CRISTHIANE RISTUM BAGATIN ROSSI

**PERMEABILIDADE E RESISTÊNCIA A DESAFIOS ÁCIDOS DO ESMALTE DE
DENTES DE RATOS, APÓS O USO SISTÊMICO
DE ALENDRONATO DE SÓDIO**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Programa: Odontopediatria

Área de Concentração: Odontopediatria

Orientador: PROF. DR. PAULO NELSON-FILHO

Ribeirão Preto-SP

2012

AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO

Autorizo a reprodução e/ou divulgação total ou parcial da presente obra, por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Bagatin-Rossi, Cristhiane Ristum

Permeabilidade e Resistência a Desafios Ácidos do Esmalte de Dentes de Ratos, após o Uso Sistêmico de Alendronato de Sódio. Ribeirão Preto, 2012.

69p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão - Preto/USP – Área de Concentração: Odontopediatria.

Orientador: Nelson-Filho, Paulo

1. Alendronato de sódio 2. Esmalte 3. Microdureza Subsuperficial 4. Microscopia de luz 5. Permeabilidade

FOLHA DE APROVAÇÃO

Bagatin-Rossi CR. **Permeabilidade e Resistência a Desafios Ácidos do Esmalte de Dentes de Ratos, após o Uso Sistêmico de Alendronato de Sódio.** Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências. Área de Concentração: Odontopediatria.

Data da defesa: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Julgamento _____ Assinatura _____

CRISTHIANE RISTUM BAGATIN ROSSI

DADOS CURRICULARES

Nascimento	18 de fevereiro de 1977 – Ribeirão Preto/SP
Filiação	Luis Antônio Bagatin Marisa Dieb Ristum Bagatin
1995-1998	Curso de Graduação Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP
1998-1999	Curso de Aperfeiçoamento no Atendimento Odontológico a Pacientes Especiais Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP
2000-2002	Curso de Homeopatia Instituