 1* - Aos 7 dias, diversas estruturas vacuolares foram observadas na porção citoplasmática distal dos ameloblastos dos ratos dos grupos GA100 e GA500; além disso, a espessura do esmalte foi significativamente menor nos grupos GA100 e GA500 quando comparado ao GS ($p < 0,001$). Em contraposição, diferenças estatisticamente significantes não foram observadas entre os grupos no período de 12 dias ($p = 0,111$). Diferenças entre os grupos também não foram observadas na intensidade de imunomarcacão exibida pelos ameloblastos à anti-amelogenina ($p = 0,818$) e à anti-MMP-20 ($p = 0,855$).

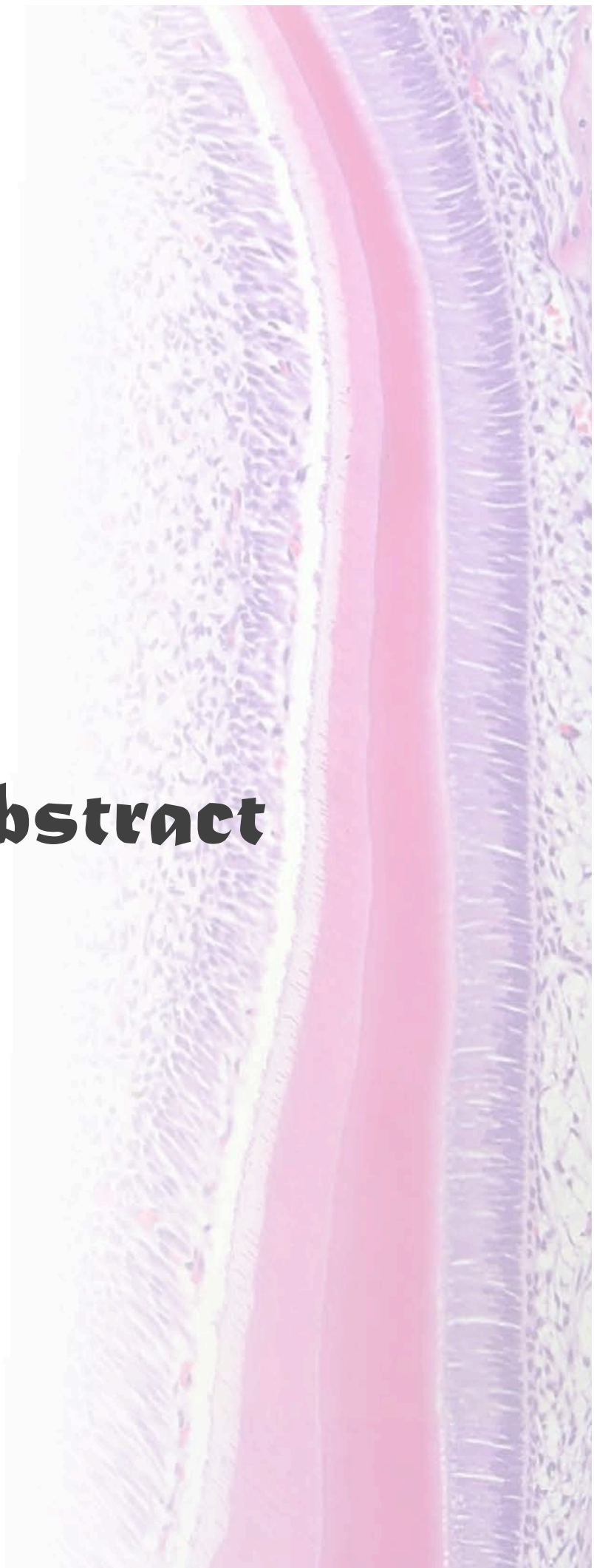
Capítulo 2 - Não foram observadas diferenças estatisticamente significante no conteúdo de cálcio ($p = 0,180$), fósforo ($p = 0,054$) e densidade eletrônica ($p = 0,150$) entre os grupos.

Capítulo 3 - Observou-se que a espessura do esmalte ($p = 0,228$) e a concentração de cálcio ($p = 0,592$) e fósforo ($p = 0,409$) nos incisivos não diferiram estatisticamente entre os grupos. No entanto, a concentração de fluoreto nos tecidos dentário, ósseo e plasma foi maior nos grupos expostos em GF e GA+F ($p < 0,001$). A análise fotográfica pelo índice DFIA e a microdureza mostraram diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,001$), sendo que GF apresentou maior severidade de hipomineralização do esmalte, seguido por GA+F e GA. Houve um aumento linear na dureza do esmalte quando nas profundidades de 10 μm a 30 μm , sendo esse aumento entre 4 a 5 KHN por μm de profundidade nos GA+F e GF, e entre a 7 a 8 KHN por μm nos grupos GA e GS. Os achados desse estudo mostraram que os animais expostos cronicamente ao fluoreto desenvolveram hipomineralização de esmalte, e a associação da amoxicilina não potencializou a severidade da

hipomineralização. **Conclusão:** *Capítulo 1* - Conclui-se que a amoxicilina pode provocar alterações durante a amelogênese, as alterações foram observadas no estágio secretor da matriz do esmalte, sugerindo atraso na aposição de matriz do esmalte. *Capítulo 2* - Conclui-se que a amoxicilina não influenciou o conteúdo mineral dos incisivos e molares de ratos. *Capítulo 3* - Concluimos que a amoxicilina não influenciou o desenvolvimento do esmalte, bem como não potencializou o efeito do fluoreto.

Palavras-Chave: Amelogênese, Amoxicilina, Fluoreto de sódio.

Abstract



Souza JF. Effect of amoxicillin and fluoride on enamel development in rat teeth [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2013.

Abstract

Background: Amoxicillin use in early childhood has been associated with molar-incisor hypomineralization. Moreover, it has been supposed an association between amoxicillin and fluoride on enamel defects. **Aim.** This study aimed to evaluate *in vivo* the effect of amoxicillin and amoxicillin associated with fluoride on the enamel development of rat tooth. **Materials and Methods:** The research was divided into three studies. *Chapter 1* – Fifteen pregnant Holtzman rats (*Rattus norvegicus albinus*) were divided randomly into three groups to receive saline (SG), 100 mg/kg/day amoxicillin (A100G), or 500 mg/kg/day amoxicillin (A500G), intragastrically, from days 13 to 22 of pregnancy. Twelve offsprings per group got the same dose until day 12. After 7 and 12 days, the specimens were fixed and embedded in paraffin. In the HE-stained sections, the thickness of enamel matrix of upper molar germs was evaluated. Moreover, detection of amelogenin on day 7 and matrix metalloproteinase 20 (MMP - 20) on day 12 by immunohistochemistry were carried out. *Chapter 2* - Fifteen rats (*Rattus norvegicus, Albinus, Holtzman*) were randomly divided into three groups to receive saline (SG), 100 mg/kg/day amoxicillin (A100G), or 500 mg/kg/day amoxicillin (A500G), as described in Chapter 1. Ten offspring per group received the same dose until day 40. The animals were euthanized on day 40. A total of 60 upper incisors and 60 upper first molars from 30 animals were dissected. Calcium (Ca) determination was performed by the compleximetric titration method and phosphorus (Pi) determination by colorimetric analysis using a spectrophotometer at 680 nm. A total of 30 lower first molars from 15 animals were analyzed under X-ray microtomography (XMT). *Chapter 3* - Forty rats were, randomly, divided into four groups exposed to fluoride in water (100 ppm (mg F/L) or intragastric administration of amoxicillin (500 mg /kg body weight), according to the combinations: control group (SG); amoxicillin group (AG), fluoride group (FG) and amoxicillin with fluoride group (A+FG.) After 60 days, the animals were euthanized. The concentrations of fluoride in the plasma, tibia and incisors of the rats were determined. The incisors were also analysed by the fluorosis severity (by software image analysis, Dental fluorosis by Image analysis - DFIA),

calcium content by compleximetric titration method and phosphorus content by colorimetric method, enamel thickness, and its hardness. **Results:** *Chapter 1* - A100G and A500G groups showed lower thickness of the enamel matrix than GS ($p < 0.001$) on day 7, but not on day 12 ($p = 0.111$). On day 7, the treated groups showed morphological changes in ameloblasts, represented by vacuoles. The amelogenin ($p = 0.818$) and MMP-20 ($p = 0.855$) immunostaining intensity did not differ among groups. *Chapter 2* - There were no statistically significant differences in Ca content ($p = 0.180$), Pi content ($p = 0.054$), or XMT electron density ($p = 0.150$) among the groups. *Chapter 3* - The thickness of the enamel ($p = 0.228$), Ca content ($p = 0.592$) and Pi content ($p = 0.409$) were not statistically different among the groups. However, the concentration of fluoride in the tooth, bone, and plasma was higher in the FG and A+FG ($p < 0.001$) than AG and SG. The DFIA index and microhardness showed significant differences among groups ($p < 0.001$), and FG presented greater severity hypomineralization enamel than SG, followed by A+FG and AG. The hardness increased linearly in the 10 μm a 30 μm depths, being from 4 to 5 KHN per mm in depth in the AG and A+FG, and from 7 to 8 KHN mm in depth in the AG and SG. The findings of this study showed that animals chronically exposed to fluoride developed enamel hypomineralization, and the association of amoxicillin had no role in the hypomineralization severity. **Conclusion:** *Chapter 1* - Amoxicillin can cause changes only during secretory stage, suggesting a delay in ameloblasts differentiation. *Chapter 2* – Amoxicillin did not affect the mineral content and electron density of rat teeth. *Chapter 3* – Amoxicillin did not influence the development of the enamel, and did not potentiate the effect of fluoride .

Key words: Amelogenesis, Amoxicillin, Sodium Fluoride.

Lista de Siglas, Símbolos e Abreviaturas

– Número

% – Porcentagem

° GL – Gay Lussac: quantidade em mililitros de álcool absoluto contida em 100 mililitros de mistura hidro-alcoólica.

< – Menor

> – Maior

BSA - Bovine Serum Albumins

Ca – Cálcio

CA – Coeficiente angular

CDTA – Ácido ciclohexilendinitrilo tetra acético

cm – Centímetro

cm³ ou cc – Centímetro cúbico

DFIA – Dental Fluorosis by Image Analysis

DP – Desvio padrão

E.U.A – Estados Unidos da América

EDTA – Ácido etilenodiamino tetracético dissódico

EP – Erro padrão

F – Fluoreto

g – Grama

h – Hora

H&E – Coloração com hematoxilina de Carazzi e eosina

KHN – Knoop Hardness Number

Kg – Quilograma

kV – Quilovolt

M – Molar

mA – Miliampere

mg – Miligrama

mL – Mililitro

nm – nanometro

°C – Grau Célsios

p – Probabilidade estatística

pH – potencial hidrogeniônico ou potencial de hidrogénio

Pi – Fósforo inorgânico

ppm – Parte por milhão

R – Coeficiente de correlação linear

s – Segundo

TISAB II – Total Ionic Strength Adjustment Buffer (tampão acetado a 1,0 M, pH 5,0 com NaCl a 1,0 M e 0,4% CDTA)

Tris- HCl – Solução tampão a base de tris(hidroximetil)aminometano e ácido clorídrico

µg – Micrograma

µm – Micrometro

µM – Micromolar

SUMÁRIO

1	Introdução	26
2	Proposição.....	32
3	Capítulo 1.....	34
4	Capítulo 2.....	60
5	Capítulo 3.....	77
6	Considerações finais.....	100
	Referências.....	102
	Anexos.....	106

1 Introdução



1 Introdução

A formação do esmalte dentário é regulada por uma sequência de interações indutivas e recíprocas entre células epiteliais e ectomesenquimais (Arana-Chaves et al.⁴, 2004; Smith et al.⁴¹, 1995; Thesleff et al.⁴⁹, 2001) sendo um processo dinâmico, no qual a biomineralização ocorre em uma matriz orgânica continuamente secretada, e orientada pelos ameloblastos, os quais apresentam múltiplas funções, atuando na síntese protéica, secreção, transporte iônico, e degradação das proteínas (Fincham et al.¹⁶, 1999; Kachburian, Arana²⁵, 2002; Nanci et al.³³, 1998; Smith et al.⁴¹, 1998).

Classicamente, o processo da amelogênese é dividido em vários estágios de atividade do ameloblasto, denominados pré-secreção, secreção e maturação (Nanci et al.³², 2008; Reith³⁷, 1970). Durante o estágio secretor, os ameloblastos tornam-se células, morfológicamente, cilíndricas, seus núcleos e mitocôndrias polarizam-se no sentido proximal, e a porção distal assume um aspecto cônico, o processo de Tomes. Nesse estágio ocorre a secreção e organização estrutural da matriz orgânica (Nanci et al.³², 2008; Smith et al.⁴¹, 1998) cujas principais constituintes são as amelogênicas, responsáveis pela formação da estrutura e espessura normal do esmalte dentário (Fincham et al.¹⁶, 1999; Nanci et al.³³, 1998). As proteínas ameloblastina e enamelinina representam cerca de 5% e 2%, respectivamente, promovem e guiam a formação dos cristais (Fincham et al.¹⁶, 1999; Smith et al.⁴¹, 1998). Uma vez que a espessura do esmalte se completa, os ameloblastos passam por um curto estágio de transição para o processo de maturação, no qual sofrem reorganização das organelas citoplasmáticas para o estágio de maturação. No estágio de maturação, os ameloblastos exibem diferentes características estruturais de acordo com sua atividade, alternando as bordas distais em superfícies lisas e pregueadas, permitindo a degradação da matriz proteica e aumento em largura dos cristais (Reith³⁷, 1970; Nanci³², 2008). Neste período, as enamelininas ou metaloproteinases da matriz-20 (MMP-20) são essenciais para o processamento pós-secretor e à degradação protéica, contribuindo para crescimento em largura dos cristais, e conseqüentemente, garantindo o aumento da dureza do esmalte (Simmer, Hu³⁹, 2002).

A amelogênese é geneticamente controlada, mas susceptível às influências de fatores sistêmicos, ambientais ou hereditários (Alaluusua¹, 2010; Suckling⁴⁶, 1989). Experimentos em animais mostram que várias substâncias como fluoreto, cobalto, chumbo, bifosfanatos, tetraciclinas entre outras podem alterar a amelogênese (Alaluusua¹, 2010; Alaluusua et al.², 1996; Leite et al.²⁸, 2011; Massa et al.³⁰; Neiman, Eisenman³⁴, 1975; Westergaard⁵³, 1980). Dentre as alterações na amelogênese, maior atenção tem sido dada ao atraso da secreção da matriz, alterações do processamento da matriz protéica, inibição da nucleação dos cristais, atraso na remoção da matriz, e maturação do esmalte (Aoba e Fejerskov³, 2002; Simmer e Hu³⁹, 2002; Suckling⁴⁶, 1989), culminando em defeitos permanentemente registrados no esmalte.

A cronologia de desenvolvimento dentário obedece a uma sequencia definida. Os primeiros molares permanentes iniciam seu desenvolvimento durante o quarto mês de gestação, e durante o primeiro ano de vida é completada a deposição de matriz de esmalte no terço oclusal da coroa, e assim, a maturação é iniciada (Alaluusua¹, 2010; Suga⁴⁷, 1989). A maturação é um longo processo, estendendo-se pelos três primeiros anos de vida da criança, tornando a estrutura do esmalte susceptível a influências de fatores externos. As características e a localização destas alterações podem fornecer indícios sobre o tempo e a natureza dos fatores etiológicos, os quais podem ser hereditários como na Amelogênese Imperfeita, adquiridos como na Fluorose dentária, e os de causa desconhecida como a Hipomineralização Molar-Incisivo (Alaluusua¹, 2010; Weerheijm⁴⁹, 2004; Weerheijm et al.⁵², 2001).

A presença de alta concentração do fluoreto durante a amelogênese pode interferir na formação do esmalte. Essa influência é dependente do tempo da exposição, concentração da dose e nível de fluoreto no plasma sanguíneo (Bronckers et al.¹⁷; Catani et al.¹¹, 2010). As hipóteses mais aceitas sobre a patogenia da Fluorose estão relacionadas à retenção de proteínas durante a fase de maturação da matriz do esmalte, à alteração na atividade proteolítica dessas proteínas, bem como às alterações no crescimento dos cristais. Conseqüentemente, a porosidade do

esmalte é aumentada, com subseqüentes mudanças ópticas e físicas da superfície do tecido (Bronckers et al.¹⁷, 2009). Clinicamente, a Fluorose é representada por opacidade branca que varia de finas estriações até esmalte inteiramente esbranquiçado com manchas escurecidas, e depressões (da Cunha et al.²², 2006).

Dentre os defeitos de esmalte, a Hipomineralização Molar-Incisivo (HMI) tem sido foco de investigações. O termo refere-se à hipomineralização que acomete assimetricamente, os primeiros molares permanentes e está associada, frequentemente, a defeitos em incisivos (Weerheijm et al.⁸⁷, 2001). Estudos epidemiológicos mostram dados de prevalência da HMI variando entre 2,8% a 44% em diversas partes do mundo (da Costa-Silva, et al.¹⁴, 2010; Jasulaityte et al.²³, 2007; Jeremias et al.²⁴, 2013; Soviero et al.⁴⁵, 2009; Weerheijm et al.⁵¹, 2001; Whatling e Fearné⁵⁴, 2008).

Macroscopicamente, o esmalte afetado pela HMI apresenta opacidades que variam do branco ao amarelo-acastanhado com bordas bem definidas com o esmalte normal. Em casos mais severos, há perda da estrutura logo após a erupção dentária, deixando a dentina desprotegida, o que resulta em sensibilidade e em rápido desenvolvimento de lesões cáries (Jalevik, Klingberg²⁰, 2012; Jeremias et al.²⁴, 2013; Souza et al.⁴³, 2011; Weerheijm⁴⁹, 2004). Esses dentes apresentam necessidade de frequente retratamentos devido à deficiente adesão aos materiais restauradores no esmalte alterado (Alaluusua¹, 2010; Balmer et al.⁶, 2005; Cho et al.¹², 2008; Jalevik et al.²¹, 2001; Leppaniemi et al.²⁹, 2001; Muratbegovic et al.³¹, 2007; Preusser et al.³⁵, 2007; Weerheijm et al.⁵⁰, 2003).

Não há dados conclusivos sobre a etiologia da HMI. A assimetria dessa alteração sugere que os ameloblastos sejam afetados por fatores sistêmicos ou ambientais durante a amelogênese (Alaluusua¹, 2010; Souza et al.⁴², 2012). Dentre as causas consideradas, a literatura relata problemas respiratórios, complicações no período pré-natal, baixo peso ao nascimento, desordem metabólica de cálcio e fosfato, uso de amoxicilina, bem como doenças de infância associadas à febre alta

(Alaluusua¹, 2010; Arrow et al.⁵, 2009; Crombie et al.¹³, 2008; Jalevik et al.²², 2000; Souza et al.⁴², 2012; Souza et al.⁴⁴, 2013; Whatling, Fearne⁵⁴, 2008).

O uso da amoxicilina durante a primeira infância tem sido associado aos defeitos de esmalte (Hong et al.¹⁷, 2004; Hong et al.¹⁸, 2005; Hong et al.¹⁹, 2011; Laisi et al.²⁷, 2009; Sahlberg et al.³⁸, 2013; Souza et al.⁴², 2012; Whatling, Fearne⁵⁴, 2008). Souza et al.⁷⁴ (2012); Laisi et al.⁵⁰ (2009); Whatling, Fearne⁸⁹ (2008) observaram, em estudos retrospectivos, que crianças portadoras de HMI usavam amoxicilina com mais frequência do que crianças sem HMI. Laisi et al.⁵⁰ (2009) observaram, em cultura de ameloblastos, que a alta concentração do medicamento resultou em alteração nos padrões de amelogênese. Kumazawa et al.⁴⁸ (2012) observaram in vivo alteração na mineralização dentinária após a exposição à alta concentração de amoxicilina.

Ademais, estudos mostram que o uso de amoxicilina associado ao fluoreto tem aumentado o risco aos defeitos de esmalte (Hong et al.¹⁷, 2004; Hong et al.¹⁸, 2011; Hong et al.¹⁹, 2005). Em cultura de germes, Sahlberg et al.⁶⁵ (2013) observaram que a exposição à altas doses de amoxicilina potencializou o efeito da exposição ao fluoreto, resultando em alterações morfológicas nos ameloblastos e diminuição da matriz do esmalte. Em estudo coorte prospectivo, Hong et al.³⁶ (2011) acompanharam 357 crianças expostas ao fluoreto, a partir do nascimento até 13 anos de idade, e observaram que o uso da amoxicilina durante os 20-24 primeiros meses de vida aumentou significativamente o risco aos defeitos de esmalte.

A amoxicilina é uma penicilina semi-sintética e pertence à classe das aminopenicilinas, apresenta amplo espectro de ação, sendo o antibiótico de primeira escolha no tratamento de infecções na primeira infância (Bergus et al.⁷, 1996; Bergus et al.⁸, 2001). Sua absorção pelo trato gastrointestinal atinge 75 a 90% da dose oral, sendo amplamente distribuída nos líquidos corporais, como saliva, leite, e placenta (Rang et al.⁶², 2011).

O efeito crônico do fluoreto no desenvolvimento de fluorose dental é conhecido, porém o papel de outros agentes com possível efeito na amelogênese, como a amoxicilina, não tem sido estudado in vivo. Embora tem sido sugerido que a

amoxicilina possa potencializar o efeito do fluoreto no desenvolvimento do esmalte, ainda não há estudos conclusivos. Diante do exposto, torna-se oportuno investigar o efeito da amoxicilina e da associação amoxicilina com fluoreto no desenvolvimento do esmalte dentário de ratos, em doses estimadas para o metabolismo do animal, que simulam a exposição clínica a essas substâncias.

2 Proposição



2 Proposição

A proposição do estudo foi avaliar o efeito da amoxicilina e da associação amoxicilina e fluoreto no desenvolvimento do esmalte dentário de ratos, assim como na estrutura do esmalte. Para isso, foram realizadas três pesquisas científicas, intituladas como:

Capítulo I. Imunoexpressão para amelogenina e MMP-20 durante a amelogênese de molares de ratos expostos à amoxicilina

Capítulo II. Efeito da amoxicilina nas propriedades físico-químicas do esmalte dentário de ratos

Capítulo III. Efeito da amoxicilina associada ao fluoreto na estrutura dentária de ratos

3 Capítulo 1



Imunoexpressão para amelogenina e MMP-20 durante a amelogênese de molares de ratos expostos à amoxicilina

Souza JF^a, Gramasco M^a, Cerri PS^b, Jeremias F^a, Santos-Pinto L^a, Cordeiro RCL^a

^aDepartamento de Clínica Infantil, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Araraquara, SP, Brasil

^bDepartamento de Morfologia, Laboratório de Histologia e Embriologia, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Araraquara, SP, Brasil

Correspondência:

Rita de Cássia Loiola Cordeiro
Departamento de Clínica Infantil
Faculdade de Odontologia de Araraquara
Universidade Estadual Paulista- UNESP
Rua Humaitá, 1680
Telefone: 55(016) 33016331
Araraquara, São Paulo, Brasil
CEP: 14801-903
e-mail: ritacord@foar.unesp.br

*De acordo com as normas do periódico *Archives of Oral Biology*

Resumo

O uso da amoxicilina durante a primeira infância tem sido relacionado ao desenvolvimento de defeitos de esmalte denominados Hipomineralização Molar-Incisivo (HMI). Porém, não há evidência *in vivo* sobre o possível efeito desse fármaco na amelogênese. **Objetivo:** A proposta do presente estudo foi avaliar o desenvolvimento do esmalte dentário de ratos tratados com amoxicilina. **Material e Método:** Quinze ratas prenhas (*Rattus norvegicus, albinus, Holtzman*) foram aleatoriamente distribuídas em três grupos que receberam, a cada 24 h, dose intragástrica de amoxicilina 100 mg/kg/dia (grupo GA100), amoxicilina 500 mg/kg/dia (grupo GA500) ou soro fisiológico (grupo GS), diariamente, a partir do 13^o dia de prenhez. Após o nascimento, doze filhotes de cada grupo receberam o mesmo tratamento das respectivas mães durante os períodos de 7 dias (n=6) e 12 dias (n=6) de vida. Após a eutanásia, as cabeças dos ratos foram removidas, fixadas e processadas para inclusão em parafina. Cortes frontais da cabeça exibindo os primeiros molares superiores foram corados com H&E e submetidos à reação imunohistoquímica para detecção de amelogenina e metaloproteinases da matriz-20 (MMP-20). Os cortes corados com H&E foram utilizados para análise morfológica e mensuração da espessura da camada de esmalte. A imunexpressão para amelogenina e MMP-20 foram avaliados por análise semi-quantitativa (H-score). Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste Tukey com nível de significância de 5%. **Resultados:** Aos 7 dias, diversas estruturas vacuolares foram observadas na porção citoplasmática distal dos ameloblastos dos ratos dos grupos GA100 e GA500; além disso, a espessura do esmalte foi significativamente menor nos grupos GA100 e GA500 quando comparado ao GS ($p < 0,001$). Em contraposição, diferenças estatisticamente significantes não foram observadas entre os grupos no período de 12 dias ($p = 0,111$). Diferenças entre os grupos também não foram observadas na intensidade de imunomarcagem exibida pelos ameloblastos à anti-amelogenina ($p = 0,818$) e à anti-MMP-20 ($p = 0,855$). **Conclusão:** Nossos resultados sugerem que a amoxicilina possivelmente atrasou a indução e/ou a diferenciação dos ameloblastos explicando, pelo menos em parte, a significativa redução na espessura do esmalte observada aos 7 dias.

Palavras-Chave: Proteínas do esmalte dentário, Amelogênese, Amoxicilina, Hipoplasia do esmalte dentário.

Introdução

A formação do esmalte dentário é regulada por uma sequência de interações indutivas e recíprocas entre células epiteliais e ectomesenquimais^{73, 82}. Durante a amelogenese, a biomineralização ocorre em uma matriz orgânica secretada pelos ameloblastos, os quais apresentam múltiplas funções, atuando na síntese protéica, secreção, transporte iônico e degradação protéica^{30, 70}. Assim, o ameloblasto exibe diferentes características morfológicas de acordo com sua atividade funcional, sendo reconhecidos cinco estágios distintos: morfogenético, diferenciação, secretor, maturação e protetor^{45, 63}. Durante o estágio secretor, os ameloblastos pré-secretor tornam-se células cilíndricas, seus núcleos e mitocôndrias polarizam-se no sentido proximal, e a porção distal assume um aspecto cônico, o processo de Tomes; nesse estágio ocorre a secreção e organização estrutural da matriz orgânica do esmalte. Uma vez que a espessura do esmalte se completa, os ameloblastos passam por um curto estágio de transição para o processo de maturação, nesse estágio os ameloblastos sofrem reorganização das organelas citoplasmáticas para o estágio de maturação. No estágio de maturação, os ameloblastos sofrem diferenciação e atividade de modulação, alternando as bordas distais em superfícies rugosas e lisas, atuando, respectivamente, na degradação da matriz proteica e no transporte de íons para a matriz, culminando no aumento do conteúdo mineral^{59, 63}.

As amelogeninas que representam mais de 90% do total de proteínas no esmalte são consideradas críticas para a formação da estrutura do esmalte dentário, requeridas para compor um arcabouço para a deposição do fosfato de cálcio e formação dos cristais de hidroxiapatita; além disso, tem sido atribuído a essa proteína um papel modulador no crescimento da estrutura dos cristais do esmalte^{30, 31}. Além das amelogeninas, ameloblastina e enamulina representam, respectivamente, cerca de 5 % e 2 % das proteínas do esmalte, têm sido também associadas com a formação dos cristais do esmalte⁶⁸. As enamelinases ou metaloproteinases da matriz-20 (MMP-20) são essenciais para o processamento pós-secretor e à degradação protéica durante o período de maturação do esmalte, contribuindo para crescimento em

largura dos cristais, e conseqüentemente, garantindo o aumento da dureza do esmalte⁶⁸.

A amelogênese é geneticamente controlada, mas susceptível às influências de fatores sistêmicos, ambientais, locais e mecânicos. Dentre os defeitos de esmalte, a Hipomineralização Molar-Incisivo (HMI) refere-se à hipomineralização que acomete, assimetricamente, os primeiros molares permanentes e está associada, frequentemente, a defeitos em incisivos⁸⁷. Estudos epidemiológicos mostram dados de prevalência da HMI que varia entre 2,8% a 44% em diversas partes do mundo^{21, 43, 44, 77, 89}.

O esmalte afetado pela HMI apresenta opacidades que variam do branco ao amarelo-acastanhado com bordas bem definidas do esmalte normal. Em casos mais severos, há perda da estrutura do esmalte logo após a erupção dentária, favorecendo a sensibilidade e o rápido desenvolvimento de lesões cárias^{40, 44, 75, 84}. A assimetria dessa alteração sugere que os ameloblastos sejam afetados por fatores sistêmicos ou ambientais durante a amelogênese^{2, 4}. Dentre as possíveis causas consideradas, estão os problemas respiratórios, complicações no período pré-natal, baixo peso ao nascimento, desordem metabólica de cálcio e fosfato, bem como, doenças de infância associadas à febre alta^{2, 9, 20, 41, 74, 76, 89}.

A amoxicilina quando administrada na primeira infância tem sido associado aos defeitos de esmalte principalmente, à Hipomineralização Molar-Incisivo^{35-37, 50, 65, 74, 89}. A amoxicilina é uma penicilina semi-sintética e pertence à classe das aminopenicilinas, apresenta amplo espectro de ação, sendo o antibiótico de primeira escolha no tratamento de infecções na primeira infância^{14, 15}. Sua absorção pelo trato gastrointestinal atinge 75 a 90% da dose oral, é amplamente distribuída nos líquidos corporais, como saliva, leite e placenta⁶². Estudos in vitro têm demonstrado que altas concentrações de amoxicilina causam alterações nos padrões de amelogênese^{50, 65}. Além disso, alterações na mineralização da dentina foram observadas em ratos tratados com amoxicilina⁴⁸.

Assim, não há estudos in vivo que descrevam os efeitos da exposição crônica da amoxicilina no desenvolvimento do esmalte de ratos. Diante do exposto, o

propósito do presente estudo foi investigar se a amoxicilina interfere na estrutura dos ameloblastos, bem como na imunexpressão das proteínas amelogeninas e MMP-20, proteínas que exercem um papel importante na secreção e maturação do esmalte, em molares de ratos.

Material e Método

Animais

O presente estudo foi submetido a Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia – FOAr-UNESP (CEUA – Proc. nº 34/2010) que aprovou a sua realização.

Foram utilizadas 15 ratas (*Rattus norvegicus, albinus, Holtzman*), com 2-3 meses de idade, pesando aproximadamente 250 g. As ratas foram mantidas no biotério da FOAr com temperatura ($23\pm 1^{\circ}\text{C}$) e umidade relativa ($55\pm 5\%$) controladas, iluminação artificial por lâmpada fluorescente com foto períodos de 12h claro e 12 h escuro, com ração granulada e água *ad libitum*.

Após 5 dias de adaptação, as ratas foram colocadas para o acasalamento ao final da tarde, após aproximadamente 12 h, realizou-se o lavado vaginal para verificar se espermatozoides estavam presentes e, dessa maneira, comprovação da prenhez (dia zero). O lavado aspirado foi analisado em microscópio de luz à fresco e após coloração pelo método de Shorr, de acordo com Marcondes et al.⁵⁷ (2002).

Procedimentos experimentais

As ratas prenhas foram colocadas em gaiolas individuais de polipropileno e distribuídas aleatoriamente em 3 grupos, com 5 ratas cada. Os grupos foram identificados e receberam por via intragástrica (gavagem), diariamente:

Grupo sham (GS) – soro fisiológico estéril, em volume correspondente ao administrado aos grupos GA500 e GA100.

Grupo A100 (GA100) – amoxicilina (Eurofarma genéricos, São Paulo, SP, Brasil) na concentração de 100 mg/kg de peso corpóreo.

Grupo A500 (GA500) – amoxicilina na concentração de 500mg/kg de peso corpóreo.

Os tratamentos seguiram a partir do 13º dia até o 22º dia de prenhez. Após o nascimento, os filhotes de cada prole, a partir do 1º dia até o 12º dia de idade receberam o mesmo tratamento das respectivas mães. A administração de amoxicilina a partir do 13º dia de prenhez foi realizada, pois este corresponde ao início de formação de germe do primeiro molar de ratos; enquanto que no 12º dia de idade, correspondente ao estágio de mineralização e maturação do esmalte do primeiro molar⁶⁶, os quais estão em fase eruptiva de penetração de mucosa¹⁹.

Após 7 e 12 dias, 6 ratos de cada grupo para cada período experimental sofreram eutanásia com sobredose de Cloridrato de Cetamina a 10% (Cetamin®- Syntec do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) associado ao Cloridrato de Xilazina a 2% (Xilazin®- Syntec do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil). Após a eutanásia, os ratos foram decapitados e as cabeças, imediatamente, imersas na solução fixadora.

Processamento Histológico

As cabeças dos ratos com 7 e 12 dias de idade foram imediatamente mergulhadas em solução de 4% de formaldeído (preparado a partir do paraformaldeído) tamponada com 0,1M de fosfato de sódio e pH ajustado em 7,2. Após 48 h de fixação, as cabeças foram descalcificadas em solução a 7% de EDTA (ácido etilendiamino tetracético dissódico), contendo 0,5% de formaldeído, e tamponada com fosfato de sódio 0,1 M e pH ajustado para 7,2; os espécimes permaneceram na solução de EDTA por 3 a 7 dias, dependendo do estágio do desenvolvimento dos germes dentários. Subsequentemente, os espécimes foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, a partir da solução 30º GL, até o etanol absoluto, diafanizados em xilol e, após a infiltração em parafina a 58-60°C, foram incluídos em parafina, de maneira a possibilitar a obtenção de cortes frontais.

Cortes seriados com 5µm de espessura foram obtidos com auxílio de um micrótomo (Thermo Microm, modelo HM 325, Massachusetts, EUA) com navalhas de aço descartáveis (Leica 818, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). Foram obtidos, aproximadamente, 60 cortes de cada cabeça contendo a porção central dos germes dos primeiros molares superiores. Os cortes foram obtidos paralelamente ao longo eixo dos molares em desenvolvimento. Três cortes foram aderidos a cada lâmina de vidro, totalizando cerca de 20 lâminas. Alguns cortes foram corados com hematoxilina de Carazzi/eosina (H&E) e alguns aderidos a lâminas silanizadas foram submetidos às reações imuno-histoquímicas.

Análise Morfológica e mensuração da espessura do esmalte

Os cortes corados com H&E foram utilizados para a análise morfológica, onde os seguintes parâmetros foram observados: estágio de desenvolvimento dos germes de primeiros molares superiores, espessura da matriz do esmalte, arranjo e morfologia dos ameloblastos.

A fim de avaliar se a amoxicilina promove alguma alteração na secreção dos ameloblastos, a espessura do esmalte dos germes de primeiros molares superiores em desenvolvimento nos períodos de 7 e 12 dias de idade foi mensurada, com o auxílio de um microscópio de luz (BX51, Olympus, Tóquio, Japão) e um sistema de análise de imagens (Image Pro-Express 6.0, Olympus, Tóquio, Japão). Com a objetiva de 40x, imagens da região de ponta de cúspide dos molares foram capturadas com auxílio de uma câmera digital (Olympus DP-71, Tóquio, Japão) acoplada ao microscópio. Foram selecionados 3 cortes, com intervalo mínimo de 60 µm, dos germes dentários dos primeiros molares superiores dos 6 ratos de cada grupo, nos períodos de 7 e 12 dias de idade. Com auxílio do sistema de análise de imagem, a distância entre o limite amelo-dentinário e a porção distal da camada de ameloblastos foi mensurada; em cada corte, realizou-se 3 medidas obtendo-se, portanto, uma média por corte. Após a medida dos 3 cortes de cada germe dentário obteve-se uma média para cada animal.

Deteção imuno-histoquímica de amelogenina e metaloproteinase da matriz-20 (MMP-20)

Considerando os estágios de formação e mineralização do esmalte, a detecção de amelogenina foi avaliada nos germes dentários dos ratos de 7 dias, enquanto que a detecção de MMP-20 foi avaliada nos germes dentários dos ratos de 12 dias de idade, em todos os grupos.

Após a desparafinização e hidratação, os cortes foram mergulhados em tampão citrato de sódio 0,001M (pH 6,0) e submetidos, durante 30 minutos, ao tratamento no microondas à temperatura de 90-94°C, para recuperação antigênica. Após o resfriamento e inativação da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 5%, os cortes foram incubados com o anticorpo primário anti-amelogenina (Abcam, Califórnia, EUA) de camundongo produzido em coelho diluído em BSA (titulação 1:500) ou incubados com anti-MMP-20 de rato produzido em coelho (Rheabiotech, São Paulo, Brasil) diluído em BSA (titulação 1:500) durante 16 h, à temperatura de 4°C. Subseqüentemente às lavagens com tampão TRIS-HCl 0,05M (pH 7,2), os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotilado anti-IgG de camundongo/rato/cabra biotilado (Kit Dako LSAB+ System-HRP, Dako, Califórnia, EUA) por 30 minutos, a temperatura ambiente. Após lavagem em tampão Tris-HCl, os cortes foram incubados com o complexo estreptavidina-peroxidase durante 30 minutos. Subseqüentemente as lavagens, a atividade da peroxidase foi revelada com solução de 3.3-diaminobenzidina (Betazoid DAB Chromogen Kit – Biocare Medical, Califórnia, EUA) durante 2-3 minutos; os cortes foram então contracorados com hematoxilina de Carazzi e montados em meio resinoso (Permound, Fisher Scientific, Nova Jersey, EUA). No controle negativo, os anticorpos primários (anti-amelogenina e anti-MMP-20) foram omitidos; nesta etapa, os cortes foram incubados com soro não imune.

A fim de verificar possíveis diferenças no padrão da imunoexpressão de amelogenina e MMP-20 pelos ameloblastos, realizou-se uma análise quantitativa considerando a intensidade da imunomarcção. Em cada animal, foram utilizados

quatro cortes, com distância mínima de 60 µm, submetidos as reações para detecção de amelogenina e MMP-20.

A análise da intensidade de marcação nos ameloblastos pela anti-amelogenina foi realizada em duas regiões: a região do terço cervical da face vestibular e/ou palatina da coroa do germe dentário e a região de cúspide. Na análise da intensidade de marcação dos ameloblastos para MMP-20, considerou-se 3 regiões distintas: região de cúspide, regiões média e cervical das face vestibular e/ou palatina da coroa do germe dentário.

A intensidade de marcação das proteínas foi categorizada, em cada região, em escores (1) fraco, (2) moderado e (3) forte; esta análise foi realizada por um examinador calibrado (kappa 0,80). Análise semi-quantitativa foi realizada utilizando o H-score, $\sum P_i(i+1)$, onde i representa a intensidade da marcação (1, 2 ou 3) e P_i é a porcentagem das áreas marcadas em cada categoria³³.

Tratamento estatístico dos dados

As avaliações dos três grupos experimentais deste estudo, quanto a espessura da matriz do esmalte, escores de intensidade de marcação de amelogenina e escores de intensidade de marcação de MMP-20 foram realizadas por análises de variância. Essas análises foram complementadas por comparações múltiplas pelo teste de Tukey, por meio do software Statistica versão 8.0 (StatSoft Inc, Oklahoma, EUA). Adotou-se o nível de significância de 5% para a tomada de decisão.

Resultados

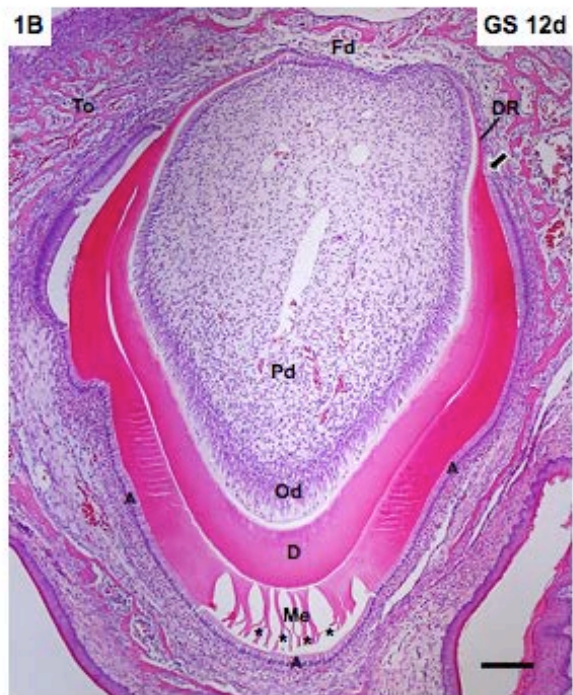
Análises Morfológica e Morfométrica

Os cortes frontais das cabeças de ratos com 7 dias revelaram os germes dentários dos primeiros molares superiores contendo camadas de matriz de dentina e matriz de esmalte em formação por quase toda a extensão da coroa dentária; as camadas de dentina e esmalte apresentaram-se evidentemente mais espessadas nas

pontas de cúspides dos molares (Fig. 1A). Os ameloblastos, exibindo formato cilíndrico e núcleo situado na porção proximal do citoplasma, dispunham-se em uma camada única de células adjacentes à superfície da matriz do esmalte (Figs. 1A, 2C e 3A). A papila dentária em diferenciação exibiu odontoblastos na sua periferia, justapostos à superfície da matriz orgânica de dentina, ou seja, à pré-dentina. Na porção cervical da coroa dentária em formação, o esmalte estava representado por uma delgada camada de matriz orgânica justaposta à camada de matriz de dentina. Em continuidade aos ameloblastos, os epitélios interno e externo do órgão epitelial do esmalte estendiam-se constituindo a alça cervical e delimitando, parcialmente, a papila dentária (Fig. 1A). Aos 7 dias, os germes dentários de ratos tratados com amoxicilina (GA100 e GA500) mostraram características gerais semelhantes às descritas para o grupo controle. No entanto, nos animais dos grupos GA100 e GA500, a camada do esmalte estava, aparentemente, delgada em relação aos molares do grupo controle (Figs. 2A-2E). Além disso, estruturas com aspecto semelhante ao de vacúolos foram, frequentemente, observadas na porção proximal do citoplasma dos ameloblastos dos molares dos animais tratados com amoxicilina (Figs. 3B e 3C).

Aos 12 dias, os germes dos primeiros molares dos grupos controle e amoxicilina (GA100 e GA500) apresentaram um evidente espessamento das camadas de esmalte e dentina em comparação aos germes dentários dos ratos de 7 dias (Compare a Fig. 1A com a Fig. 1B e Figs. 2F-2J com Figs. 2A-2E). Neste período, o início da formação da dentina radicular, constituída por uma camada delgada de matriz orgânica, foi observado nos germes dos molares (Figs. 1B, 2F e 2G). Os ameloblastos revestindo o esmalte dentário apresentaram formato cúbico evidenciando, portanto, uma redução no seu tamanho. Além disso, nas pontas de cúspides dos molares foi possível observar somente remanescentes da matriz acidófila do esmalte, preenchendo o espaço delimitado pela camada de ameloblastos (Figs. 1B e 2H-2J). A camada do esmalte apresentou espessura, aparentemente, semelhante nos animais dos grupos controle e tratados com amoxicilina (Figs. 2H-2J).

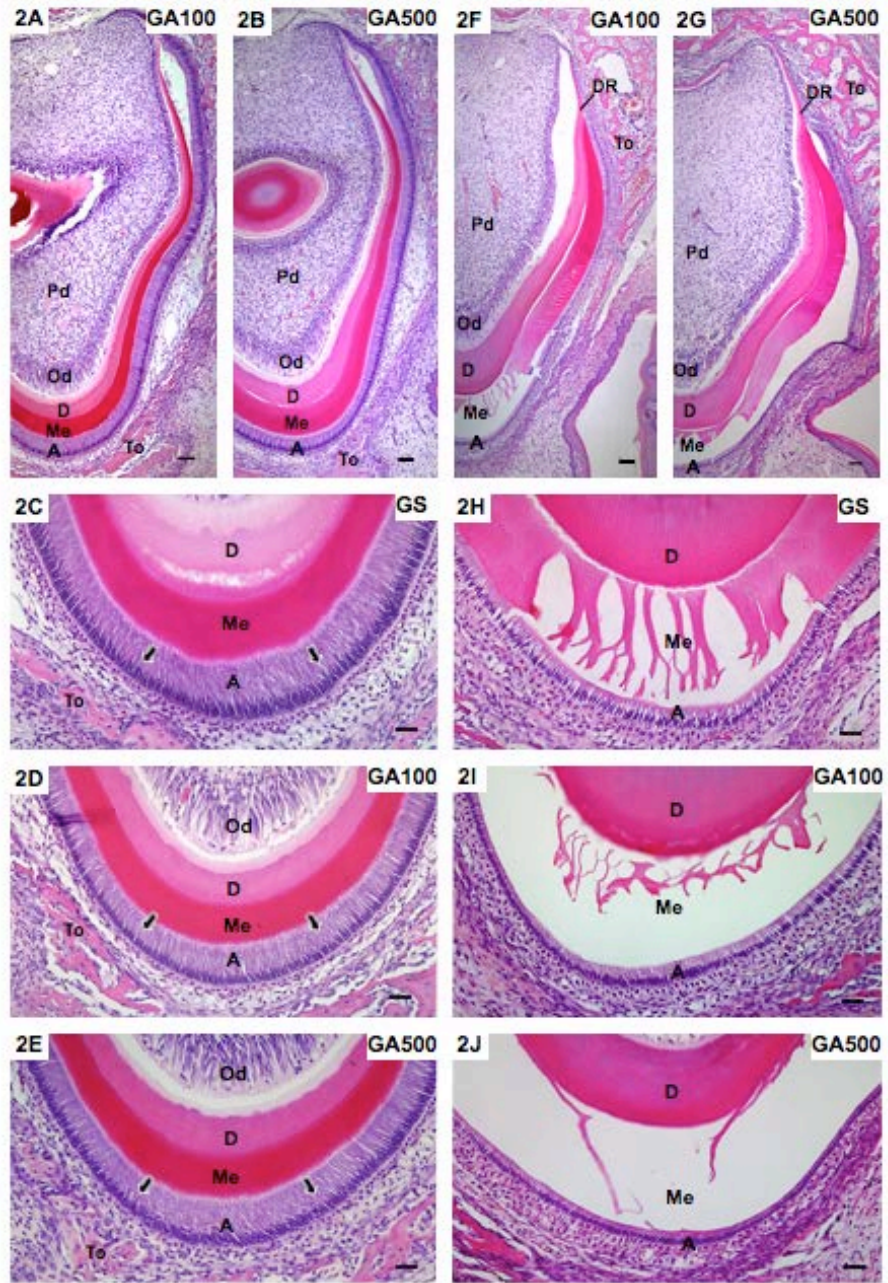
Figuras 1A e 1B – Fotomicrografias de cortes frontais de cabeça de ratos mostrando germes dentários de 1º molar superior de ratos com 7 (**1A**) e 12 (**1B**) dias do grupo controle (GS). **Fig. 1A** – germe dentário em fase de formação de coroa exibe uma camada de matriz orgânica do esmalte (Me) por toda extensão do órgão epitelial do esmalte (OE); uma contínua camada de ameloblastos (A) cilíndricos e polarizados são observados em íntima justaposição à matriz do esmalte (Me). Odontoblastos (Od) são observados na periferia da papila dentária em diferenciação (Pd), adjacentes à superfície da dentina (D). Ac, alça cervical; Fd, folículo dentário; To, trabéculas ósseas. Barra: 150 µm **Fig. 1B** – germe dentário em fase de formação de raiz. Uma contínua camada de ameloblastos (A) exibindo formato cúbico reveste a camada de espessura variável do esmalte (Me); note na porção mais cervical da coroa, o término do esmalte (seta) e início da formação da dentina radicular (DR). Na região de cúspide (asteriscos), o espaço do esmalte apresenta-se parcialmente preenchido com a matriz do esmalte (Me). D, dentina; Od, camada de odontoblastos; Pd, papila dentária em desenvolvimento; Fd, folículo dentário; To, trabéculas ósseas. Barra: 150 µm.



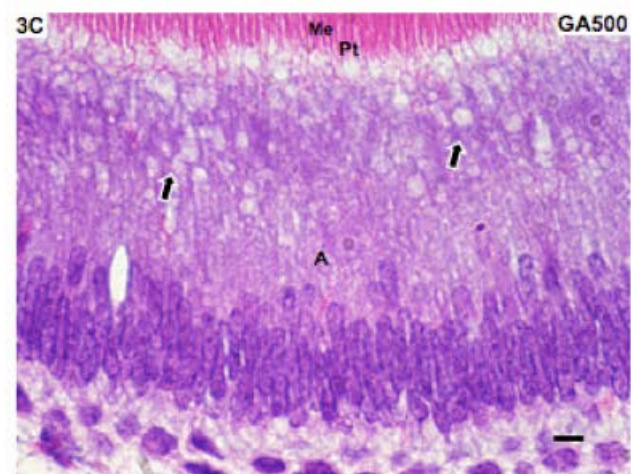
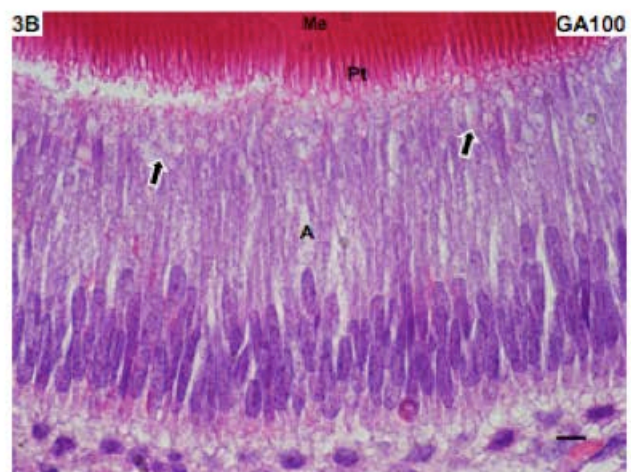
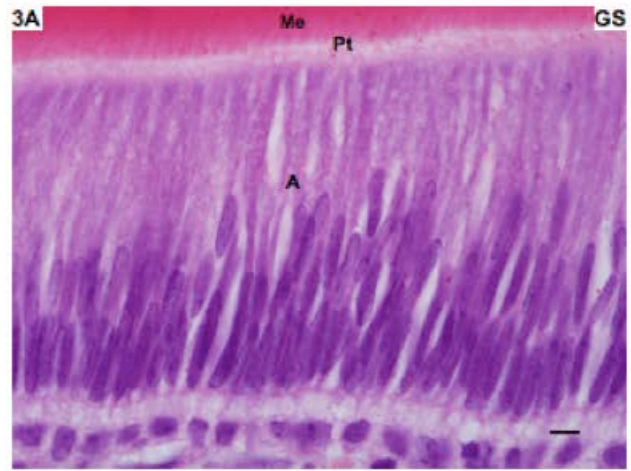
Figuras 2A-2J – Fotomicrografias de cortes frontais de cabeça de ratos mostrando germes dentários de 1º molar superior de ratos com 7 (**2A-2E**) e 12 (**2F-2J**) dias tratados com solução fisiológica (GS), 100 mg (GA100) ou 500 mg (GA500) de amoxicilina. **Figuras 2A (GA100) e 2B (GA500)** – germes dentários em fase de formação de coroa (ratos de 7 dias). Uma camada contínua de ameloblastos (A), exibindo formato cilíndrico, reveste a superfície da matriz do esmalte (Me). Na periferia da papila dentária em diferenciação (Pd) são observados odontoblastos (Od) adjacente à superfície da dentina em formação (D). To, trabéculas ósseas. Barra: 60µm. **Figuras 2C (GS), 2D (GA100) e 2E (GA500)** – Detalhe da região de cúspide de molares de ratos com 7 dias, mostrando ameloblastos (A) com formato cilíndrico e núcleo situado no porção citoplasmática proximal da célula (setas). A espessura da matriz do esmalte (Me) apresenta-se reduzida nas cúspides dos molares dos grupos GA100 (Fig. 2D) e GA500 (Fig. 2E) em comparação ao grupo GS (Fig. 2C). Od, odontoblastos; To, trabéculas ósseas. Barra: 30 µm.

Figuras 2F (GA100) e 2G (GA500) – germes dentários de ratos de 12 dias apresentando o 1º molar em fase de formação de raiz. A matriz do esmalte (Me) com espessura variável nas diferentes regiões da coroa apresenta-se revestida por ameloblastos de formato cúbico (A). Uma camada fina de dentina em formação é observada no terço cervical da raiz (DR). Od, odontoblastos na periferia da papila dentária em diferenciação (Pd). Barra: 60 µm.

Figuras 2H (GS), 2I (GA100) e 2J (GA500) – Detalhe da região de cúspide de molares de ratos com 12 dias, mostrando o espaço do esmalte com remanescentes da matriz do esmalte (Me). Os ameloblastos (A) com formato cúbico delimitam o espaço do esmalte. Barra: 30 µm.



Figuras 3A-3C – Fotomicrografias mostrando ameloblastos (A) na região de cúspide aos 7 dias. **Figs. 3A (GS), 3B (GA100) e 3C (GA500)** – ameloblastos (A) com formato cilíndrico e núcleos situados na porção citoplasmática proximal. Estruturas esféricas com tamanho variado com aspecto semelhante a vacúolos (setas) são observadas na porção citoplasmática distal dos ameloblastos (A) nos germes dentários dos ratos tratados com amoxicilina (Figs. 3B e 3C). Me, matriz do esmalte; PT, processo de Tomes. Barra: 6 μ m.



A análise quantitativa da espessura do esmalte na região de cúspide revelou uma redução significativa ($p < 0,001$) nos molares dos ratos dos grupos GA100 e GA500 em comparação ao grupo controle, no período de 7 dias (Compare a Fig. 2C com a Fig. 2D e Fig. 2E; Fig. 4). Um significativo aumento na espessura do esmalte foi verificado no período de 12 dias, em todos os grupos. No entanto, diferenças estatisticamente significantes não foram detectadas entre os grupos ($p = 0,111$) nos germes dos molares de ratos de 12 dias (Figs. 2H-2J; Fig. 4).

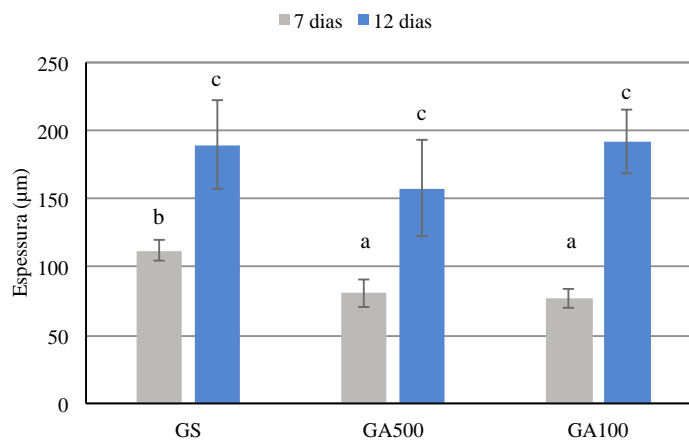


Figura 4 – Médias amostrais (colunas) e intervalos de confiança de 95% para as médias (barras verticais) de espessura da matriz do esmalte de germes de molares aos 7 e 12 dias.

Nota: Médias acompanhadas de letras iguais não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Imuno-histoquímica para detecção de Amelogenina e MMP-20

A reação imuno-histoquímica para detecção de amelogenina realizada nos cortes frontais de molares de ratos com 7 dias revelou imunomarcagem no citoplasma dos ameloblastos e na matriz do esmalte (Figs. 5A-5C). Embora toda a extensão da camada de ameloblastos foi imunopositiva à amelogenina, um padrão distinto de imunomarcagem foi observado nas diferentes regiões, ou seja, na região de cúspide e região cervical da coroa dos molares em desenvolvimento. Na região cervical da

coroa dos molares, a intensidade da imunomarcção para amelogenina foi, frequentemente, maior quando comparado ao da região de cúspide. Além disso, os valores obtidos para intensidade de imunomarcção anti-amelogenina, nas duas regiões analisadas, foram maiores no GS em comparação aos grupos GA100 e GA500. No entanto, diferenças estatisticamente significantes não foram detectadas entre as duas regiões, nos diferentes grupos (Tabela 1).

Tabela 1 – Médias (DP) de escores de Intensidade de marcação de Amelogenina.

Grupo	Regiões	
	Cúspide	Cervical
GS	308 (82) ^a	325 (55) ^a
GA100	225 (32) ^a	285 (49) ^a
GA500	275 (55) ^a	300 (65) ^a

Nota: Médias acompanhadas de letras iguais não são significativamente diferentes pela anova: $p > 0,05$.

Os cortes submetidos a reação imuno-histoquímica para detecção de MMP-20 realizada nos molares de ratos de 12 dias exibiram ameloblastos e a matriz do esmalte imunomarcados (Figs. 6A-6D). Embora diferenças estatísticas não foram detectadas entre as regiões e grupos analisados, a análise dos valores obtidos com o H-score revelou que os ameloblastos na região média da coroa dos molares apresentou menor intensidade da imunopositividade à MMP-20 em relação as demais regiões, nos grupos GS e GA100; no grupo GA500, os valores obtidos nas regiões média e cervical das coroas dos molares foram semelhantes (Tabela 2).

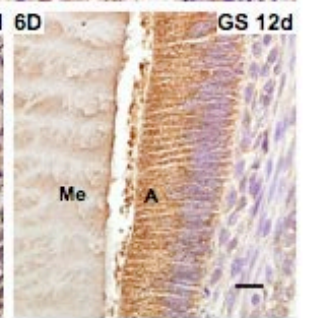
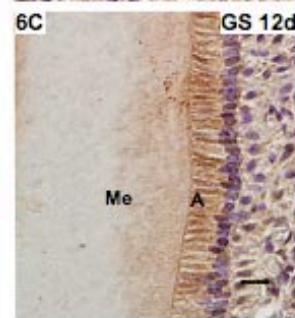
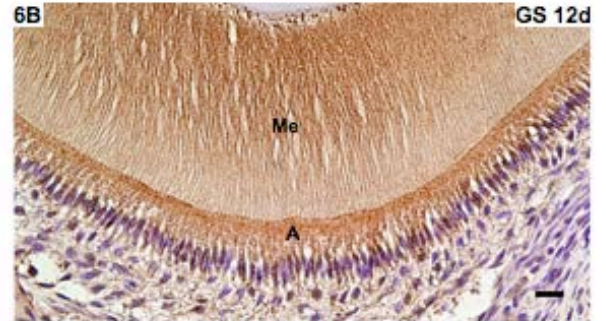
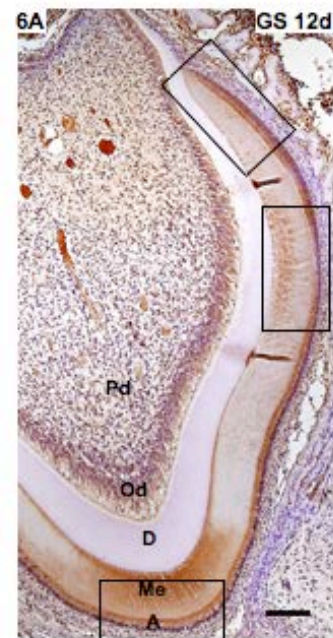
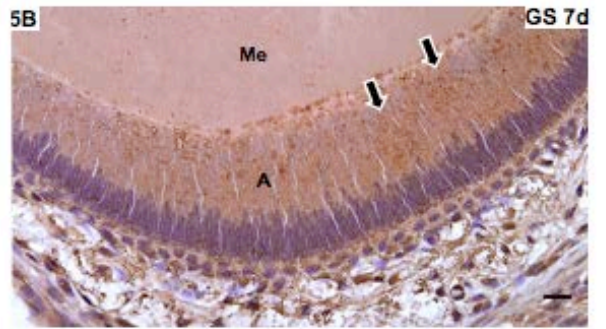
Tabela 2 – Médias (DP) de escores de Intensidade de marcação de MMP-20.

Grupo	Regiões		
	Cúspide	Média	Cervical
GS	292 (58) ^a	258 (38) ^a	283 (61) ^a
GA100	300 (45) ^a	250 (45) ^a	292 (74) ^a
GA500	283 (52) ^a	258 (66) ^a	258 (20) ^a

Nota: Médias acompanhadas de letras iguais não são significativamente diferentes pela anova ou teste de Tukey: $p > 0,05$ (as diferenças ocorreram na horizontal).

Figuras 5A-5C – Fotomicrografias de corte frontal de cabeça de rato mostrando germe dentário de 1º molar de rato com 7 dias do grupo controle (GS) submetido a reação imuno-histoquímica anti-amelogenina e contracorado com hematoxilina. **Fig. 5A** - A camada de ameloblastos (A) exibe uma evidente imunopositiva (em castanho) por toda a sua extensão. **Fig. 5B** – na região de cúspide do molar, área demarcada em 5A, alguns grânulos imunomarcados (setas) são observados dispersos na porção distal dos ameloblastos (A). **Fig. 5C** – na região de cervical do molar, área demarcada em 5A, os ameloblastos (A) exibem evidente imunomarcção citoplasmática. Me, matriz de esmalte; D, dentina; Od, odontoblastos; Pd, papila dentária em diferenciação; Ac, Alça cervical. Barras: 150 µm (5A) e 15µm (5B e 5C).

Figuras 6A-6D – Fotomicrografias de corte frontal de cabeça de rato mostrando germe dentário de 1º molar de rato com 12 dias do grupo controle (GS) submetido a reação imuno-histoquímica anti-MMP-20 e contracorado com hematoxilina. **Fig. 6A** – toda extensão da camada de ameloblastos (A) apresenta imunopositividade à MMP-20; a matriz do esmalte exibe fraca e heterogeneamente positiva à MMP-20. As Figs. 6B-6D mostram as regiões de cúspide (Fig. 6B), média (Fig. 6C) e cervical (Fig. 6D) demarcadas em 6A. Evidente imunomarcção citoplasmática (em castanho) é observada nos ameloblastos nas diferentes regiões do molar em desenvolvimento. Me, matriz de esmalte; D, dentina; Od, odontoblastos; Pd, papila dentária em diferenciação. Barras: 150 µm (5A), 15 µm (5B) e 15 µm (6C e 6D).



Discussão

Não há dados conclusivos sobre os fatores etiológicos da Hipomineralização Molar-Incisivo (HMI) ^{2, 11, 38, 50, 88, 89}. Estudos têm associado o uso de amoxicilina com a presença de HMI em humanos ^{38, 50, 74, 76, 89}. Porém não há evidências se o defeito de esmalte está associado à doença infecciosa ou à febre ou ao tratamento com amoxicilina, ou a ambos ^{2, 74}.

Pouco é conhecido sobre a patogenia da HMI, se está relacionado à secreção da matriz proteica e/ou maturação dessa matriz, tornado obscuro o distúrbio ocorrido no ameloblasto. Sabe-se que dentes afetados pela HMI apresentam o esmalte com espessura normal, porém poroso e susceptível à fratura; há evidências de que o esmalte apresenta redução de 20% do conteúdo mineral ^{24, 28, 42}. Tem sido relatado também que o esmalte com HMI contém maior concentração de proteínas oriundas do fluido oral e sangue, porém as proteínas típicas do esmalte não apresentam alterações significantes ⁵⁶.

O conhecimento dos fatores envolvidos na patogenia da HMI é essencial para prevenção dessas lesões, dado o sucesso ocorrido na prevenção dos defeitos de esmalte induzidos pela tetraciclina e fluoreto ^{17, 83}. O modelo animal têm sido utilizado para investigar o efeito de fatores sistêmicos e ambientais no desenvolvimento do esmalte dentário, uma vez que o esmalte é uma estrutura que não sofre processo remodelação semelhantemente ao tecido ósseo; portanto, o distúrbio promovido por determinados agentes podem permanecer registrados a estrutura do esmalte ^{1, 17, 58, 66}. Ademais, os germes de molares de ratos permitem estudar de vários estágios da amelogênese em um mesmo corte, possibilitando a correlação desses estágios com os eventos da amelogênese que ocorrem em humanos ⁵⁸. Até o momento, o presente estudo é o primeiro a avaliar in vivo o efeito da exposição crônica da amoxicilina no desenvolvimento do esmalte dentário de ratos.

As doses de 100 mg/kg e 500 mg/kg de amoxicilina por dia foram estimadas simulando a exposição da criança à amoxicilina nos primeiros anos de vida, de acordo com a Academia Americana de Pediatria ⁵. Como metabolismo do rato e humano não são similares, houve a necessidade de doses mais altas de amoxicilina

para analisar efeito da amoxicilina no desenvolvimento do esmalte dentário em ratos, como aquelas observadas nos estudos prévios que avaliaram o efeito de substâncias como fluoreto, macrolídeos e outros fatores na amelogênese ^{1, 17, 53}.

Os nossos resultados mostraram que a espessura do esmalte foi significativamente reduzida aos 7 dias, indicando que a amoxicilina deve interferir com o início da amelogênese, promovendo um atraso na diferenciação dos ameloblastos ou no processo de síntese da matriz protéica. Neste período os ameloblastos em estágio de secreção, com formato cilíndrico alto, núcleo elíptico e polarizado, apresentaram na sua porção citoplasmática distal estruturas com tamanho variado e aspecto semelhante aos vacúolos, sugerindo uma possível interferência da amoxicilina na síntese e secreção das proteínas do esmalte. Estas alterações foram observadas em ambos os grupos (ratos tratados com 100 mg/kg ou 500 mg/kg de amoxicilina) e, portanto, não foram dose dependente. Alterações semelhantes foram descritas com a adição de 2,0 a 3,6 mg/mL de amoxicilina ou amoxicilina associada ao fluoreto (12 μ M ou 15 μ M NaF) ao meio de cultura contendo germes de molares de camundongos, essas alterações foram associadas a um efeito inibitório da amoxicilina na diferenciação dos ameloblastos ⁶⁵. De fato, diferenças significantes na espessura do esmalte não foram detectadas entre os grupos tratados e controle nos ratos com 12 dias. Assim é possível que a menor espessura de esmalte encontrada aos 7 dias possa ser resultado de um atraso no processo de diferenciação dos ameloblastos a partir das células do epitélio interno do órgão do esmalte.

Alterações na função do ameloblastos são responsáveis por alteração na composição orgânica da matriz ou diminuição do conteúdo inorgânico ⁸⁸. Apesar das alterações observadas aos 7 dias, diferenças no padrão de imunoexpressão da amelogenina pelos ameloblastos não foram observadas. As amelogeninas são as principais proteínas secretadas na fase de secreção da matriz protéica, essenciais para a deposição e crescimento dos cristais de hidroxiapatita ^{30, 31, 60}. Acredita-se que moléculas de amelogeninas formem nanosferas que constituem um arranjo estrutural complexo que desempenha um papel modulador na deposição e orientação dos cristais de hidroxiapatita ³¹. Assim, considerando que alterações significantes na imunoexpressão para amelogenina não foram observadas nos molares de ratos

tratados com amoxicilina, é concebível sugerir que a amoxicilina não tenha provocado alterações na mineralização do esmalte e, conseqüentemente, não induziu a HMI em ratos. No entanto, há evidências de que o processo de mineralização do esmalte depende de enzimas, dentre elas a MMP-20, que degradam proteínas do esmalte a fim de possibilitar a sua mineralização^{1, 10, 68, 70, 73}.

A análise da imunoexpressão da MMP-20 na camada de ameloblastos nos primeiros molares de ratos de 12 dias, período final de secreção e início de maturação do esmalte, não revelou diferenças significantes entre os grupos tratados e controle. Portanto, estes resultados reforçam a ideia de que a amoxicilina não promove distúrbios no processo de mineralização e/ou maturação do esmalte. Esses dados sugerem que a exposição crônica à amoxicilina tenha influência em fases específicas da amelogênese; é possível que a amoxicilina promova uma interferência na diferenciação dos ameloblastos como previamente relatado por Sahlberg et al.⁶⁵ (2013). Embora o mecanismo de ação da amoxicilina na amelogênese ainda não seja conhecido^{2, 50, 65}. É possível que a amoxicilina interfira na deposição e mineralização da matriz de dentina que exerce um papel indutor sobre os pré-ameloblastos em diferenciação⁸². Ratos tratados com 3,0 g de amoxicilina apresentaram molares com áreas extensas de dentina hipomineralizada indicando, portanto, que a amoxicilina pode promover distúrbios no processo de mineralização da dentina⁴⁸.

Estudos em animais relatam a interferência de outros fatores na amelogênese, como os hormonais, nutricionais, sistêmicos, genéticos e ambientais^{1, 17, 47, 53, 58, 65, 83, 88}. Esses fatores externos influenciam os ameloblastos e a amelogênese, diferentemente, dependendo dos estágios do ciclo de vida do ameloblasto, resultando em diferentes tipos de defeitos. Bronckers et al.¹⁷ (2009) descreveram a susceptibilidade dos ameloblastos ao fluoreto nos diferentes períodos da amelogênese, salientando que no estágio morfogenético, os ameloblastos são resistentes ao fluoreto; em contraposição, os pré-ameloblastos são susceptíveis às doses moderadas de fluoreto, resultando em alteração na estrutura celular e redução síntese protéica. No estágio secretor, a crônica exposição ao fluoreto também reduziu a espessura do esmalte em aproximadamente 10%^{72, 91}. Dentre os fatores estudados e sua patogenia, é conhecido que o fluoreto causa hipomineralizada pois interfere na

retenção de proteínas como as ameloblastinas e as enamelinas durante a fase de maturação da matriz do esmalte, provoca alteração na atividade proteolítica dessas proteínas, e alteração crescimento dos cristais^{16, 17}.

O uso de macrolídeo durante a amelogênese, em ratos, provocou aumento de picnose nos ameloblastos em estágio de transição (secretor/maturação), e áreas pontuais com alterações degenerativas nos ameloblastos durante a maturação. Em análise microrradiográfica, revelaram áreas hipomineralizadas na superfície do esmalte indicando um possível efeito inibitório do fármaco no processo de diferenciação no estágio secretor-maturação do ameloblasto¹. Alterações estruturais nos ameloblastos e na matriz de esmalte foram também reportadas em consequência ao tratamento com tetraciclina; ameloblastos exibindo picnose, grânulos de autofagia e ausência de processo de Tomes estavam frequentemente associados à uma matriz do esmalte irregular e com espessura diminuída em algumas áreas⁸⁸.

De acordo com os dados observados, conclui-se que a amoxicilina interferiu nos estágios iniciais da amelogênese, provocando redução da matriz do esmalte e alterações morfológicas nos ameloblastos. Não há evidência sobre o mecanismo de ação desse fármaco na amelogênese, dentre as hipóteses estudadas, acredita-se que a amoxicilina provoca atraso na diferenciação dos ameloblastos em células secretoras. É possível que a amoxicilina possa atrasar o processo de mineralização da dentina⁴⁸ e conseqüentemente atrasar a diferenciação dos ameloblastos. Estudos experimentais são necessários para evidenciar o mecanismo de ação da amoxicilina em ameloblastos, incluindo análise ultraestrutural de experimentos *in vitro*.

Agradecimentos

Agradeço ao Sr. Luis Antônio Potenza e Pedro Sérgio Simões pela assistência técnica. As agências FAPESP (11/13569-6; 11/17209-4) e CAPES pela contemplação de recursos para realização desta pesquisa.

Referências

1. Abe T, Miyajima H, Okada K. Effects of a macrolide antibiotic on enamel formation in rat incisors--primary lesion of ameloblast at the transition stage. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science* 2003;65:985-8.
2. Alaluusua S. Aetiology of Molar-Incisor Hypomineralisation: A systematic review. *European archives of paediatric dentistry : official journal of the European Academy of Paediatric Dentistry* 2010;11:53-8.
3. Alaluusua S, Lukinmaa PL, Koskimies M, Pirinen S, Holtta P, Kallio M, et al. Developmental dental defects associated with long breast feeding. *European journal of oral sciences* 1996;104:493-7.
4. American Academy of Pediatrics Subcommittee on Management of Acute Otitis M. Diagnosis and management of acute otitis media. *Pediatrics* 2004;113:1451-65.
5. Arrow P. Risk factors in the occurrence of enamel defects of the first permanent molars among schoolchildren in Western Australia. *Community dentistry and oral epidemiology* 2009;37:405-15.
6. Bartlett JD, Beniash E, Lee DH, Smith CE. Decreased mineral content in MMP-20 null mouse enamel is prominent during the maturation stage. *Journal of dental research* 2004;83:909-13.
7. Beentjes VE, Weerheijm KL, Groen HJ. Factors involved in the aetiology of molar-incisor hypomineralisation (MIH). *European journal of paediatric dentistry : official journal of European Academy of Paediatric Dentistry* 2002;3:9-13.
8. Bergus GR, Levy BT, Levy SM, Slager SL, Kiritsy MC. Antibiotic use during the first 200 days of life. *Archives of family medicine* 1996;5:523-6.
9. Bergus GR, Levy SM, Kirchner HL, Warren JJ, Levy BT. A prospective study of antibiotic use and associated infections in young children. *Paediatric and perinatal epidemiology* 2001;15:61-7.
10. Bronckers AL, Jansen LL, Woltgens JH. Long-term (8 days) effects of exposure to low concentrations of fluoride on enamel formation in hamster tooth-germs in organ culture in vitro. *Archives of oral biology* 1984;29:811-9.
11. Bronckers AL, Lyaruu DM, DenBesten PK. The impact of fluoride on ameloblasts and the mechanisms of enamel fluorosis. *Journal of dental research* 2009;88:877-93.
12. Cerri PS, Pereira-Junior JA, Biselli NB, Sasso-Cerri E. Mast cells and MMP-9 in the lamina propria during eruption of rat molars: quantitative and immunohistochemical evaluation. *Journal of anatomy* 2010;217:116-25.
13. Crombie FA, Manton DJ, Weerheijm KL, Kilpatrick NM. Molar incisor hypomineralization: a survey of members of the Australian and New Zealand Society of Paediatric Dentistry. *Australian dental journal* 2008;53:160-6.

14. da Costa-Silva CM, Jeremias F, de Souza JF, Cordeiro Rde C, Santos-Pinto L, Zuanon AC. Molar incisor hypomineralization: prevalence, severity and clinical consequences in Brazilian children. *International journal of paediatric dentistry / the British Paedodontic Society [and] the International Association of Dentistry for Children* 2010;20:426-34.
15. Fagrell TG, Dietz W, Jalevik B, Noren JG. Chemical, mechanical and morphological properties of hypomineralized enamel of permanent first molars. *Acta odontologica Scandinavica* 2010;68:215-22.
16. Fearne J, Anderson P, Davis GR. 3D X-ray microscopic study of the extent of variations in enamel density in first permanent molars with idiopathic enamel hypomineralisation. *British dental journal* 2004;196:634-8; discussion 25.
17. Fincham AG, Moradian-Oldak J, Simmer JP. The structural biology of the developing dental enamel matrix. *Journal of structural biology* 1999;126:270-99.
18. Fincham AG, Simmer JP. Amelogenin proteins of developing dental enamel. *Ciba Foundation symposium* 1997;205:118-30; discussion 30-4.
19. Gunduz B, Karakas A, Terzi H, Oner J, Serin E, Kukner A. The effect of pinealectomy and leptin hormone on the proliferation and apoptosis activation in Syrian hamster testis in different photoperiods. *International journal of andrology* 2009;32:343-52.
20. Hong L, Levy SM, Warren JJ, Bergus GR, Dawson DV, Wefel JS, et al. Primary tooth fluorosis and amoxicillin use during infancy. *Journal of public health dentistry* 2004;64:38-44.
21. Hong L, Levy SM, Warren JJ, Broffitt B. Amoxicillin use during early childhood and fluorosis of later developing tooth zones. *Journal of public health dentistry* 2011;71:229-35.
22. Hong L, Levy SM, Warren JJ, Dawson DV, Bergus GR, Wefel JS. Association of amoxicillin use during early childhood with developmental tooth enamel defects. *Archives of pediatrics & adolescent medicine* 2005;159:943-8.
23. Jalevik B. Enamel hypomineralization in permanent first molars. A clinical, histo-morphological and biochemical study. *Swedish dental journal Supplement* 2001:1-86.
24. Jalevik B, Klingberg G. Treatment outcomes and dental anxiety in 18-year-olds with MIH, comparisons with healthy controls - a longitudinal study. *International journal of paediatric dentistry / the British Paedodontic Society [and] the International Association of Dentistry for Children* 2012;22:85-91.
25. Jalevik B, Noren JG. Enamel hypomineralization of permanent first molars: a morphological study and survey of possible aetiological factors. *International journal of paediatric dentistry / the British Paedodontic Society [and] the International Association of Dentistry for Children* 2000;10:278-89.

26. Jalevik B, Odelius H, Dietz W, Noren J. Secondary ion mass spectrometry and X-ray microanalysis of hypomineralized enamel in human permanent first molars. *Archives of oral biology* 2001;46:239-47.
27. Jasulaityte L, Weerheijm KL, Veerkamp JS. Prevalence of molar-incisor-hypomineralisation among children participating in the Dutch National Epidemiological Survey (2003). *European archives of paediatric dentistry : official journal of the European Academy of Paediatric Dentistry* 2008;9:218-23.
28. Jeremias F, de Souza JF, Silva CM, Cordeiro Rde C, Zuanon AC, Santos-Pinto L. Dental caries experience and Molar-Incisor Hypomineralization. *Acta odontologica Scandinavica* 2013;71:870-6.
29. Katchburian E, Arana V. Esmalte. In: *Histologia e embriologia oral: texto, atlas, correlações clínicas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002:171-203.
30. Kuijpers MH, van de Kooij AJ, Slootweg PJ. Review article. The rat incisor in toxicologic pathology. *Toxicologic pathology* 1996;24:346-60.
31. Kumazawa K, Sawada T, Yanagisawa T, Shintani S. Effect of single-dose amoxicillin on rat incisor odontogenesis: a morphological study. *Clinical oral investigations* 2012;16:835-42.
32. Laisi S, Ess A, Sahlberg C, Arvio P, Lukinmaa PL, Alaluusua S. Amoxicillin may cause molar incisor hypomineralization. *Journal of dental research* 2009;88:132-6.
33. Leite GAS, R.M.M. S, J.M. T, Porto IM, Souza FB, Gerlach RF. Exposure to lead exacerbates dental fluorosis. *Archives of oral biology* 2011;56:695-702.
34. Mangum JE, Crombie FA, Kilpatrick N, Manton DJ, Hubbard MJ. Surface integrity governs the proteome of hypomineralized enamel. *Journal of dental research* 2010;89:1160-5.
35. Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian journal of biology = Revista brasleira de biologia* 2002;62:609-14.
36. Massa LF, Bradaschia-Correa V, Arana-Chavez VE. Immunocytochemical study of amelogenin deposition during the early odontogenesis of molars in alendronate-treated newborn rats. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 2006;54:713-25.
37. Nanci A. Enamel: Composition, Development and Structure. In: Nanci A, ed. *Ten Cate's Oral Histology, Development, Structure, and Function*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008:141-90.
38. Nanci A, Zalzal S, Lavoie P, Kunikata M, Chen W, Krebsbach PH, et al. Comparative immunochemical analyses of the developmental expression and distribution of ameloblastin and amelogenin in rat incisors. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 1998;46:911-34.

39. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. Antibacterial drugs. In: *Rang & Dale's Pharmacology*. UK: Elsevier Health Sciences UK, 2011.
40. Reith EJ. The stages of amelogenesis as observed in molar teeth of young rats. *Journal of ultrastructure research* 1970;30:111-51.
41. Sahlberg C, Pavlic A, Ess A, Lukinmaa PL, Salmela E, Alaluusua S. Combined effect of amoxicillin and sodium fluoride on the structure of developing mouse enamel in vitro. *Archives of oral biology* 2013.
42. Schours I, Massler M. The teeth. In: Farris EJ, Griffith JQ, eds. *The rat in laboratory investigation*: Hafner Publishing Co: New York, 1963:104-60.
43. Simmer JP, Hu JC. Expression, structure, and function of enamel proteinases. *Connective tissue research* 2002;43:441-9.
44. Smith CE. Cellular and chemical events during enamel maturation. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists* 1998;9:128-61.
45. Smith CE, Nanci A, Denbesten PK. Effects of chronic fluoride exposure on morphometric parameters defining the stages of amelogenesis and ameloblast modulation in rat incisors. *The Anatomical record* 1993;237:243-58.
46. Smith CE, Nanci A. Overview of morphological changes in enamel organ cells associated with major events in amelogenesis. *The International journal of developmental biology* 1995;39:153-61.
47. Souza JF, Costa-Silva CM, Jeremias F, Santos-Pinto L, Zuanon AC, Cordeiro RC. Molar incisor hypomineralisation: possible aetiological factors in children from urban and rural areas. *European archives of paediatric dentistry : official journal of the European Academy of Paediatric Dentistry* 2012;13:164-70.
48. Souza JF, Jeremias F, Costa Silva CM, Santos-Pinto L, Zuanon AC, Cordeiro Rde C. Hipomineralización Incisivo y molar: Diagnóstico diferencial. *Acta Odontol Venezolana* 2011;49:1- 8.
49. Souza JF, Jeremias F, Costa-Silva CM, Santos-Pinto L, Zuanon AC, Cordeiro RC. Aetiology of molar-incisor hypomineralisation (MIH) in Brazilian children. *European archives of paediatric dentistry : official journal of the European Academy of Paediatric Dentistry* 2013.
50. Soviero V, Haubek D, Trindade C, Da Matta T, Poulsen S. Prevalence and distribution of demarcated opacities and their sequelae in permanent 1st molars and incisors in 7 to 13-year-old Brazilian children. *Acta Odontol Scand* 2009;67:170-5.
51. Thesleff I, Keranen S, Jernvall J. Enamel knots as signaling centers linking tooth morphogenesis and odontoblast differentiation. *Advances in dental research* 2001;15:14-8.
52. Tredwin CJ, Scully C, Bagan-Sebastian JV. Drug-induced disorders of teeth. *Journal of dental research* 2005;84:596-602.
53. Weerheijm KL. Molar incisor hypomineralization (MIH): clinical presentation, aetiology and management. *Dental update* 2004;31:9-12.

54. Weerheijm KL, Jalevik B, Alaluusua S. Molar-incisor hypomineralisation. *Caries research* 2001;35:390-1.
55. Westergaard J. Structural changes induced by tetracycline in secretory ameloblasts in young rats. *Scandinavian journal of dental research* 1980;88:481-95.
56. Whatling R, Fearne JM. Molar incisor hypomineralization: a study of aetiological factors in a group of UK children. *International journal of paediatric dentistry / the British Paedodontic Society [and] the International Association of Dentistry for Children* 2008;18:155-62.
57. Zhou R, Zaki AE, Eisenmann DR. Morphometry and autoradiography of altered rat enamel protein processing due to chronic exposure to fluoride. *Archives of oral biology* 1996;41:739-47.

4 Capítulo 2



Effect of amoxicillin on the physical-chemical properties of enamel in rat teethSouza JF^a, Cerri PS^b, Alaluusua S^c, Santos-Pinto L^a, Jernvall J^d, Sova S^d, Cordeiro RCL^a

^aDepartment of Pediatric Dentistry, Dental School, UNESP - Univ. Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, Brazil

^bDepartment of Morphology, Laboratory of Histology and Embryology, Dental School, UNESP - Univ. Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, Brazil

^cDepartment of Pediatric and Preventive Dentistry, Institute of Dentistry, University of Helsinki, Helsinki, Finland

^dEvolution and Development Group, Institute of Biotechnology, University of Helsinki, Finland

Short title: Amoxicillin and enamel developing

Key words: X-Ray Microtomography, Dental Enamel, Amoxicillin, Amelogenesis.

Word count: 2,970

Corresponding author:

Rita de Cássia Loiola Cordeiro

Faculdade de Odontologia de Araraquara - Departamento de Clinica Infantil

Rua Humaitá, 1680 14801-903 Araraquara-SP Brazil

Phone: +55 16 3301-6331. Fax: +55 16 3301-6329

E-mail: ritacord@foar.unesp.br

Abstract

Background: Amoxicillin use in early childhood has been associated with molar-incisor hypomineralization. Cultured mouse molars have shown that amoxicillin interferes with enamel formation. However, there is no information of the amoxicillin effect on developing enamel in vivo. **Aim.** The aim of the study was to evaluate the effect of amoxicillin on the enamel structure of rat teeth. **Materials and methods:** Fifteen pregnant Holtzman rats (*Rattus norvegicus albinus*) were distributed randomly into three groups to receive saline (SG), 100 mg/kg/day amoxicillin (A100G), or 500 mg/kg/day amoxicillin (A500G), intragastrically, from days 13 to 22 of pregnancy. Ten offspring per group received the same dose until day 40. The animals were euthanized on day 40. A total of 60 upper incisors and 60 upper first molars from 30 animals were dissected. Calcium (Ca) determination was performed by the compleximetric titration method and phosphorus (Pi) determination by colorimetric analysis using a spectrophotometer at 680 nm. A total of 30 lower first molars from 15 animals were analyzed under X-ray microtomography (XMT). Differences in Ca and Pi content and electron density among the groups were analyzed by one-way ANOVA, using Statistica version 8.0 (StatSoft Inc, Tulsa, OK, USA). **Results:** Statistical differences were not observed in Ca content ($p=0.180$), Pi content ($p=0.054$), or XMT electron density ($p=0.150$) among the groups. **Conclusion:** Amoxicillin did not affect the mineral content of rat molars and incisors.

Key words: X-Ray Microtomography, Dental Enamel, Amoxicillin, Amelogenesis.

Introduction

The amelogenesis is a complex process involving cellular proliferation and differentiation by means of sequential interactions between epithelial and ectomesenchymal cells^{59, 82}. Amelogenesis has classically been divided into three major stages of the ameloblast life cycle, namely secretion, transition, and maturation. During the secretory stage, ameloblasts secrete large quantities of protein matrix (predominantly amelogenin), in which the enamel crystals grow. At the end of secretion, the ameloblasts deposit a final layer of aprismatic enamel with small crystals. Once the full thickness of enamel has been deposited, the cells undergo a short transitional stage into maturation. At this stage, the degradation of matrix proteins accelerates and the mineralization increases progressively until its completion^{59, 63}.

Tooth development is a strictly gene-regulated process, but it undergoes influence of systemic and environmental factors. Strict regulation of the secretion and processing of organic enamel matrix is a prerequisite for the formation of mineral crystals^{69, 71}. Disturbances in the amelogenesis may result in defects in the enamel structure and composition, such as hypomineralized enamel^{27, 78, 79}. Experimental studies using animals have been reported pathological changes of the enamel surface as a result of exposure to toxic doses of several agents, including fluoride, amoxicillin, environmental toxicants (such as dioxins), and tetracycline^{3, 17, 65, 88}.

Amoxicillin use during early childhood has been associated with enamel defects^{2, 36, 37, 50, 65, 74, 89}. Molar-incisor hypomineralization (MIH) is described as a hypomineralization of systemic origin of one to four first permanent molars and it is frequently associated with involvement of the permanent incisors⁸⁷. In MIH, porous enamel can break down easily, especially under the influence of masticatory forces, leaving dentin unprotected and thus predisposing to the development of carious lesions^{44, 85, 87}. The prevalence of MIH has been reported to range from 2.8 to 44%^{21, 43, 44, 77, 86, 89}.

Several studies have been described the microstructure of hypomineralized enamel as presenting less distinct prism sheaths and disorganized enamel. Moreover, the mechanical properties, hardness, and modulus of elasticity of enamel affected by MIH have lower values compared with normal enamel^{24, 42, 79, 90}. Other studies have shown changes in the chemical composition of molars affected by MIH^{28, 42, 55}.

Experimental in vitro studies have investigated the effect of amoxicillin on tooth development^{48, 50, 65}. Amoxicillin alone, or associated with fluoride, has been found to affect amelogenesis in cultured mouse molars, resulting in reduced enamel thickness, which is indicative of delayed onset of the secretory stage by ameloblasts⁶⁵. In an in vivo study, dentin mineralization was found to be disturbed in rat molars after exposure to a single dose of amoxicillin⁴⁸.

X-ray microtomography (XMT) has been employed for assessment of the severity of defects in enamel and other hard tissues^{25, 26, 28}. It is an essential tool, as it provides the opportunity to acquire high-quality morphological information with high spatial resolution by means of an accurate, quantitative method. It visualizes hidden details of structures and enables quantitative analyses such as measurement of actual mineral densities in mineralized tissues²⁶.

The enamel structure and its chemical composition are complex, and different methods should be combined to evaluate them in a proper context, taking into account these chemical and structural properties²⁴. Therefore, the present in vivo investigation was carried out to evaluate if the amoxicillin promotes changes on enamel development in rat incisors as well as in the enamel structure of molars of rats using XMT and biochemical analysis of calcium and phosphorus content.

Material and Methods

Animals

This study was approved by the Animal Care and Use Committee of the Araraquara School of Dentistry, Univ. Estadual Paulista – UNESP (report #34/2010). Female Holtzman rats (*Rattus norvegicus albinus*), aged 100 days and weighing

approximately 250 g, were housed in plastic cages and maintained under a 12/12-h light/dark cycle at a controlled temperature of 23 ± 2 °C, with water and food available ad libitum. The rats were paired with males for mating on the day of estrus. After 12 h, a vaginal smear was collected and analyzed under a light microscope (Carl Zeiss 62774, Jenamed, Germany). The presence of sperm in the vaginal smear was deemed indicative of pregnancy and designated as day 0 of embryonic age⁵⁷.

Fifteen pregnant rats were randomly divided into three groups of five animals each to receive, once daily by intragastric gavage: saline solution (SG); amoxicillin (Eurofarma, São Paulo, Brazil), 500 mg per kg body weight (A500G); or amoxicillin, 100 mg per kg body weight (A100G), from days 13 to 22 of pregnancy⁶⁶. After birth, 10 offspring received the same dose until day 40. On day 40, the offspring were euthanized with ketamine (Cetamin®, Syntec do Brasil Ltda, São Paulo, Brazil), 0.16 mL per 100 g body weight, and 2% xylazine hydrochloride (Xilazin®, Syntec do Brasil Ltda, São Paulo, Brazil), 0.04 mL per 100 g body weight. The upper and lower incisors and first molars were extracted, cleaned, and coded for analysis.

Analyses

X-Ray Microtomography

Differences in the electron density of enamel were analyzed using XTM. A total of 30 lower first molars from 15 animals were examined by XTM. The teeth were first cleaned, dehydrated, and scanned using a custom-built Nanotom 180NF micro-CT system (Phoenix|X-ray Systems, GE Measurements & Controls, Massachusetts, USA) with a CMOS detector (Hamamatsu Photonics) and high-power transmission-type X-ray nanofocus source with a tungsten anode. The samples were imaged with 80 kV acceleration voltages and 180 μ A tube current to yield 10- μ m resolution scans. Values for each specimen were represented by the mean of the five highest values measured along a straight 50- μ m line in the enamel. Projections were acquired over a full circle of rotation at 25-degree angle intervals, and each projection was composed of the average of 10 transmission images with a 750-ms

exposure time. Micro-CT data were analyzed using the Avizo Standard and ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) software suites. Three minerals of known density were used for standardization and calibration of measurements.

Determination of Calcium and Phosphorus Content

For determination of calcium (Ca) and phosphorus (Pi) content, a total of 60 upper incisors and 60 upper first molars from 30 animals were dried, separately, for 24 h at 60°C, then pulverized. The resulting powder was sieved to obtain particles in the range of 140 to 1,000 µm and dried at 60°C for an additional 24 h. Aliquots (30±0.01 mg) were then weighed out and transferred to tubes containing 1.0 mL of 0.5 M nitric acid. After 1 h, this solution was divided into two parts for Ca and Pi determination. Ca content was quantified by compleximetric titration. EDTA (disodium ethylenediaminetetraacetate) and the indicator Calcon® (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), were added to the sample^{29, 32}. The Ca content was expressed as mg of Ca per g of tooth mass (mg Ca/g tooth). The Pi content was determined by the colorimetric method using a spectrophotometer at 680 nm (DR 2500, Hack, Loveland, CO, USA). Sodium molybdate (10 mL) and 5 M ascorbic acid (1.0 mL) were added to the sample⁸¹. The spectrophotometer had been previously calibrated with standards of known Pi concentration. The Pi content was expressed as mg Pi/g tooth.

Statistical Analysis

Differences in Ca and Pi content and electron density among the groups were analyzed by one-way ANOVA, using Statistica version 8.0 (StatSoft Inc, Oklahoma, USA).

Results

Ca and Pi content were not statistically different among the groups (Table 1). Figures 1 and 2 provide a graphical representation of mean Ca and Pi contents with

95% confidence intervals (95%CI). Figure 3 shows the mean (95%CI) enamel electron densities on the buccal and lingual surfaces of the lower first molars. Electron densities were also statistically similar among the groups. Moreover, during analysis of micro-CT scans, a homogeneous grey level throughout the thickness of the enamel was observed in all samples.

Table 1 – Mean (SD) Ca and Pi content in mg/g of tooth.

Group	Calcium		Phosphorus	
	Incisors	Molars	Incisors	Molars
SG	271.0 (18.1)	258.9 (36.7)	135.1 (7.0)	136.1 (5.7)
A100G	289.2 (17.3)	258.3 (27.2)	133.6 (6.7)	133.1 (5.3)
A500G	260.1 (16.2)	250.2 (58.8)	136.0 (6.9)	143.1 (7.5)

No significant difference among the three groups ($p > 0.05$, ANOVA)

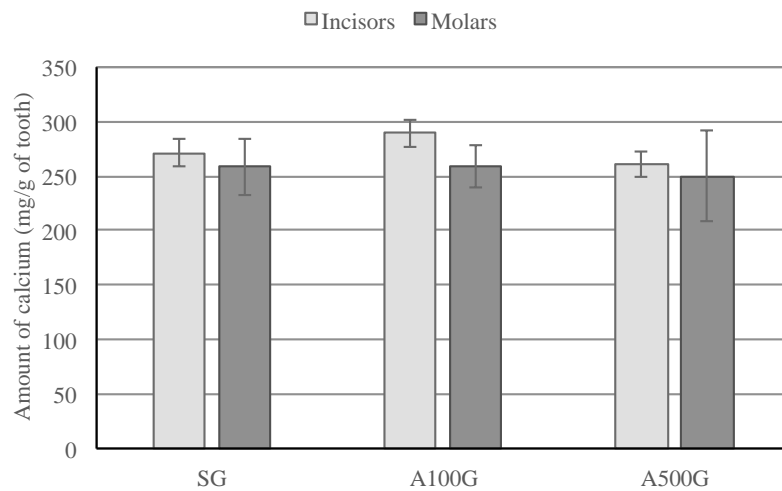


Figure 1 – Mean (95%CI) Ca content in each group.

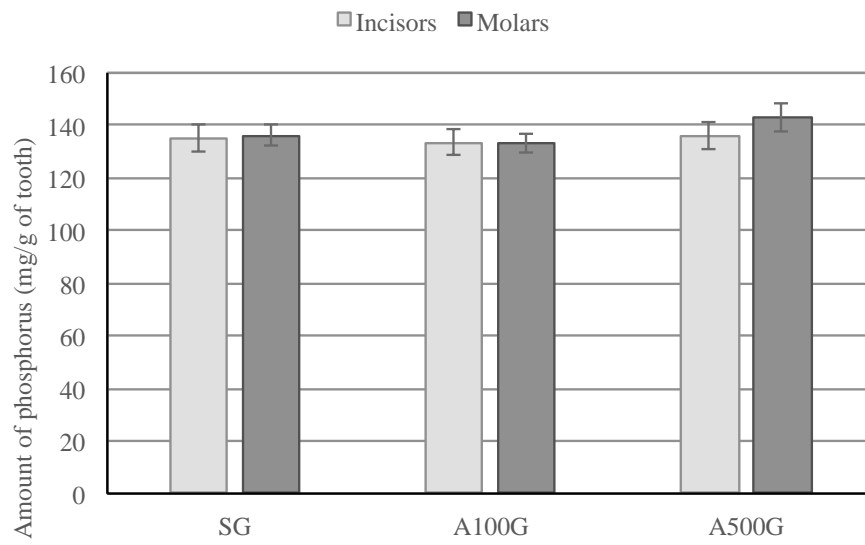
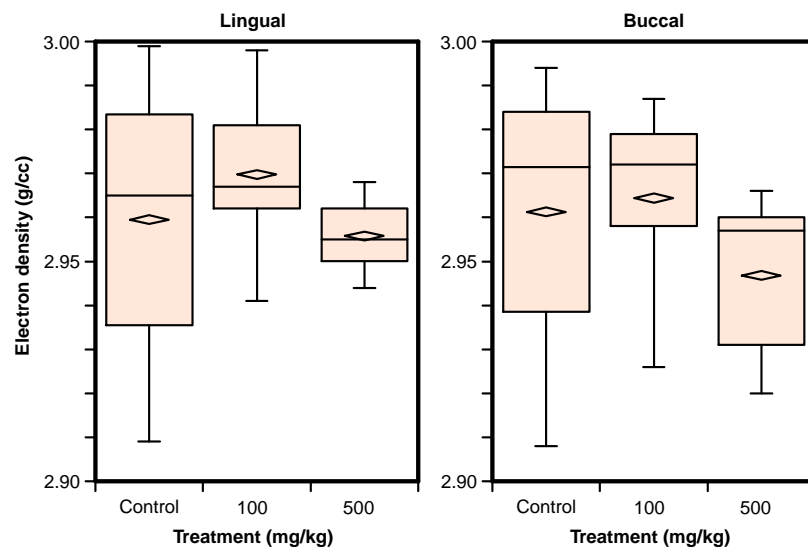


Figure 2 – Mean (95%CI) Pi content in each group.



No significant differences among the three groups ($p > 0.05$, ANOVA)

Figure 3 – Mean (95%CI) electron density on the lingual and buccal surfaces in each group.

Discussion

Amoxicillin use in early childhood has been associated with molar-incisor hypomineralization^{2, 36, 37, 50, 65, 74, 89}. Experimental studies *in vitro* have demonstrated changes in cultured mouse embryonic tooth explants after amoxicillin exposure^{50, 65}. However, there is no data on the effect of amoxicillin exposure *in vivo* on the mineral content of rat teeth.

There is evidence that the first rat molars begin their formation by day 13 of intrauterine life, and their mineralization is completed on day 12⁶⁶. In the present study, the animals were exposed to amoxicillin during every stage of amelogenesis until day 40. At this age, the enamel of the incisors is 80 µm thick, allowing manipulation and mineral content analysis⁶⁶. The standard amoxicillin doses estimated were 100 and 500 mg/kg per day, to simulate amoxicillin exposure in the child during the first years of life pursuant to recommendations of the American Academy of Pediatrics Subcommittee on Management of acute otitis⁵ (2004), and taking into account the differences between rat and human metabolism.

Dental enamel has a number of properties that make it a unique structure. It is the hardest structure in the body and has a very high proportion of inorganic matter, mainly hydroxyapatite. The ameloblast has limited reparative capacity; therefore, disturbances occurring during the mineralization of enamel will possibly remain as permanent marks. Defects in enamel quality have important implications for understanding their relation to etiological factors²⁴.

During amelogenesis, elements and compounds are transported to mineralizing areas. The elemental composition pattern of dental enamel varies during the differentiation stages of the ameloblasts⁵⁴. Calcium and phosphorus, in the form of phosphate, are the major components of hydroxyapatite in all mineral tissue. Studies have used the Ca/Pi ratio to determine the calcium content of hard tissues, which was found to be constant along the developing tooth organ^{24, 42, 55}. If this ratio is altered, it may suggest that the mineral phase is altered or that significant ion substitution may have occurred⁵⁵.

Several methods can be used to quantify the mineral content of hypomineralized enamel^{24, 25, 28}. The present study utilized quantitative chemical

analysis and micro-CT to speculate on the mineralization state of enamel after amoxicillin exposure. Regarding XMT analysis, this valuable approach represents a high-quality, non-destructive, and non-invasive method currently available for analysis of hard tissues in dental research. XMT has been repeatedly proven to be a valid method for measurement of the mineral density of sound and hypomineralized enamel^{24, 25, 28}.

In the present study, the treated groups did not differ significantly from the control group in calcium and phosphorus content, suggesting that amoxicillin exposure did not influence the mineralization and maturation stages. Interestingly, studies in cultured molar germs have demonstrated that amoxicillin affects ameloblasts during the secretory stage, causing alterations in ameloblast morphology and promoting a reduction in the enamel matrix^{50, 65}. These controversial results suggest that ameloblasts are more sensitive to amoxicillin exposure during the secretory stage. It has been reported that fluoride influences ameloblasts and enamel formation differently at different stages of the life cycle, resulting in different types of enamel defects¹⁷.

Another point of view concerns mineral content analysis of enamel defects and its implications. Human molars affected by MIH have shown lower hardness than normal enamel, which seems to be expected due to the disorganized structure of hypomineralized enamel^{24, 28, 38, 39}; lower calcium and phosphorus content were seen in these molars affected by MIH than in control enamel^{24, 28, 38}. On the other hand, other studies observed that Ca/Pi ratios in enamel affected by MIH were similar to those found in control molars^{24, 55}. Similar results were found by Shinoda⁶⁷ (1975) and Susheela and Bhatnagar⁸⁰ (1993) when evaluating fluoride exposure in rabbits and rats. It is possible that, in hypomineralized enamel, calcium and phosphorus are presented not only in an organized crystalline structure but also in amorphous matter^{55, 80}. Thus, mineral content should be interpreted with caution, and additional methods should be combined for its analysis.

In this study, electron density values ranged from 2.83 to 2.99 g/cm³. These were similar to the electron density of normal human enamel, which is approximately

in the range of 2.8 to 3.0 g/cm³²⁶. Molars affected by MIH have shown the electron density of 2.24 (2.04–2.46) in white stain, 1.93 (1.68–2.4) in yellow stain and 1.67 (1.52–1.74) in brown stain²⁵. Recent experiment using piglets evaluated the effect of amoxicillin (doses of 50 mg/kg/day and 90 mg/kg/day) on enamel electron density, observed discrete variation of the enamel electron density ranged from 2.41 to 2.66 g/cm³ at the dentin-enamel junction to outer enamel surface, suggesting that exposure to amoxicillin did not influence the electron density of enamel⁴⁹.

The key point of this discussion is what electron density represents. A strong correlation was observed between the electron density of hypomineralized enamel and its degree of staining; for every change in color code, e.g., yellow to brown staining, a 0.28 g/cm³ reduction in electron density was observed²⁵. Furthermore, an important aspect of enamel analysis is the ability of enamel to resist occlusal forces; it has been suggested that electron density is the main determinant of the strength of the mechanical properties of a mineralized tissue²⁶. A strong correlation (correlation coefficient of 0.87) was found between the electron density of human enamel and its hardness³⁴.

The findings of the present study did not show an association between exposure to amoxicillin and alterations during the maturation stage of amelogenesis, and, consequently, no association between amoxicillin exposure and enamel structure in rats. Further studies in this field are needed, evaluating the enamel hardness and morphological aspects.

References:

1. Nanci A (2008) Enamel: Composition, Development and Structure. In: Nanci A (ed) Ten Cate's Oral Histology, Development, Structure, and Function. 8th edn. Elsevier, Rio de Janeiro, pp 141-190
2. Thesleff I, Keranen S, Jernvall J (2001) Enamel knots as signaling centers linking tooth morphogenesis and odontoblast differentiation. *Advances in dental research* 15:14-18
3. Reith EJ (1970) The stages of amelogenesis as observed in molar teeth of young rats. *Journal of ultrastructure research* 30 (1):111-151
4. Smith CE, Hu Y, Richardson AS, Bartlett JD, Hu JC, Simmer JP (2011) Relationships between protein and mineral during enamel development in normal and genetically altered mice. *European journal of oral sciences* 119 Suppl 1:125-135. doi:10.1111/j.1600-0722.2011.00871.x
5. Simmer JP, Papagerakis P, Smith CE, Fisher DC, Rountrey AN, Zheng L, Hu JC (2010) Regulation of dental enamel shape and hardness. *Journal of dental research* 89 (10):1024-1038. doi:10.1177/0022034510375829
6. FDI (1992) Fédération Dentaire Internationale. Commission on Oral Health, Research and Epidemiology. A review of the developmental defects of enamel index (DDE Index). Commission on Oral Health, Research & Epidemiology. Report of an FDI Working Group. *International dental journal* 42 (6):411-426
7. Suckling GW (1989) Developmental defects of enamel--historical and present-day perspectives of their pathogenesis. *Advances in dental research* 3 (2):87-94
8. Suckling GW, Nelson DG, Patel MJ (1989) Macroscopic and scanning electron microscopic appearance and hardness values of developmental defects in human permanent tooth enamel. *Advances in dental research* 3 (2):219-233
9. Sahlberg C, Pavlic A, Ess A, Lukinmaa PL, Salmela E, Alaluusua S (2013) Combined effect of amoxicillin and sodium fluoride on the structure of developing mouse enamel in vitro. *Archives of oral biology*. doi:10.1016/j.archoralbio.2013.03.007

10. Bronckers AL, Lyaruu DM, DenBesten PK (2009) The impact of fluoride on ameloblasts and the mechanisms of enamel fluorosis. *Journal of dental research* 88 (10):877-893. doi:10.1177/0022034509343280
11. Alaluusua S, Lukinmaa PL (2006) Developmental dental toxicity of dioxin and related compounds--a review. *International dental journal* 56 (6):323-331
12. Westergaard J (1980) Structural changes induced by tetracycline in secretory ameloblasts in young rats. *Scandinavian journal of dental research* 88 (6):481-495
13. Souza JF, Costa-Silva CM, Jeremias F, Santos-Pinto L, Zuanon AC, Cordeiro RC (2012) Molar incisor hypomineralisation: possible aetiological factors in children from urban and rural areas. *European archives of paediatric dentistry : official journal of the European Academy of Paediatric Dentistry* 13 (4):164-170
14. Hong L, Levy SM, Warren JJ, Broffitt B (2011) Amoxicillin use during early childhood and fluorosis of later developing tooth zones. *Journal of public health dentistry* 71 (3):229-235
15. Alaluusua S (2010) Aetiology of Molar-Incisor Hypomineralisation: A systematic review. *European archives of paediatric dentistry : official journal of the European Academy of Paediatric Dentistry* 11 (2):53-58
16. Laisi S, Ess A, Sahlberg C, Arvio P, Lukinmaa PL, Alaluusua S (2009) Amoxicillin may cause molar incisor hypomineralization. *Journal of dental research* 88 (2):132-136. doi:10.1177/0022034508328334
17. Whatling R, Fearne JM (2008) Molar incisor hypomineralization: a study of aetiological factors in a group of UK children. *International journal of paediatric dentistry / the British Paedodontic Society [and] the International Association of Dentistry for Children* 18 (3):155-162. doi:10.1111/j.1365-263X.2007.00901.x
18. Hong L, Levy SM, Warren JJ, Dawson DV, Bergus GR, Wefel JS (2005) Association of amoxicillin use during early childhood with developmental tooth enamel defects. *Archives of pediatrics & adolescent medicine* 159 (10):943-948. doi:10.1001/archpedi.159.10.943
19. Weerheijm KL, Jalevik B, Alaluusua S (2001) Molar-incisor hypomineralisation. *Caries research* 35 (5):390-391. doi:47479

20. Jeremias F, de Souza JF, Silva CM, Cordeiro Rde C, Zuanon AC, Santos-Pinto L (2013) Dental caries experience and Molar-Incisor Hypomineralization. *Acta odontologica Scandinavica* 71 (3-4):870-876. doi:10.3109/00016357.2012.734412
21. Weerheijm KL, Duggal M, Mejare I, Papagiannoulis L, Koch G, Martens LC, Hallonsten AL (2003) Judgement criteria for molar incisor hypomineralisation (MIH) in epidemiologic studies: a summary of the European meeting on MIH held in Athens, 2003. *European journal of paediatric dentistry : official journal of European Academy of Paediatric Dentistry* 4 (3):110-113
22. da Costa-Silva CM, Jeremias F, de Souza JF, Cordeiro Rde C, Santos-Pinto L, Zuanon AC (2010) Molar incisor hypomineralization: prevalence, severity and clinical consequences in Brazilian children. *International journal of paediatric dentistry / the British Paedodontic Society [and] the International Association of Dentistry for Children* 20 (6):426-434. doi:10.1111/j.1365-263X.2010.01097.x
23. Jasulaityte L, Weerheijm KL, Veerkamp JS (2008) Prevalence of molar-incisor-hypomineralisation among children participating in the Dutch National Epidemiological Survey (2003). *European archives of paediatric dentistry : official journal of the European Academy of Paediatric Dentistry* 9 (4):218-223
24. Weerheijm KL, Groen HJ, Beentjes VE, Poorterman JH (2001) Prevalence of cheese molars in eleven-year-old Dutch children. *ASDC journal of dentistry for children* 68 (4):259-262, 229
25. Soviero V, Haubek D, Trindade C, Da Matta T, Poulsen S (2009) Prevalence and distribution of demarcated opacities and their sequelae in permanent 1st molars and incisors in 7 to 13-year-old Brazilian children. *Acta Odontol Scand* 67 (3):170-175. doi:10.1080/00016350902758607
26. Fagrell TG, Dietz W, Jalevik B, Noren JG (2010) Chemical, mechanical and morphological properties of hypomineralized enamel of permanent first molars. *Acta odontologica Scandinavica* 68 (4):215-222. doi:10.3109/00016351003752395
27. Xie ZH, Mahoney EK, Kilpatrick NM, Swain MV, Hoffman M (2007) On the structure-property relationship of sound and hypomineralized enamel. *Acta biomaterialia* 3 (6):865-872. doi:10.1016/j.actbio.2007.05.007

28. Jalevik B, Odellius H, Dietz W, Noren J (2001) Secondary ion mass spectrometry and X-ray microanalysis of hypomineralized enamel in human permanent first molars. *Archives of oral biology* 46 (3):239-247
29. Mahoney EK, Rohanizadeh R, Ismail FS, Kilpatrick NM, Swain MV (2004) Mechanical properties and microstructure of hypomineralised enamel of permanent teeth. *Biomaterials* 25 (20):5091-5100. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.02.044
30. Fearne J, Anderson P, Davis GR (2004) 3D X-ray microscopic study of the extent of variations in enamel density in first permanent molars with idiopathic enamel hypomineralisation. *British dental journal* 196 (10):634-638; discussion 625. doi:10.1038/sj.bdj.4811282
31. Kumazawa K, Sawada T, Yanagisawa T, Shintani S (2012) Effect of single-dose amoxicillin on rat incisor odontogenesis: a morphological study. *Clinical oral investigations* 16 (3):835-842. doi:10.1007/s00784-011-0581-4
32. Farah R, Drummond B, Swain M, Williams S (2010) Linking the clinical presentation of molar-incisor hypomineralisation to its mineral density. *International journal of paediatric dentistry / the British Paedodontic Society [and] the International Association of Dentistry for Children* 20 (5):353-360. doi:10.1111/j.1365-263X.2010.01061.x
33. Farah RA, Swain MV, Drummond BK, Cook R, Atieh M (2010) Mineral density of hypomineralised enamel. *Journal of dentistry* 38 (1):50-58. doi:10.1016/j.jdent.2009.09.002
34. Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP (2002) Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian journal of biology = Revista brasleira de biologia* 62 (4A):609-614
35. Schours I, Massler M (1963) The teeth. In: Farris EJ, Griffith JQ (eds) *The rat in laboratory investigation*. Hafner Publishing Co: New York, pp 104-160
36. Ferrazzano GF, Cantile T, Quarto M, Ingenito A, Chianese L, Addeo F (2008) Protective effect of yogurt extract on dental enamel demineralization in vitro. *Australian dental journal* 53 (4):314-319. doi:10.1111/j.1834-7819.2008.00072.x
37. Flaschka HA (1964) *EDTA Titrations in introduction to theory and practice*. Ed Pergamon Press, Oxford

38. Svehla G (2008) *Vogel's Qualitative Inorganic Analysis*, 7/e. Pearson Education,
39. American Academy of Pediatrics Subcommittee on Management of Acute Otitis M (2004) Diagnosis and management of acute otitis media. *Pediatrics* 113 (5):1451-1465
40. Lundgren T, Persson LG, Engstrom EU, Chabala J, Levi-Setti R, Noren JG (1998) A secondary ion mass spectroscopic study of the elemental composition pattern in rat incisor dental enamel during different stages of ameloblast differentiation. *Archives of oral biology* 43 (11):841-848
41. Jalevik B, Dietz W, Noren JG (2005) Scanning electron micrograph analysis of hypomineralized enamel in permanent first molars. *International journal of paediatric dentistry / the British Paedodontic Society [and] the International Association of Dentistry for Children* 15 (4):233-240. doi:10.1111/j.1365-263X.2005.00644.x
42. Jalevik B (2001) Enamel hypomineralization in permanent first molars. A clinical, histo-morphological and biochemical study. *Swedish dental journal Supplement* (149):1-86
43. Shinoda H (1975) Effect of long-term administration of fluoride on physico-chemical properties of the rat incisor enamel. *Calcified tissue research* 18 (2):91-100
44. Susheela AK, Bhatnagar M (1993) Fluoride toxicity: a biochemical and scanning electron microscopic study of enamel surface of rabbit teeth. *Archives of toxicology* 67 (8):573-579
45. Kuscu OO, Sandalli N, Dikmen S, Ersoy O, Tatar I, Turkmen I, Caglar E (2013) Association of amoxicillin use and molar incisor hypomineralization in piglets: Visual and mineral density evaluation. *Archives of oral biology*. doi:10.1016/j.archoralbio.2013.04.012
46. He B, Huang S, Jing J, Hao Y (2010) Measurement of hydroxyapatite density and Knoop hardness in sound human enamel and a correlational analysis between them. *Archives of oral biology* 55 (2):134-141. doi:10.1016/j.archoralbio.2009.12.005

5 Capítulo 3



Efeito da amoxicilina associada ao fluoreto na estrutura dentária de ratos

Souza JF^a, Cerri PS^b, Jeremias F^a, Santos-Pinto L^a, Tenuta LMA^c, Cury JA^c,
Cordeiro RCL^a

^aDepartamento de Clínica Infantil, Faculdade de Odontologia de Araraquara,
Universidade Estadual Paulista – UNESP, Araraquara, SP, Brasil

^bDepartamento de Morfologia, Laboratório de Histologia e Embriologia, Faculdade
de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista – UNESP,
Araraquara, SP, Brasil

^c Departamento de Ciências Fisiológicas, Laboratório de Bioquímica Oral, Faculdade
de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, SP,
Brasil

Correspondência:

Rita de Cássia Loiola Cordeiro
Departamento de Clínica Infantil
Faculdade de Odontologia de Araraquara
Universidade Estadual Paulista- UNESP
Rua Humaitá, 1680
Telefone: 55(016) 33016331
Araraquara, São Paulo, Brasil
CEP: 14801-903
e-mail: ritacord@foar.unesp.br

*De acordo com as normas do periódico *Archives of Oral Biology*

Resumo

O efeito crônico do fluoreto no desenvolvimento de fluorose dental é conhecido, porém o papel de outros agentes com possível efeito na amelogênese, como a amoxicilina, não tem sido estudado in vivo. Ainda, a potencialização do efeito do fluoreto no esmalte pela amoxicilina é desconhecida. Assim, o objetivo do estudo foi avaliar o efeito da amoxicilina e da associação amoxicilina e fluoreto no desenvolvimento do esmalte dentário de ratos. Quarenta ratos foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos, expostos ao fluoreto na água (100 ppm (mg F/L) ou à administração intragástrica de amoxicilina (500 mg/Kg peso), segundo as combinações: grupo controle (GS); grupo amoxicilina (GA), grupo fluoreto (GF) e grupo amoxicilina com fluoreto (GA+F). Após 60 dias, os animais sofreram eutanásia e amostras de plasma e uma tibia foram coletados e analisados quanto a concentração de fluoreto (F). Os incisivos também foram coletados para quantificação do grau de fluorose (por um software de análise de imagens, *Dental fluorosis by Image Analysis – DFIA*), determinação da concentração de cálcio (Ca), fósforo (Pi) e fluoreto (F), e análises da espessura do esmalte e de sua dureza. Observou-se que a espessura do esmalte ($p=0,228$) e a concentração de Ca ($p=0,592$) e Pi ($p=0,409$) nos incisivos não diferiram estatisticamente entre os grupos. No entanto, a concentração de F nos tecidos dentário, ósseo e plasma foi maior nos grupos expostos ao fluoreto ($p<0.001$). A análise fotográfica pelo índice DFIA e a microdureza mostraram diferenças significativas entre os grupos ($p<0.001$), sendo que GF apresentou maior severidade de hipomineralização do esmalte, seguido por GA+F e GA. Houve um aumento linear na dureza do esmalte, nas profundidades de 10 μm a 30 μm , sendo esse aumento entre 4 a 5 KHN por μm de profundidade nos GA+F e GF, e entre a 7 a 8 KHN por μm nos grupos GA e GS. Os achados desse estudo mostraram que os animais expostos cronicamente ao fluoreto desenvolveram hipomineralização de esmalte, e a associação da amoxicilina não potencializou a severidade da hipomineralização. Concluímos que a amoxicilina não influenciou o desenvolvimento do esmalte, bem como não potencializou o efeito do fluoreto.

Palavras-Chave: Esmalte dentário, Amoxicilina, Fluorose dentária, Fluoreto de sódio, Ratos.

Introdução

A amelogênese é um processo dinâmico, controlado por interações indutivas entre os tecidos epitelial e mesenquimal⁸². Apesar de geneticamente controlado, esse processo é sensível a distúrbios extracelular, sistêmico ou hereditário, os quais podem produzir alterações permanentemente registradas no esmalte^{2, 17, 78}. As características e a localização destas alterações podem fornecer indícios sobre o tempo e a natureza dos fatores etiológicos, os quais podem ser hereditários como na Amelogênese Imperfeita, adquiridos como na fluorose, e os de causa desconhecida como a Hipomineralização Molar-Incisivo^{2, 84, 87}.

A presença de alta concentração do fluoreto interfere na amelogênese. Essa interferência é dependente do tempo da exposição, concentração da dose, e nível de fluoreto no plasma sanguíneo^{17, 18}. As hipóteses mais aceitas sobre a patogenia da fluorose estão relacionadas à retenção de proteínas como as ameloblastinas e as enamelinas durante a fase de maturação da matriz do esmalte; à alteração na atividade proteolítica dessas proteínas; bem como, alterações crescimento dos cristais. Os estágios de mineralização e maturação são mais susceptíveis ao fluoreto, o qual pode interferir na modulação dos ameloblastos, no número, tamanho e forma dos cristais^{17, 18}. Consequentemente, a porosidade do esmalte é aumentada com subsequentes mudanças ópticas e físicas da superfície do tecido^{17, 61}. Clinicamente, essa porosidade é representada por opacidade branca que varia de finas linhas até um esmalte inteiramente esbranquiçado com aspecto branco-calcário com depressões e opacidades escurecidas⁶¹.

O uso da amoxicilina durante a primeira infância também tem sido associado aos defeitos de esmalte. Em estudo coorte prospectivo, Hong et al.³⁶ (2011) avaliaram crianças expostas a alta concentração de fluoreto, e observaram que o uso da amoxicilina durante os 20-24 primeiros meses de vida aumentou

significativamente o risco aos defeitos de esmalte nessas crianças. Nas crianças com a Hipomineralização Molar-Incisivo (HMI), foi reportado a associação desse defeito ao uso da amoxicilina no primeiro ano de vida^{12, 50, 74, 89}. Contudo, esses estudos não evidenciam se a presença de HMI está relacionada à doença e febre ocorridas previamente ao uso da amoxicilina, ou ao tratamento com o antibiótico, ou a ambos. Para evidenciar o efeito da amoxicilina na formação do esmalte, estudos *in vitro* foram necessários. Laisi et al.⁵⁰ (2009) demonstraram em cultura de ameloblastos que a exposição às altas concentrações de amoxicilina provocou padrões de amelogênese alterados.

Recentemente, Sahlberg et al.⁶⁵ (2013) observaram que uso de amoxicilina associado ao fluoreto pode afetar a estrutura dentária em formação. Culturas de germes dentários expostos simultaneamente ao fluoreto e à amoxicilina apresentaram alteração morfológica nos ameloblastos e redução da espessura de matriz de esmalte formada, indicando atraso no estágio de secreção da matriz do esmalte.

O efeito do fluoreto no desenvolvimento da fluorose dentária em animais expostos cronicamente é bem conhecido, porém não há evidência *in vivo* sobre o papel da amoxicilina com possível efeito na amelogênese. Ainda, a potencialização do efeito do fluoreto no esmalte pela amoxicilina é desconhecida. Diante do exposto, torna-se oportuno investigar o efeito da amoxicilina e da sua associação com fluoreto no desenvolvimento do esmalte dentário de ratos, em doses estimadas para o metabolismo do animal que simulam a exposição clínica a essas substâncias.

Material e Método

Procedimentos experimentais

O estudo foi previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de odontologia de Araraquara (CEUA- FOAr prot. 22/2012). Estudo cego *in vivo* foi realizado utilizando quarenta ratos machos (*Rattus norvegicus, albinus, Holtzman*), com 2-3 meses de idade, pesando

aproximadamente 250 g, que foram mantidos no biotério da FOAr com temperatura ($23 \pm 1^{\circ}\text{C}$) e umidade relativa ($55 \pm 5\%$) controladas, iluminação artificial por lâmpada fluorescente com foto períodos de 12 h claro e 12 h escuro, e receberam ração peletizada sem flúor Biotec (Biobase, Santa Catarina, Brasil) e água *ad libitum*.

Após um período de adaptação de cinco dias, os animais foram divididos, aleatoriamente, em quatro grupos, contendo dez ratos em cada, que receberam os seguintes tratamentos, a cada 24 h:

Grupo sham (GS) – administração intragástrica de água deionizada, em volumes semelhantes ao grupo GA.

Grupo A (GA) – amoxicilina (Eurofarma genéricos, São Paulo, SP, Brasil), intragastricamente, na dose de 500 mg/Kg de peso corpóreo, em suspensão oral.

Grupo F (GF) – água deionizada contendo 100 ppm de fluoreto *ad libitum*, e administração intragástrica de água deionizada, em volumes semelhantes ao grupo GA.

Grupo A+F (GA+F) – intragastricamente, amoxicilina 500 mg/Kg de peso corpóreo, e água deionizada, diariamente, contendo 100 ppm de fluoreto *ad libitum*.

As administrações foram realizadas durante 60 dias, período correspondente à completa renovação dos incisivos⁶⁶. Para preparação da amoxicilina, o conteúdo do frasco foi diluído em água deionizada, na concentração de 500 mg em 5 mL. O tratamento com fluoreto foi preparado por meio da diluição do sal de fluoreto de sódio em água deionizada (221 mg NaF/L), obtendo-se a concentração de 100 ppm de fluoreto (100 mgF/L)^{18, 72}. O volume de água ingerido e a massa corpórea de cada animal foram mensurados a cada 24 h.

Após 60 dias de experimento, os animais sofreram eutanásia com sobredose de Cloridrato de Cetamina a 10% (Cetamin®- Syntec do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) associada ao Cloridrato de Xilazina a 2% (Xilazin®- Syntec do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil). Após a eutanásia, o sangue foi coletado por meio da pulsão

cardíaca utilizando tubetes a vácuo contendo heparina como anticoagulante (BD Vacutainer Blood Collection Tubes, SST II Plus; BD Biosciences, Nova Jersey, EUA), conforme descrito por Beltrame et. al.¹³ (2011). Os incisivos superiores e inferiores, bem como uma tíbia de cada animal foram extraídos, limpos, codificados para análise cega, e estocados em estufa por 60^oC durante 24 h. Todos os incisivos de cada grupo experimental foram divididos, e submetidos às análises fotográfica (*Dental fluorosis by Image Analysis – DFIA*), espessura do esmalte, microdureza, e determinação da concentração de Cálcio (Ca), Fósforo (Pi) e fluoreto (F). As concentrações de F no plasma sanguíneo e tíbias também foram determinadas.

Análise fotográfica

Dez incisivos inferiores de cada grupo foram analisados fotograficamente por meio do método quantitativo denominado *Dental fluorosis by Image Analysis – DFIA*¹⁸. Para tanto, foram fixados em lâmina de cera, de forma que a superfície vestibular, no terço incisal da coroa, ficasse posicionado paralelamente à lente macro (Medical 100 macro, Canon, Nova York, EUA), posicionada e fixada verticalmente à 7 cm acima do dente. As imagens fotográficas foram adquiridas com câmera digital (EOS Rebel XTI, Canon, Nova York, EUA). Da imagem foi selecionada uma área de 690 x 170 pixels, que foi convertida em escala de cinza, com bandas escuras e claras (Figura 1). As áreas selecionadas foram analisadas por um software desenvolvido para esse fim, o qual quantifica a intensidade de pixels das bandas escuras e claras e converte ao índice *DFIA*, que é obtido pela diferença entre I_H (média dos pixels de maior intensidade, correspondente às áreas escuras da imagem original) e I_L (média de pixels de menor intensidade, correspondente às áreas claras da imagem original). A dose-resposta do método *DFIA* foi validada para detectar graus crescentes de fluorose, observados sob exposição a concentrações crescentes de F¹⁸.

Análise da espessura do esmalte

Dez incisivos superiores de cada grupo foram seccionados transversalmente em três regiões (incisal, medial e apical) utilizando um disco diamantado em alta rotação. Cada região foi fixada em bloco de resina acrílica, com a superfície transversal dentária paralela ao plano horizontal. Três medidas de espessura do esmalte de cada região (incisal, medial e apical) foram registradas usando magnificação de 10X em um microdurômetro (Future Tech, modelo FM-7, Kawasaki, Japão) acoplado a um software FM-ARS.

Análise de Microdureza

Dez incisivos superiores de cada grupo foram embutidos em discos de resina acrílica com seu longo eixo paralelo à superfície do disco (Arotec EMB-30, Arotec Ind. Com. LTDA, São Paulo, Brasil) (Figura 2A). Em seguida, foram desgastados até o centro do dente em politriz utilizando lixas d'água de granulação 400 (Arotec APL-4, Arotec Ind. Com. LTDA, São Paulo, Brasil) e polidos em politriz utilizando lixas d'água de granulação crescente 600 a 1200, seguidas de feltro embebido em suspensão diamantada de 1µm. A dureza do esmalte foi medida por meio do microdurômetro (Future Tech, modelo FM-7, Kawasaki, Japão) e penetrador do tipo Knoop, acoplados a um software FM-ARS, em três regiões do dente (incisal, medial e apical). Cada região foi analisada em cinco profundidades a partir da superfície externa do esmalte (10 µm, 20 µm, 30 µm, 50 µm e 70 µm) (Figura 2B). O penetrador Knoop foi aplicado com o eixo axial do diamante paralelo à superfície externa do esmalte com carga de 25 g durante 5 s. Três edentações foram realizadas em cada profundidade (Figura 2B), a média de cada profundidade foi calculada. Os dados foram expressos em KHN (Knoop Hardness Number).

Determinação de fluoreto no plasma sanguíneo

As amostras de plasma foram obtidas após centrifugação a 2.000g por 10 min. 1 mL de cada amostra foi tamponada com TISAB III (Orion Research, Massachusetts, EUA) e submetidas à análise da concentração de F usando um

eletrodo de íon seletivo (Orion Research 96-09; Orion Research Incorporated, Massachusetts, EUA) acoplado ao potenciômetro (Orion Research EA 940; Orion Research Incorporated, Massachusetts, EUA). Previamente às análises, o eletrodo foi calibrado por uma curva padrão para a concentração de F. Os resultados foram expressos por $\mu\text{g F/ml}$ de amostra.

Determinação de fluoreto no osso

Dez tíbias de cada grupo foram secas a 60°C por 24 h, seccionadas transversalmente em fatias de 5 mm na região da diáfise. Para determinação de F, uma secção de cada amostra foi pulverizada e peneirada para obtenção de partículas entre 1 mm e $140\ \mu\text{m}$, que foram mantidas em estufa por 24 h adicionais. Dez mg ($\pm 0,01\ \text{mg}$) de pó foram transferidos para tubos de ensaios contendo ácido clorídrico (HCl) a 0,5 M e colocados em agitação por 1 h. Ao final desse tempo, os tubos foram centrifugados, o sobrenadante coletado e a ele foi adicionado 1,0 mL de TISAB II (tampão acetado a 1,0 M, pH 5,0 com NaCl a 1,0 M e 0,4% CDTA), contendo hidróxido de sódio (NaOH) a 0,5 M, seguido de agitação. A concentração de F foi determinada usando um eletrodo de íon seletivo (Orion Research 96-09; Orion Research Incorporated, Massachusetts, EUA) acoplado ao potenciômetro (Orion Research EA 940; Orion Research Incorporated, Massachusetts, EUA), conforme previamente descrito. Os resultados foram expressos por μg de F/g de osso.

Determinação de cálcio, fósforo e fluoreto nos incisivos

Dez incisivos inferiores de cada grupo foram seccionados transversalmente em três fragmentos apical, médio e incisal. Os fragmentos foram mantidos em estufa 60°C e após 24 h foram pesados, separadamente, pulverizados e peneirados para obtenção de partículas de $140\ \mu\text{m}$ a $1.000\ \mu\text{m}$, que foram mantidas em estufa por 24 h adicionais. Na sequência, 5 mg ($\pm 0,01\ \text{mg}$) de pó foram transferidos para tubos de ensaios contendo ácido clorídrico (HCl) a 0,5 M e colocados em agitação por 1 h. Ao final desse tempo, os tubos foram centrifugados e o sobrenadante coletado para

dosagem de Ca, Pi e F. Esta última foi realizada exatamente como descrito para a concentração de F no osso.

A determinação de Ca foi obtida pela titulação com EDTA, enquanto a determinação de Pi por método colorimétrico^{29, 32, 81}. Para determinação de Ca, na solução da amostra foram adicionados 100 mL água destilada, e 10 mL hidróxido de sódio (NaOH) a 2,0 M e indicador Calcon® (*Sigma-Aldrich*, Missouri, EUA), titulando imediatamente com solução de EDTA (ácido etilenodiamino tetracético dissódico) a 0,01 M^{29, 32, 81}. Ao final da titulação observou-se mudança da coloração violeta para azul. Os resultados foram expressos por g de Ca/g de dente.

Para determinação de Pi, a solução da amostra foi transferida para tubos de ensaios contendo solução de molibdato de sódio (Na₂MoO₄) e solução de ácido ascórbico (C₆H₈O₆) a 5 M, após agitação, foi realizada a leitura da absorbância utilizando-se espectrofotômetro atuando em 680 nm, (Hack, DR 2500, Colorado, EUA)⁸¹. Previamente as leituras, o aparelho foi calibrado com curva de calibração utilizando soluções padrões de Pi de concentrações variadas. Os resultados foram expressos por µg (Pi/g de dente)

Análise Estatística dos dados

A análise estatística dos dados compôs-se da avaliação dos quatro grupos experimentais quanto a espessura do esmalte do dente, índice DFIA, dureza Knoop, concentração de F no plasma, osso e dente, e concentração de Ca e Pi no dente por análises de variância de um fator. As análises foram realizadas por meio do Statistica versão 8.0 (StatSoft Inc, Oklahoma, EUA). Quando houve evidência de diferenças entre grupos, realizaram-se comparações múltiplas de médias pelo teste de Tukey ou pelo teste de Games-Howell, apropriado na presença de heterogeneidade de variâncias. Adotou-se o nível de significância de 5% para a tomada de decisão. Para o estudo do relacionamento entre a profundidade da superfície e a valores de dureza utilizaram-se procedimentos da regressão linear.

Resultados

Nas Tabelas 1 e 2, observa-se, respectivamente, as médias de água ingerida pelos grupos e de massa corpórea dos animais ao longo das seis semanas. Nota-se que não há diferença estatística entre as médias de água ingerida e de massa corpórea entre os grupos.

Tabela 1- Média do consumo de água ingerida pelos, expressa em mL.

Grupo	1 ^a semana	2 ^a Semana	3 ^a Semana	4 ^a Semana	5 ^a Semana	6 ^a Semana
GS	42,48	52,48	38,49	42,40	41,76	41,14
GA	47,86	55,64	53,78	46,65	38,48	40,24
GF	38,78	44,80	35,87	38,91	36,61	35,07
GA+F	42,80	42,01	41,33	38,91	33,67	40,24

Não há diferença significativa entre médias de água ingerida entre os grupos (Anova: $p > 0,05$)

Tabela 2– Média (DP) das massas corporais dos animais, expressa em mg.

Grupo	1 ^a semana	2 ^a Semana	3 ^a Semana	4 ^a Semana	5 ^a Semana	6 ^a Semana
GS	200(9,3)	247(10,0)	297(9,6)	339(8,7)	371(12,1)	380(11,3)
GA	213(2,6)	268(11,9)	321(15,1)	364(18,6)	385(15,7)	401(14,8)
GF	197(6,6)	241(10,3)	301(12,9)	340 (17,0)	366(13,7)	369(19,5)
GA+F	200(8,8)	260 (7,3)	305(10,4)	346(11,2)	346(11,5)	379(16,5)

Não há diferença significativa entre médias de massa corpórea dos grupos (Anova: $p > 0,05$)

Na Tabela 3, observa-se as médias e desvios padrão das medidas de espessura do esmalte dentário, em μm , e do índice DFIA, determinante da severidade da hipomineralização, de acordo com os grupos experimentais em estudo. Não houve diferenças significativas entre as médias de espessura do esmalte. Por outro lado, diferenças entre médias do índice DFIA foram observadas entre grupos expostos (GF e GA+F) e não expostos ao fluoreto (GS e GA). Por meio do teste de Tukey, observa-se que menor média correspondeu ao GS e a maior ao GF, enquanto os grupos GA e GA+F apresentaram médias intermediárias, sem diferença entre si, a primeira próxima ao GS e a segunda próxima a GF (Tabela 3). O índice DFIA

quantificou as alterações na superfície do esmalte causadas pela exposição ao fluoreto, visíveis macroscopicamente (Figura 3).

Tabela 3 – Média (DP) de espessura da matriz do esmalte, em μm , e do índice DFIA.

Grupo	Espessura do esmalte ⁽ⁱ⁾	Índice DFIA ⁽ⁱⁱ⁾
GS	117,8 (9,5) ^a	1,3 (0,9) ^a
GA	123,1 (10,0) ^a	1,8 (1,0) ^{ab}
GF	122,2 (9,7) ^a	4,5 (1,4) ^c
GA+F	119,4 (9,0) ^a	3,2 (1,9) ^{bc}

(i) Não há diferença significativa entre médias de espessura (Anova: $p > 0,05$)

(ii) Médias de DFIA acompanhadas de letras iguais não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p > 0,05$)

Tabela 4 apresenta as médias e desvios padrão de dureza Knoop. Os valores de dureza foram analisados considerando o valor médio das regiões apical, média e incisal. São apresentados os coeficientes angulares e os coeficientes de correlação de duas regressões lineares estabelecidas para as profundidades de 10 a 30 μm . De acordo com as análises de variância, GA+F e GF apresentaram médias de dureza equivalentes e as menores do que as médias de GA e GS, em todas as profundidades avaliadas. Apenas na profundidade de 10 μm , GA diferiu do controle (GS). As regressões mostraram aumento linear de dureza no intervalo de profundidade de 10 μm a 30 μm , aproximadamente, 5 KHN por μm de profundidade em GA+F e GF, e aproximadamente 8 KHN por μm em GA e GS. No intervalo de 50 a 70 μm as durezas se estabilizaram (Tabela 4). Esses resultados são visualizados na Figura 4, onde estão representadas as médias amostrais de dureza Knoop, acompanhados de intervalos de confiança de 95%.

Tabela 4 – Média (DP) de dureza Knoop (KHN). Estimativas do coeficiente angular e do erro padrão: CA(EP) e do coeficiente de correlação (r).

Grupo	Profundidade (µm)					CA ⁽ⁱ⁾ (EP)	r ⁽ⁱ⁾
	10	20	30	50	70		
GS	148,1 ^c (47,6)	233,6 (43,2)	306,3 (46,8)	354,3 (29,6)	352,2 ^b (31,3)	7,9 (1,0)	0,83 [*]
GA	130,5 ^{bc} (35,0)	202,5 (31,2)	271,8 (29,1)	336,5 (22,0)	336,6 ^b (31,9)	7,1 (0,7)	0,89 [*]
GF	79,5 ^a (18,4)	114,0 (23,9)	158,7 (54,3)	191,4 (46,0)	179,1 ^a (47,0)	4,0 (0,8)	0,69 [*]
GA+F	102,5 ^{ab} (22,5)	145,6 (27,9)	211,3 (54,8)	226,0 (43,4)	212,3 ^a (44,7)	5,4 (0,9)	0,78 [*]

Nota: médias de grupos nas colunas acompanhadas de letras iguais não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey (p>0,05). O resultado é o mesmo para as profundidade de 20 a 70 mm.

(i) regressão linear no intervalo de profundidades de 10 a 30 µm. Coeficiente de correlação linear (r): ^{*} significativo (p<0,05)

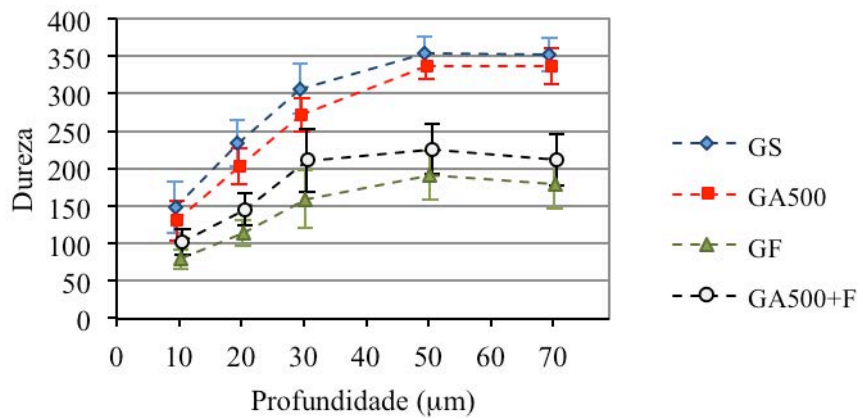


Figura 4 – Médias amostrais (símbolos) de dureza Knoop e intervalos de confiança de 95% para as médias (barras verticais).

Na Tabelas 5, estão os valores das concentrações de fluoreto, respectivamente, no plasma, osso e dente. Na Tabela 6, estão os valores das concentrações de Ca e Pi no dente. Destaque-se que para as determinações de F, Ca e Pi foram realizadas medições nas regiões incisal, médio e apical. Como anteriormente, os resultados foram representados pela média dessas regiões. As análises de variância apontaram diferença significativa entre as médias de concentrações de fluoreto no plasma, no osso e no dente. Os grupos expostos ao fluoreto, GA+F e GF, mostram maiores valores, do que os grupos não expostos GA e GS (Tabela 5). Por outro lado, as médias de concentrações tanto de Ca como de Pi não evidenciaram diferenças significativas entre os quatro grupos (Tabela 6).

Tabela 5 – Média (DP) de concentração de F, expressa em $\mu\text{g/g}$ do osso ou dente e, em $\mu\text{g/mL}$ do plasma.

Grupo	Plasma	Osso	Dente
GS	0,02 (0,01) ^a	97,3 (20,5) ^a	35,6 (10,0) ^a
GA	0,05 (0,04) ^a	81,6 (27,7) ^a	45,6 (20,0) ^a
GF	0,38 (0,15) ^b	2250,3 (270,7) ^b	1907,0 (732,8) ^b
GA+F	0,25 (0,13) ^b	2243,4 (470,3) ^b	2560,2 (894,7) ^b

Nota: Médias de grupos na coluna acompanhadas de letras iguais não são significativamente diferentes pelo teste de Games-Howell ($p > 0,05$)

Tabela 6 – Média (DP) de concentração de Ca e Pi no dente, expressa em g/g de dente.

Grupo	Cálcio	Fósforo
GS	256,40 (20,0) ^a	134,4 (18,9) ^a
GA	250,67 (23,1) ^a	136,6 (27,7) ^a
GF	248,33 (16,1) ^a	121,1 (11,0) ^a
GA+F	256,78 (14,5) ^a	126,7 (25,4) ^a

Nota: Não há diferença significativa entre médias de grupos (Anovas: $p > 0,05$)

Discussão

O modelo em ratos é o mais utilizado em estudo de fluorose devido à concentração plasmática de fluoreto associada às lesões hipomineralizadas serem da mesma ordem de grandeza daquelas que podem ocorrer em humanos^{6, 64}. Outras particularidades deste modelo que auxilia no estudo da fluorose é crescimento contínuo dos incisivos e pigmentação marrom-alaranjada do esmalte devido à incorporação do ferro, os quais são considerados indicadores biológicos pois registra permanentemente o efeito de drogas por meio de alterações superficiais macroscópicas^{47, 66}.

Para que as alterações encontradas possam mimetizar as alterações em humanos, houve a necessidade de doses mais altas de amoxicilina e de fluoreto, uma vez que o metabolismo do rato e humano não são similares. A severidade da alteração do esmalte pode ser quantificada e correlacionada ao grau de agressão ocasionado pelo fluoreto, por meio da concentração do fluoreto no plasma⁶⁴. A dose de 500 mg/kg de amoxicilina por dia foi estimada simulando a exposição da criança à amoxicilina nos primeiros anos de vida, de acordo com a Academia Americana de Pediatria⁵.

Para certificar que houve exposição dos fatores estudados em toda a extensão do dente, bem como evitar viés devido às possíveis diferenças biológicas nas diferentes regiões dos dentes, os mesmos foram segmentados em três regiões, incisal, média e apical, para as análises. Entretanto, não foram observadas diferenças estatística entre as regiões, viabilizando a utilização dos valores médios das regiões.

Os resultados evidenciaram que os animais que receberam apenas o fluoreto (GF), e o fluoreto associado à amoxicilina (GA+F) tiveram os valores de dureza significativamente menores. Acreditamos que a maior severidade das alterações encontradas no esmalte esteja relacionada ao aumento significativo das concentrações de fluoreto no plasma, osso, e no dente, corroborando com Catani et al.¹⁸ (2010) e Richards et al.⁶⁴ (1990), que quantificaram essa correlação. Ademais, sabe-se que não há mecanismos de homeostase para a concentração do fluoreto no sangue. Após sua absorção, permanece por um período de tempo no tecido ósseo,

consequentemente há liberação do fluoreto para o sangue, e localmente para os tecidos adjacentes ao esmalte em maturação, contribuindo para o aumento da severidade da fluorose⁷.

Observou-se também um aumento linear de dureza nas profundidades de 10 a 30 µm em todos os grupos. Nos grupos GF e GA+F o aumento foi de aproximadamente 5 KHN, enquanto nos grupos GS e GA o aumento foi, aproximadamente, 8 KHN por mm de profundidade. Esses dados sugerem que a exposição ao fluoreto provocou alterações em todas as profundidades do esmalte. A análise de microdureza tem sido empregada na literatura para avaliar defeitos de esmalte induzido pelo fluoreto, pois representa um indicador indireto do grau de mineralização dental⁵². Catani et al.¹⁸ (2010) observaram in vivo que a exposição ao fluoreto causou diminuição na dureza superficial do esmalte na profundidade de 10 µm. Os autores sugerem que essa alteração possa estar relacionada com alterações no tamanho, formato e qualidade dos prismas de esmalte.

É conhecido que o fluoreto altera a pigmentação natural do incisivo pelos íons de ferro, apresentando um padrão de bandas/estrias alaranjadas e brancas⁴⁶. Baseado nesse padrão de bandas, o índice DFIA quantifica essa hipomineralização. Neste estudo, os grupos experimentais GF e GA+F apresentaram os mais altos valores do índice DFIA, indicando maior severidade da Fluorose dentária na presença do fluoreto. Os índices DFIA para o grupo controle foi 1,3. O GF, que recebeu 100 mgF/L, apresentou valores de 4,5, valores semelhantes aos observados por Catani et al.¹⁸ (2010), que encontraram 1,1, 3,4 e 4,1 nos grupos controle e experimentais de 25 µgF/mL, e de 37,5 µgF/mL, respectivamente.

Com relação aos grupos expostos à amoxicilina, observou-se que GA apresentou índice DFIA semelhante ao grupo controle, enquanto o GA+F obteve menores valores do que GF. Esses dados sugerem que a exposição à amoxicilina não influenciou os valores do índice, e a associação da amoxicilina ao fluoreto não potencializou a alteração causada pelo fluoreto, conforme descrito por Sahlberg et al.⁶⁵ (2013). Em cultura de germes dentários, maior severidade de alterações morfológicas na camada de ameloblastos e redução da quantidade de esmalte formado foram observados nos grupos expostos ao fluoreto e amoxicilina, indicando

uma potencialização do efeito do fluoreto. Estudos sugerem que a amoxicilina possa interferir na amelogênese^{50, 65}, porém não há evidências sobre os mecanismos patogênicos dessa possível influência, como já está fundamentado no desenvolvimento da fluorose dentária, e portanto, sugerimos que o índice DFIA, fundamentado para análise da fluorose, não seja suficientemente sensível para analisar a possível alteração de esmalte provocada pela amoxicilina.

Na análise da espessura do esmalte não se observou diferença significativa entre os grupos, contrariando os estudos que demonstraram alteração na espessura do esmalte após a exposição à amoxicilina, ao fluoreto ou a ambos^{51, 65, 91}. Laisi et al.⁵⁰ (2009) observaram, em cultura de germe de primeiro molar de ratos expostos a doses acima de 1 mg/mL amoxicilina, maior espessura do esmalte, sugerindo possível influência da amoxicilina na função do ameloblasto e possível aceleração da aposição da matriz do esmalte. Por outro lado, Sahlberg et al.⁶⁵ (2013) observaram que a combinação de altas doses de fluoreto (12 µM) com amoxicilina (2 mg/mL) reduziu significativamente a quantidade de esmalte formado, confirmando os achados de Zhou et al.⁹¹ (1996) que ao avaliar, por meio da microscopia de luz, incisivos de ratos expostos cronicamente ao fluoreto em doses de 75 e 100 ppm de fluoreto, observaram atraso da degradação e reabsorção das proteínas de matriz. Acreditamos que os dados controversos sejam em função de diferenças metodologias adotadas. Apesar da utilização de doses similares, as pesquisas não apresentam padronização entre os métodos de análise e/ou organismos analisados. Em acréscimo, consideramos que a exposição crônica ao fluoreto pode induzir alterações no estágio de maturação do esmalte, sem causar mudanças morfológicas no estágio de secreção, corroborando com os pressupostos sobre a patogenia da fluorose dentária^{17, 18, 23, 72}.

As concentrações de cálcio e fósforo do esmalte dentário não diferiram significativamente entre grupos tratados e controle. A relação do fluoreto com a biodisponibilidade do íon Cálcio é um dos pontos estudados da patogênese da fluorose dentária. Estudos *in situ* e em animais evidenciaram que altas doses de fluoreto diminuem o nível de Cálcio disponível durante a mineralização^{7, 17}. Entretanto, o nível de cálcio é modulado pela concentração plasmática, de forma que

mesmo com flutuações nos sítios de mineralização, não se observa distúrbios na concentração de cálcio tecidual^{7, 8}. Esses achados corroboram com estudos que avaliaram as concentrações de cálcio e fósforo em dentes com fluorose em coelhos⁸⁰ e a HMI em dentes humanos²⁴. Ambos observaram diminuição significativa da dureza nos dentes afetados quando comparados ao controle, porém as concentrações dos minerais não diferiram do grupo controle. Os autores sugerem que a exposição crônica ao fluoreto resulta em uma matriz de esmalte com maior quantidade de cálcio e fósforo amorfos do que organizados na estrutura cristalina^{24, 67}.

Conclui-se que a exposição ao fluoreto ou associação fluoreto e amoxicilina durante amelogênese causou hipomineralizações no esmalte, porém a amoxicilina não potencializou o efeito provocado pelo fluoreto. Já a exposição apenas à amoxicilina não provocou alterações significantes. Mais estudos são necessários para evidenciar possíveis mecanismos envolvidos no efeito da amoxicilina nos ameloblastos e nos aspectos morfológicos do esmalte.

Agradecimentos

Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela contemplação de uma bolsa de doutorado para o primeiro autor do trabalho. Ao Sr. Waldomiro Vieira Filho pela valiosa contribuição na assistência técnica do estudo. Os autores afirmam que nesse estudo não houve conflito de interesse.

Referências

1. Abe T, Miyajima H, Okada K. Effects of a macrolide antibiotic on enamel formation in rat incisors--primary lesion of ameloblast at the transition stage. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science* 2003;65:985-8.
2. Alaluusua S. Aetiology of Molar-Incisor Hypomineralisation: A systematic review. *European archives of paediatric dentistry : official journal of the European Academy of Paediatric Dentistry* 2010;11:53-8.
3. Alaluusua S, Lukinmaa PL. Developmental dental toxicity of dioxin and related compounds--a review. *International dental journal* 2006;56:323-31.
4. Alaluusua S, Lukinmaa PL, Koskimies M, Pirinen S, Holtta P, Kallio M, et al. Developmental dental defects associated with long breast feeding. *European journal of oral sciences* 1996;104:493-7.
5. American Academy of Pediatrics Subcommittee on Management of Acute Otitis M. Diagnosis and management of acute otitis media. *Pediatrics* 2004;113:1451-65.
6. Angmar-Mansson B, Whitford GM. Plasma fluoride levels and enamel fluorosis in the rat. *Caries research* 1982;16:334-9.
7. Aoba T, Fejerskov O. Dental fluorosis: chemistry and biology. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists* 2002;13:155-70.
8. Aoba T, Moreno EC. Changes in the solubility of enamel mineral at various stages of porcine amelogenesis. *Calcified tissue international* 1992;50:266-72.
9. Arrow P. Risk factors in the occurrence of enamel defects of the first permanent molars among schoolchildren in Western Australia. *Community dentistry and oral epidemiology* 2009;37:405-15.
10. Bartlett JD, Beniash E, Lee DH, Smith CE. Decreased mineral content in MMP-20 null mouse enamel is prominent during the maturation stage. *Journal of dental research* 2004;83:909-13.
11. Beentjes VE, Weerheijm KL, Groen HJ. Factors involved in the aetiology of molar-incisor hypomineralisation (MIH). *European journal of paediatric dentistry : official journal of European Academy of Paediatric Dentistry* 2002;3:9-13.
12. Beentjes VE, Weerheijm KL, Groen HJ. [Factors involved in the etiology of hypomineralized first permanent molars]. *Nederlands tijdschrift voor tandheelkunde* 2002;109:387-90.
13. Beltrame FL, Caneguim BH, Miraglia SM, Cerri PS, Sasso-Cerri E. Vitamin B12 supplement exerts a beneficial effect on the seminiferous epithelium of cimetidine-treated rats. *Cells, tissues, organs* 2011;193:184-94.
14. Bergus GR, Levy BT, Levy SM, Slager SL, Kiritsy MC. Antibiotic use during the first 200 days of life. *Archives of family medicine* 1996;5:523-6.
15. Bergus GR, Levy SM, Kirchner HL, Warren JJ, Levy BT. A prospective study of antibiotic use and associated infections in young children. *Paediatric and perinatal epidemiology* 2001;15:61-7.
16. Bronckers AL, Jansen LL, Woltgens JH. Long-term (8 days) effects of exposure to low concentrations of fluoride on enamel formation in hamster tooth-germs in organ culture in vitro. *Archives of oral biology* 1984;29:811-9.
17. Bronckers AL, Lyaruu DM, DenBesten PK. The impact of fluoride on ameloblasts and the mechanisms of enamel fluorosis. *Journal of dental research* 2009;88:877-93.
18. Catani DB, Tenuta LM, Andalo FA, Cury JA. Fluorosis in rats exposed to oscillating chronic fluoride doses. *Brazilian dental journal* 2010;21:32-7.
19. Cerri PS, Pereira-Junior JA, Biselli NB, Sasso-Cerri E. Mast cells and MMP-9 in the lamina propria during eruption of rat molars: quantitative and immunohistochemical evaluation. *Journal of anatomy* 2010;217:116-25.
20. Crombie FA, Manton DJ, Weerheijm KL, Kilpatrick NM. Molar incisor hypomineralization: a survey of members of the Australian and New Zealand Society of Paediatric Dentistry. *Australian dental journal* 2008;53:160-6.

21. da Costa-Silva CM, Jeremias F, de Souza JF, Cordeiro Rde C, Santos-Pinto L, Zuanon AC. Molar incisor hypomineralization: prevalence, severity and clinical consequences in Brazilian children. *International journal of paediatric dentistry / the British Paedodontic Society [and] the International Association of Dentistry for Children* 2010;20:426-34.
22. da Cunha LF, Tomita NE. Dental fluorosis in Brazil: a systematic review from 1993 to 2004. *Cadernos de saude publica* 2006;22:1809-16.
23. DenBesten PK, Thariani H. Biological mechanisms of fluorosis and level and timing of systemic exposure to fluoride with respect to fluorosis. *Journal of dental research* 1992;71:1238-43.
24. Fagrell TG, Dietz W, Jalevik B, Noren JG. Chemical, mechanical and morphological properties of hypomineralized enamel of permanent first molars. *Acta odontologica Scandinavica* 2010;68:215-22.
25. Farah R, Drummond B, Swain M, Williams S. Linking the clinical presentation of molar-incisor hypomineralisation to its mineral density. *International journal of paediatric dentistry / the British Paedodontic Society [and] the International Association of Dentistry for Children* 2010;20:353-60.
26. Farah RA, Swain MV, Drummond BK, Cook R, Atieh M. Mineral density of hypomineralised enamel. *Journal of dentistry* 2010;38:50-8.
27. FDI. Fédération Dentaire Internationale. Commission on Oral Health, Research and Epidemiology. A review of the developmental defects of enamel index (DDE Index). Commission on Oral Health, Research & Epidemiology. Report of an FDI Working Group. *International dental journal* 1992;42:411-26.
28. Fearne J, Anderson P, Davis GR. 3D X-ray microscopic study of the extent of variations in enamel density in first permanent molars with idiopathic enamel hypomineralisation. *British dental journal* 2004;196:634-8; discussion 25.
29. Ferrazzano GF, Cantile T, Quarto M, Ingenito A, Chianese L, Addeo F. Protective effect of yogurt extract on dental enamel demineralization in vitro. *Australian dental journal* 2008;53:314-9.
30. Fincham AG, Moradian-Oldak J, Simmer JP. The structural biology of the developing dental enamel matrix. *Journal of structural biology* 1999;126:270-99.
31. Fincham AG, Simmer JP. Amelogenin proteins of developing dental enamel. *Ciba Foundation symposium* 1997;205:118-30; discussion 30-4.
32. Flaschka HA. *EDTA Titrations in introduction to theory and practice*. Oxford: Ed Pergamon Press; 1964.
33. Gunduz B, Karakas A, Terzi H, Oner J, Serin E, Kukner A. The effect of pinealectomy and leptin hormone on the proliferation and apoptosis activation in Syrian hamster testis in different photoperiods. *International journal of andrology* 2009;32:343-52.
34. He B, Huang S, Jing J, Hao Y. Measurement of hydroxyapatite density and Knoop hardness in sound human enamel and a correlational analysis between them. *Archives of oral biology* 2010;55:134-41.
35. Hong L, Levy SM, Warren JJ, Bergus GR, Dawson DV, Wefel JS, et al. Primary tooth fluorosis and amoxicillin use during infancy. *Journal of public health dentistry* 2004;64:38-44.
36. Hong L, Levy SM, Warren JJ, Broffitt B. Amoxicillin use during early childhood and fluorosis of later developing tooth zones. *Journal of public health dentistry* 2011;71:229-35.
37. Hong L, Levy SM, Warren JJ, Dawson DV, Bergus GR, Wefel JS. Association of amoxicillin use during early childhood with developmental tooth enamel defects. *Archives of pediatrics & adolescent medicine* 2005;159:943-8.
38. Jalevik B. Enamel hypomineralization in permanent first molars. A clinical, histomorphological and biochemical study. *Swedish dental journal Supplement* 2001:1-86.
39. Jalevik B, Dietz W, Noren JG. Scanning electron micrograph analysis of hypomineralized enamel in permanent first molars. *International journal of paediatric dentistry / the British Paedodontic Society [and] the International Association of Dentistry for Children* 2005;15:233-40.

40. Jalevik B, Klingberg G. Treatment outcomes and dental anxiety in 18-year-olds with MIH, comparisons with healthy controls - a longitudinal study. *International journal of paediatric dentistry / the British Paedodontic Society [and] the International Association of Dentistry for Children* 2012;22:85-91.
41. Jalevik B, Noren JG. Enamel hypomineralization of permanent first molars: a morphological study and survey of possible aetiological factors. *International journal of paediatric dentistry / the British Paedodontic Society [and] the International Association of Dentistry for Children* 2000;10:278-89.
42. Jalevik B, Odelius H, Dietz W, Noren J. Secondary ion mass spectrometry and X-ray microanalysis of hypomineralized enamel in human permanent first molars. *Archives of oral biology* 2001;46:239-47.
43. Jasulaityte L, Weerheijm KL, Veerkamp JS. Prevalence of molar-incisor-hypomineralisation among children participating in the Dutch National Epidemiological Survey (2003). *European archives of paediatric dentistry : official journal of the European Academy of Paediatric Dentistry* 2008;9:218-23.
44. Jeremias F, de Souza JF, Silva CM, Cordeiro Rde C, Zuanon AC, Santos-Pinto L. Dental caries experience and Molar-Incisor Hypomineralization. *Acta odontologica Scandinavica* 2013;71:870-6.
45. Katchburian E, Arana V. Esmalte. In: *Histologia e embriologia oral: texto, atlas, correlações clínicas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002:171-203.
46. Kato K, Nakagaki H, Sakakibara Y. Effect of fluoride on pigmentation and iron distribution in the enamel of rats incisors. *Aichi Gakuin Daigaku Shigakkai Shi* 1987;25:176-82.
47. Kuijpers MH, van de Kooij AJ, Slootweg PJ. Review article. The rat incisor in toxicologic pathology. *Toxicologic pathology* 1996;24:346-60.
48. Kumazawa K, Sawada T, Yanagisawa T, Shintani S. Effect of single-dose amoxicillin on rat incisor odontogenesis: a morphological study. *Clinical oral investigations* 2012;16:835-42.
49. Kuscu OO, Sandalli N, Dikmen S, Ersoy O, Tatar I, Turkmen I, et al. Association of amoxicillin use and molar incisor hypomineralization in piglets: Visual and mineral density evaluation. *Archives of oral biology* 2013.
50. Laisi S, Ess A, Sahlberg C, Arvio P, Lukinmaa PL, Alaluusua S. Amoxicillin may cause molar incisor hypomineralization. *Journal of dental research* 2009;88:132-6.
51. Laisi S, Kiviranta H, Lukinmaa PL, Vartiainen T, Alaluusua S. Molar-incisor-hypomineralisation and dioxins: new findings. *European archives of paediatric dentistry : official journal of the European Academy of Paediatric Dentistry* 2008;9:224-7.
52. Lazzari EP. *Dental Biochemistry*. Philadelphia; 1976: 390.
53. Leite GAS, R.M.M. S, J.M. T, Porto IM, Souza FB, Gerlach RF. Exposure to lead exacerbates dental fluorosis. *Archives of oral biology* 2011;56:695-702.
54. Lundgren T, Persson LG, Engstrom EU, Chabala J, Levi-Setti R, Noren JG. A secondary ion mass spectroscopic study of the elemental composition pattern in rat incisor dental enamel during different stages of ameloblast differentiation. *Archives of oral biology* 1998;43:841-8.
55. Mahoney EK, Rohanizadeh R, Ismail FS, Kilpatrick NM, Swain MV. Mechanical properties and microstructure of hypomineralised enamel of permanent teeth. *Biomaterials* 2004;25:5091-100.
56. Mangum JE, Crombie FA, Kilpatrick N, Manton DJ, Hubbard MJ. Surface integrity governs the proteome of hypomineralized enamel. *Journal of dental research* 2010;89:1160-5.
57. Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian journal of biology = Revista brasleira de biologia* 2002;62:609-14.
58. Massa LF, Bradaschia-Correa V, Arana-Chavez VE. Immunocytochemical study of amelogenin deposition during the early odontogenesis of molars in alendronate-treated newborn rats. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 2006;54:713-25.
59. Nanci A. Enamel: Composition, Development and Structure. In: Nanci A, ed. *Ten Cate's Oral Histology, Development, Structure, and Function*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008:141-90.

60. Nanci A, Zalzal S, Lavoie P, Kunikata M, Chen W, Krebsbach PH, et al. Comparative immunochemical analyses of the developmental expression and distribution of ameloblastin and amelogenin in rat incisors. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 1998;46:911-34.
61. Ng F, Manton DJ. Aesthetic management of severely fluorosed incisors in an adolescent female. *Australian dental journal* 2007;52:243-8.
62. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. Antibacterial drugs. In: *Rang & Dale's Pharmacology*. UK: Elsevier Health Sciences UK, 2011.
63. Reith EJ. The stages of amelogenesis as observed in molar teeth of young rats. *Journal of ultrastructure research* 1970;30:111-51.
64. Richards A. Nature and mechanisms of dental fluorosis in animals. *Journal of dental research* 1990;69 Spec No:701-5; discussion 21.
65. Sahlberg C, Pavlic A, Ess A, Lukinmaa PL, Salmela E, Alaluusua S. Combined effect of amoxicillin and sodium fluoride on the structure of developing mouse enamel in vitro. *Archives of oral biology* 2013.
66. Schours I, Massler M. The teeth. In: Farris EJ, Griffith JQ, eds. *The rat in laboratory investigation*: Hafner Publishing Co: New York, 1963:104-60.
67. Shinoda H. Effect of long-term administration of fluoride on physico-chemical properties of the rat incisor enamel. *Calcified tissue research* 1975;18:91-100.
68. Simmer JP, Hu JC. Expression, structure, and function of enamel proteinases. *Connective tissue research* 2002;43:441-9.
69. Simmer JP, Papagerakis P, Smith CE, Fisher DC, Rountrey AN, Zheng L, et al. Regulation of dental enamel shape and hardness. *Journal of dental research* 2010;89:1024-38.
70. Smith CE. Cellular and chemical events during enamel maturation. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists* 1998;9:128-61.
71. Smith CE, Hu Y, Richardson AS, Bartlett JD, Hu JC, Simmer JP. Relationships between protein and mineral during enamel development in normal and genetically altered mice. *European journal of oral sciences* 2011;119 Suppl 1:125-35.
72. Smith CE, Nanci A, Denbesten PK. Effects of chronic fluoride exposure on morphometric parameters defining the stages of amelogenesis and ameloblast modulation in rat incisors. *The Anatomical record* 1993;237:243-58.
73. Smith CE, Nanci A. Overview of morphological changes in enamel organ cells associated with major events in amelogenesis. *The International journal of developmental biology* 1995;39:153-61.
74. Souza JF, Costa-Silva CM, Jeremias F, Santos-Pinto L, Zuanon AC, Cordeiro RC. Molar incisor hypomineralisation: possible aetiological factors in children from urban and rural areas. *European archives of paediatric dentistry : official journal of the European Academy of Paediatric Dentistry* 2012;13:164-70.
75. Souza JF, Jeremias F, Costa Silva CM, Santos-Pinto L, Zuanon AC, Cordeiro Rde C. Hipomineralización Incisivo y molar: Diagnóstico diferencial. *Acta Odontol Venezolana* 2011;49:1- 8.
76. Souza JF, Jeremias F, Costa-Silva CM, Santos-Pinto L, Zuanon AC, Cordeiro RC. Aetiology of molar-incisor hypomineralisation (MIH) in Brazilian children. *European archives of paediatric dentistry : official journal of the European Academy of Paediatric Dentistry* 2013.
77. Soviero V, Haubek D, Trindade C, Da Matta T, Poulsen S. Prevalence and distribution of demarcated opacities and their sequelae in permanent 1st molars and incisors in 7 to 13-year-old Brazilian children. *Acta Odontol Scand* 2009;67:170-5.
78. Suckling GW. Developmental defects of enamel-historical and present-day perspectives of their pathogenesis. *Advances in dental research* 1989;3:87-94.
79. Suckling GW, Nelson DG, Patel MJ. Macroscopic and scanning electron microscopic appearance and hardness values of developmental defects in human permanent tooth enamel. *Advances in dental research* 1989;3:219-33.
80. Susheela AK, Bhatnagar M. Fluoride toxicity: a biochemical and scanning electron microscopic study of enamel surface of rabbit teeth. *Archives of toxicology* 1993;67:573-9.

81. Svehla G. *Vogel's Qualitative Inorganic Analysis*: Pearson Education; 2008.
82. Thesleff I, Keranen S, Jernvall J. Enamel knots as signaling centers linking tooth morphogenesis and odontoblast differentiation. *Advances in dental research* 2001;15:14-8.
83. Tredwin CJ, Scully C, Bagan-Sebastian JV. Drug-induced disorders of teeth. *Journal of dental research* 2005;84:596-602.
84. Weerheijm KL. Molar incisor hypomineralization (MIH): clinical presentation, aetiology and management. *Dental update* 2004;31:9-12.
85. Weerheijm KL, Duggal M, Mejare I, Papagiannoulis L, Koch G, Martens LC, et al. Judgement criteria for molar incisor hypomineralisation (MIH) in epidemiologic studies: a summary of the European meeting on MIH held in Athens, 2003. *European journal of paediatric dentistry : official journal of European Academy of Paediatric Dentistry* 2003;4:110-3.
86. Weerheijm KL, Groen HJ, Beentjes VE, Poorterman JH. Prevalence of cheese molars in eleven-year-old Dutch children. *ASDC journal of dentistry for children* 2001;68:259-62, 29.
87. Weerheijm KL, Jalevik B, Alaluusua S. Molar-incisor hypomineralisation. *Caries research* 2001;35:390-1.
88. Westergaard J. Structural changes induced by tetracycline in secretory ameloblasts in young rats. *Scandinavian journal of dental research* 1980;88:481-95.
89. Whatling R, Fearn J. Molar incisor hypomineralization: a study of aetiological factors in a group of UK children. *International journal of paediatric dentistry / the British Paedodontic Society [and] the International Association of Dentistry for Children* 2008;18:155-62.
90. Xie ZH, Mahoney EK, Kilpatrick NM, Swain MV, Hoffman M. On the structure-property relationship of sound and hypomineralized enamel. *Acta biomaterialia* 2007;3:865-72.
91. Zhou R, Zaki AE, Eisenmann DR. Morphometry and autoradiography of altered rat enamel protein processing due to chronic exposure to fluoride. *Archives of oral biology* 1996;41:739-47.

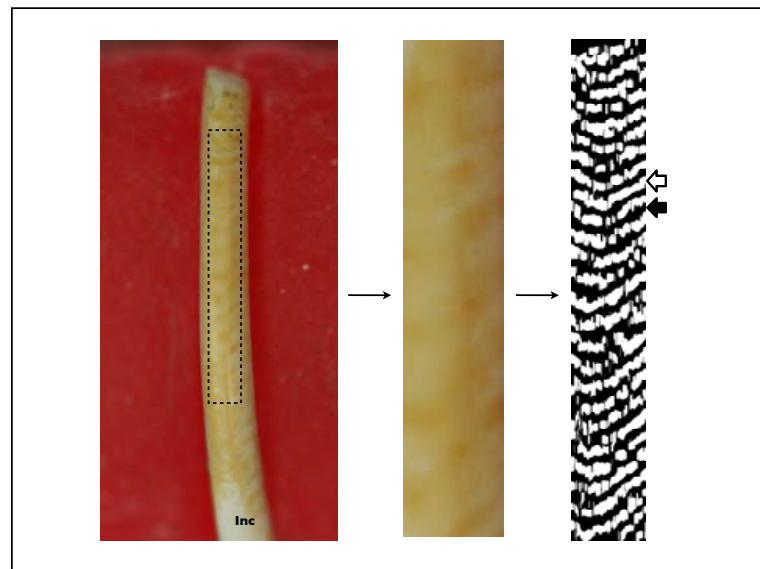


Figura 1: Representação esquemática do índice DFIA para quantificação da fluorose. (Inc) incisivo inferior, indicando a área delimitada para análise, seta escura indicando as bandas de maior intensidade de pixel, e seta clara indicando as bandas de menor intensidade de pixel.

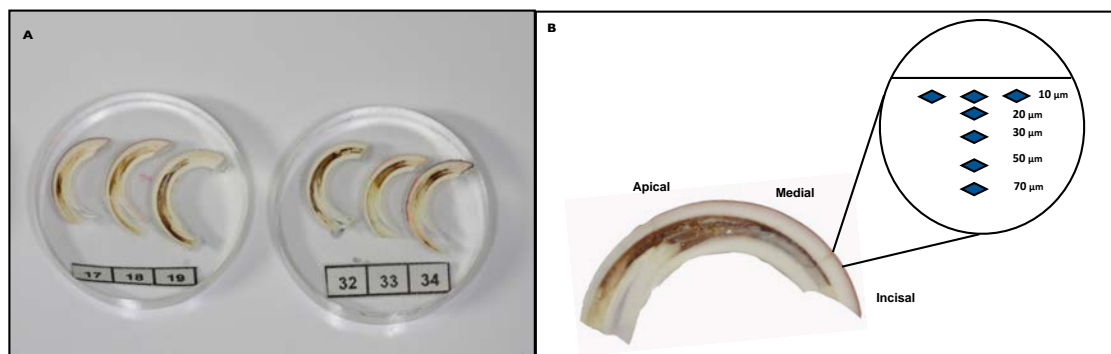


Figura 2: Em A, Incisivos superiores embutidos em discos de resina acrílica para análise de microdureza. Em B, representação esquemática da análise de microdureza, das regiões incisal, medial e apical nas diferentes profundidades.

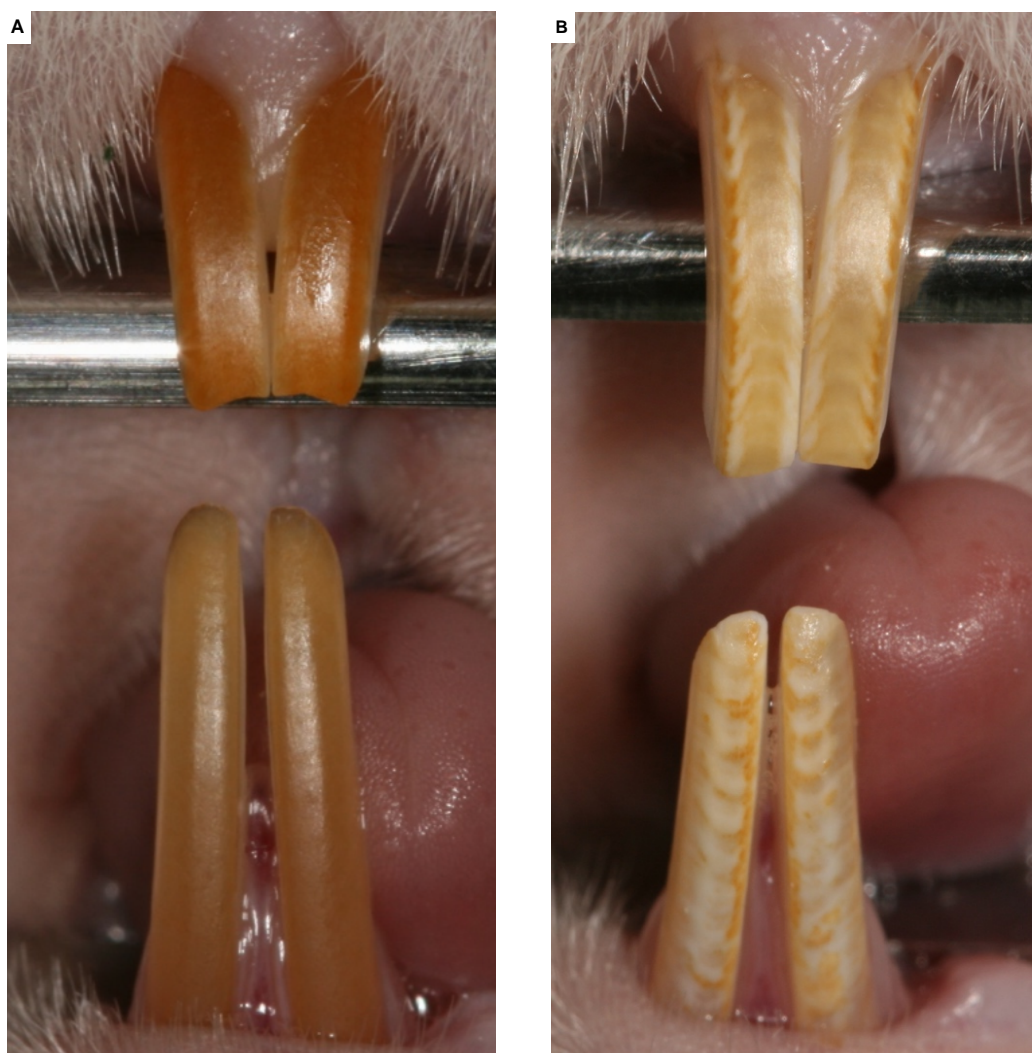


Figura 3: Incisivos superiores e inferiores de animais após 60 dias de tratamento. Em **A**, imagem representativa de animais não expostos ao fluoreto (GS e GA), observa-se aspecto de normal e homogêneo da superfície do esmalte em ratos. Em **B**, imagem representativa de animais expostos ao fluoreto (GF e GA+F), nota-se o aspecto estriado com bandas claras e escuras provocadas pelo fluoreto.



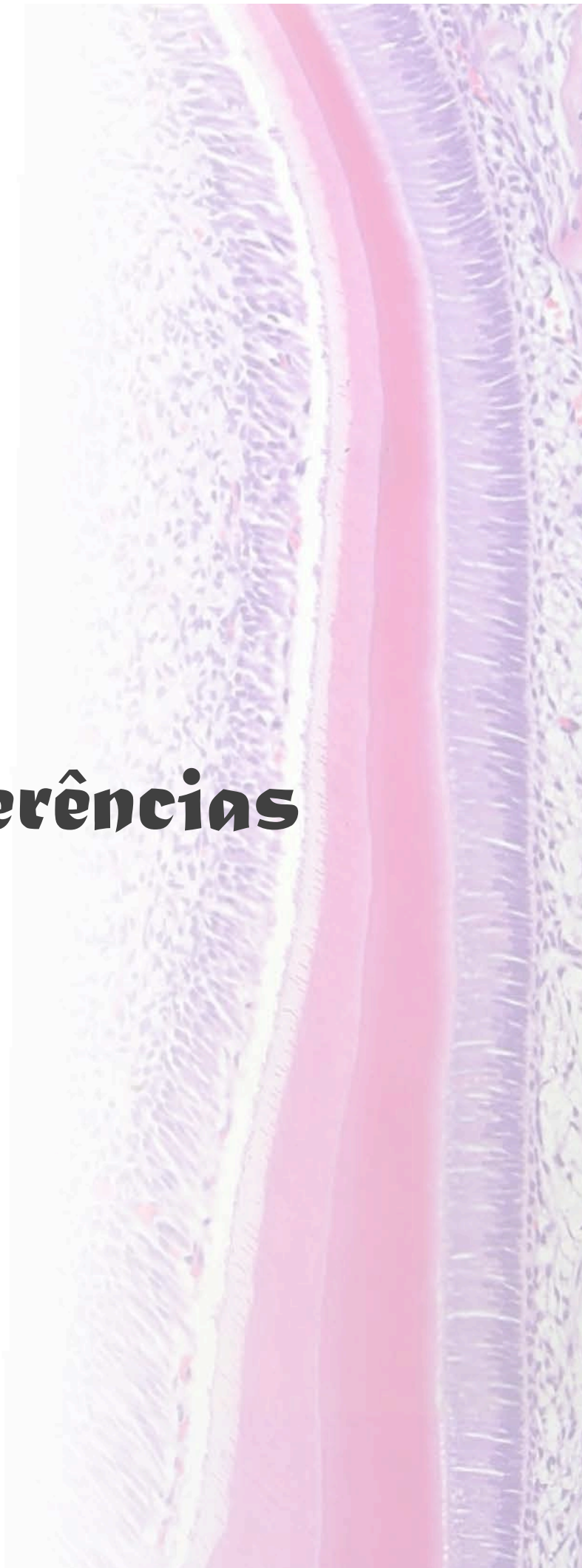
6 Considerações *finais*

6 Considerações Finais

De acordo com a metodologia adotada, os resultados do presente estudo sugerem que:

- A amoxicilina provocou alterações morfológicas nos estágios iniciais da amelogênese, resultando em uma menor espessura da matriz do esmalte depositada. No entanto, não houve alterações na imunoexpressão das proteínas amelogeninas e MMP-20. Esses dados sugerem que a amoxicilina possa atrasar a diferenciação dos ameloblastos;
- Considerando as análises do esmalte formado, não foram observadas alterações no conteúdo dos principais minerais, como também na densidade eletrônica do esmalte, confirmando os achados histológicos do capítulo 1;
- A exposição crônica ao flúor resultou em esmalte hipomineralizado, com propriedade mecânica reduzida e alteração na pigmentação da superfície do esmalte dos incisivos. No entanto, tais alterações não foram quantificadas em análise da concentração de cálcio e fósforo. Ademais, a associação à amoxicilina não potencializou o efeito do fluoreto. A exposição apenas à amoxicilina não provocou alterações no esmalte de incisivos de ratos.

Referências



7 Referências*

1. Alaluusua S. Aetiology of molar-incisor hypomineralisation: a systematic review. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2010; 11(2): 53-8.
2. Alaluusua S, Lukinmaa PL, Koskimies M, Pirinen S, Holtta P, Kallio M, et al. Developmental dental defects associated with long breast feeding. *Eur J Oral Sci*. 1996; 104(5-6): 493-7.
3. Aoba T, Fejerskov O. Dental fluorosis: chemistry and biology. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002; 13(2): 155-70.
4. Arana-Chavez VE, Massa LF. Odontoblasts: the cells forming and maintaining dentine. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004; 36(8): 1367-73.
5. Arrow P. Risk factors in the occurrence of enamel defects of the first permanent molars among schoolchildren in Western Australia. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2009; 37(5): 405-15.
6. Balmer RC, Laskey D, Mahoney E, Toumba KJ. Prevalence of enamel defects and MIH in non-fluoridated and fluoridated communities. *Eur J Paediatr Dent*. 2005; 6(4): 209-12.
7. Bergus GR, Levy BT, Levy SM, Slager SL, Kiritsy MC. Antibiotic use during the first 200 days of life. *Arch Fam Med*. 1996 Oct; 5(9): 523-6.
8. Bergus GR, Levy SM, Kirchner HL, Warren JJ, Levy BT. A prospective study of antibiotic use and associated infections in young children. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 2001; 15(1): 61-7.
9. Bronckers AL, Jansen LL, Wolfgens JH. Long-term (8 days) effects of exposure to low concentrations of fluoride on enamel formation in hamster tooth-germs in organ culture in vitro. *Arch Oral Biol*. 1984; 29(10): 811-9.
10. Bronckers AL, Lyaruu DM, DenBesten PK. The impact of fluoride on ameloblasts and the mechanisms of enamel fluorosis. *J Dent Res*. 2009; 88(10): 877-93.
11. Catani DB, Tenuta LM, Andalo FA, Cury JA. Fluorosis in rats exposed to

*De acordo com o manual da FOAr/UNESP, adaptadas das normas Vancouver.

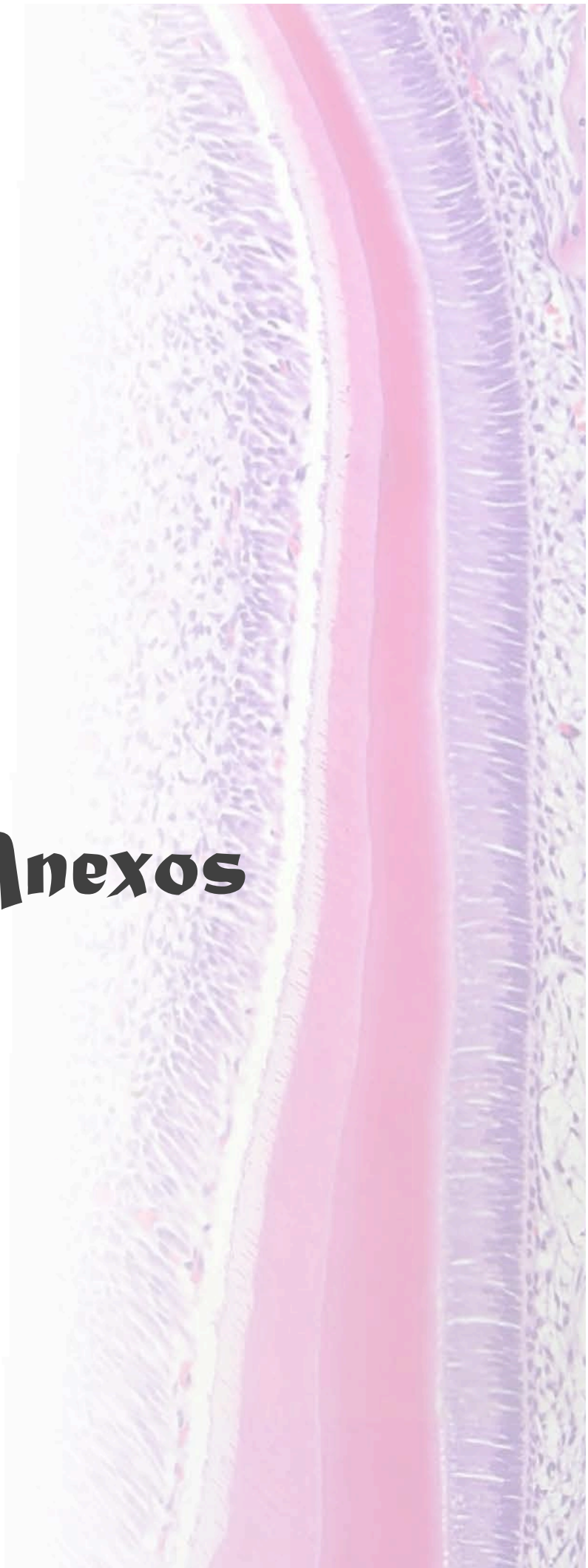
- oscillating chronic fluoride doses. *Braz Dent J.* 2010; 21(1): 32-7.
12. Cho SY, Ki Y, Chu V. Molar incisor hypomineralization in Hong Kong Chinese children. *Int J Paediatr Dent.* 2008; 18(5): 348-52.
 13. Crombie FA, Manton DJ, Weerheijm KL, Kilpatrick NM. Molar incisor hypomineralization: a survey of members of the Australian and New Zealand Society of Paediatric Dentistry. *Aust Dent J.* 2008; 53(2): 160-6.
 14. da Costa-Silva CM, Jeremias F, de Souza JF, Cordeiro Rde C, Santos-Pinto L, Zuanon AC. Molar incisor hypomineralization: prevalence, severity and clinical consequences in Brazilian children. *Int J Paediatr Dent.* 2010; 20(6): 426-34.
 15. da Cunha LF, Tomita NE. Dental fluorosis in Brazil: a systematic review from 1993 to 2004. *Cad Saude Publica.* 2006; 22(9): 1809-16.
 16. Fincham AG, Moradian-Oldak J, Simmer JP. The structural biology of the developing dental enamel matrix. *J Struct Biol.* 1999; 126(3): 270-99.
 17. Hong L, Levy SM, Warren JJ, Bergus GR, Dawson DV, Wefel JS, et al. Primary tooth fluorosis and amoxicillin use during infancy. *J Public Health Dent.* 2004; 64(1): 38-44.
 18. Hong L, Levy SM, Warren JJ, Broffitt B. Amoxicillin use during early childhood and fluorosis of later developing tooth zones. *J Public Health Dent.* 2011; 71(3): 229-35.
 19. Hong L, Levy SM, Warren JJ, Dawson DV, Bergus GR, Wefel JS. Association of amoxicillin use during early childhood with developmental tooth enamel defects. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2005; 159(10): 943-8.
 20. Jälevik B, Klingberg G. Treatment outcomes and dental anxiety in 18-year-olds with MIH, comparisons with healthy controls - a longitudinal study. *Int J Paediatr Dent.* 2012; 22(2): 85-91.
 21. Jälevik B, Klingberg G, Barregård L, Norén JG. The prevalence of demarcated opacities in permanent first molars in a group of Swedish children. *Acta Odontol Scand.* 2001; 59(5): 255-60.
 22. Jälevik B, Noren JG. Enamel hypomineralization of permanent first molars: a morphological study and survey of possible aetiological factors. *Int J Paediatr Dent.* 2000; 10(4): 278-89.

23. Jasulaityte L, Veerkamp JS, Weerheijm KL. Molar incisor hypomineralization: review and prevalence data from the study of primary school children in Kaunas/Lithuania. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2007; 8(2): 87-94.
24. Jeremias F, de Souza JF, Silva CM, Cordeiro Rde C, Zuanon AC, Santos-Pinto L. Dental caries experience and Molar-Incisor Hypomineralization. *Acta Odontol Scand*. 2013; 71(3-4): 870-6.
25. Katchburian E, Arana V. *Histologia e embriologia oral: texto, atlas, correlações clínicas*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.
26. Kumazawa K, Sawada T, Yanagisawa T, Shintani S. Effect of single-dose amoxicillin on rat incisor odontogenesis: a morphological study. *Clin Oral Investig*. 2012; 16(3): 835-42.
27. Laisi S, Ess A, Sahlberg C, Arvio P, Lukinmaa PL, Alaluusua S. Amoxicillin may cause molar incisor hypomineralization. *J Dent Res*. 2009; 88(2): 132-6.
28. Leite GAS, R.M.M. S, J.M. T, Porto IM, Souza FB, Gerlach RF. Exposure to lead exacerbates dental fluorosis. *Arch of Oral Biol*. 2011; 56(1): 695-702.
29. Leppäniemi A, Lukinmaa PL, Alaluusua S. Nonfluoride hypomineralizations in the permanent first molars and their impact on the treatment need. *Caries Res*. 2001; 35(1): 36-40.
30. Massa LF, Bradaschia-Correa V, Arana-Chavez VE. Immunocytochemical study of amelogenin deposition during the early odontogenesis of molars in alendronate-treated newborn rats. *J Histochem Cytochem*. 2006; 54(6): 713-25.
31. Muratbegovic A, Markovic N, Ganibegovic Selimovic M. Molar incisor hypomineralisation in Bosnia and Herzegovina: aetiology and clinical consequences in medium caries activity population. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2007; 8(4): 189-94.
32. Nanci A. Enamel: composition, development and structure. In: Nanci A, editor. *Ten Cate's Oral histology, development, structure, and function*. 8th ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. p. 141-90.
33. Nanci A, Zalzal S, Lavoie P, Kunikata M, Chen W, Krebsbach PH, et al. Comparative immunochemical analyses of the developmental expression and distribution of ameloblastin and amelogenin in rat incisors. *J Histochem Cytochem*. 1998; 46(8): 911-34.

34. Neiman A, Eisenmann DR. The effect of strontium, cobalt and fluoride on rat incisor enamel formation. *Anat Rec.* 1975; 183(2): 303-21.
35. Preusser SE, Ferring V, Wleklinski C, Wetzel WE. Prevalence and severity of molar incisor hypomineralization in a region of Germany -- a brief communication. *J Public Health Dent.* 2007; 67(3): 148-50.
36. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. Antibacterial drugs. In: Rang & Dale's Pharmacology. 7 ed. UK: Elsevier; 2011. p. 661-77.
37. Reith EJ. The stages of amelogenesis as observed in molar teeth of young rats. *J Ultrastruct Res.* 1970; 30(1): 111-51.
38. Sahlberg C, Pavlic A, Ess A, Lukinmaa PL, Salmela E, Alaluusua S. Combined effect of amoxicillin and sodium fluoride on the structure of developing mouse enamel in vitro. *Arch Oral Biol.* 2013; 58(9): 1155-64.
39. Simmer JP, Hu JC. Expression, structure, and function of enamel proteinases. *Connect Tissue Res.* 2002; 43(2-3): 441-9.
40. Smith CE. Cellular and chemical events during enamel maturation. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1998; 9(2): 128-61.
41. Smith CE, Nanci A. Overview of morphological changes in enamel organ cells associated with major events in amelogenesis. *Int J Dev Biol.* 1995; 39(1): 153-61.
42. Souza JF, Costa-Silva CM, Jeremias F, Santos-Pinto L, Zuanon AC, Cordeiro RC. Molar incisor hypomineralisation: possible aetiological factors in children from urban and rural areas. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2012; 13(4): 164-70.
43. Souza JF, Jeremias F, Costa Silva CM, Santos-Pinto L, Zuanon AC, Cordeiro Rde C. Hipomineralización Incisivo y molar: Diagnóstico diferencial. *Acta Odontol Venezolana.* 2011; 49(3): 1- 8.
44. Souza JF, Jeremias F, Costa-Silva CM, Santos-Pinto L, Zuanon AC, Cordeiro RC. Aetiology of molar-incisor hypomineralisation (MIH) in Brazilian children. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2013; 14(4): 233-238.
45. Soviero V, Haubek D, Trindade C, Da Matta T, Poulsen S. Prevalence and distribution of demarcated opacities and their sequelae in permanent 1st molars and incisors in 7 to 13-year-old Brazilian children. *Acta Odontol Scand.* 2009; 67(3): 170-5.

46. Suckling GW. Developmental defects of enamel--historical and present-day perspectives of their pathogenesis. *Adv Dent Res.* 1989; 3(2): 87-94.
47. Suga S. Enamel hypomineralization viewed from the pattern of progressive mineralization of human and monkey developing enamel. *Adv Dent Res.* 1989; 3(2): 188-98.
48. Thesleff I, Keranen S, Jernvall J. Enamel knots as signaling centers linking tooth morphogenesis and odontoblast differentiation. *Adv Dent Res.* 2001; 15: 14-8.
49. Weerheijm KL. Molar incisor hypomineralization (MIH): clinical presentation, aetiology and management. *Dent Update.* 2004; 31(1): 9-12.
50. Weerheijm KL, Duggal M, Mejare I, Papagiannoulis L, Koch G, Martens LC, et al. Judgement criteria for molar incisor hypomineralisation (MIH) in epidemiologic studies: a summary of the European meeting on MIH held in Athens, 2003. *Eur J Paediatr Dent.* 2003; 4(3): 110-3.
51. Weerheijm KL, Groen HJ, Beentjes VE, Poorterman JH. Prevalence of cheese molars in eleven-year-old Dutch children. *ASDC J Dent Child.* 2001; 68(4): 259-62, 29.
52. Weerheijm KL, Jalevik B, Alaluusua S. Molar-incisor hypomineralisation. *Caries Res.* 2001; 35(5): 390-1.
53. Westergaard J. Structural changes induced by tetracycline in secretory ameloblasts in young rats. *Scand J Dent Res.* 1980;88(6):481-95.
54. Whatling R, Fearne JM. Molar incisor hypomineralization: a study of aetiological factors in a group of UK children. *Int J Paediatr Dent.* 2008; 18(3): 155-62.

Anexos



ANEXO 1

CERTIFICADOS DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
FOAR-UNESP

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara



FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Proc. CEUA nº 34/2010

Araraquara, 23 de março de 2011

Senhores Pesquisadores:

A Comissão de Ética no Uso de Animal - CEUA desta Faculdade reunida em 22/03/2011, após a avaliação do projeto de sua responsabilidade intitulado "Efeito da amoxicilina no desenvolvimento do esmalte dentário. Estudo em ratos." (Proc. CEUA nº 34/2010) AUTORIZA a realização da pesquisa, ficando a apresentação do RELATÓRIO FINAL para FEVEREIRO/2013.

Esta Comissão de Ética encaminha também a seguinte observação feita por ocasião da aprovação: "Na apresentação do Relatório Parcial, o pesquisador deverá apresentar a tabela 1 corrigida, de forma que os procedimentos a serem realizados na prole dos grupos III e IV correspondam ao que está descrito no texto".

Atenciosamente.

Profª Drª ELENY ZANELLA BALDUCCI
Coordenadora da CEUA

À
Profª Drª RITA DE CÁSSIA LOIOLA CORDEIRO
DD. Pesquisadora Responsável
Departamento de Clínica Infantil



Comitê de Ética em Experimentação Animal - CEEA
Rua Humaitá nº 1.680 - Centro - CEP 14801-903 - Caixa Postal nº 331 - ARARAQUARA - SP
5º andar - fone (16) 3301-6431/6432 / fax (16) 3301-6433 / e-mail: diretor@foar.unesp.br - home page: <http://www.foar.unesp.br>



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



Proc. CEUA nº 22/2012

Araraquara, 11 de Março de 2013.

Senhores Pesquisadores:

A Comissão de Ética no Uso de Animal - CEUA desta Faculdade reunida em 05/03/2013, após a avaliação do projeto de sua responsabilidade intitulado **"EFEITO DA AMOXICILINA E DO FLUORETO NO DESENVOLVIMENTO DO ESMALTE DENTÁRIO DE RATOS"** (Proc. CEUA nº 22/2012) AUTORIZA a realização da pesquisa, ficando a apresentação do RELATÓRIO FINAL para ABRIL/2014.

Atenciosamente.

Prof. Dra. DÉBORA SIMÕES DE ALMEIDA COLOMBARI
Vice-Coordenadora da CEUA

À
Prof. Dra. RITA DE CÁSSIA LOIOLA CORDEIRO
DD. Pesquisadora Responsável
a/c Juliana Feltrin de Souza
Departamento de Clínica Infantil

Autorizo a reprodução deste trabalho.
(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 05 de Outubro de 2013.

Juliana Feltrin de Souza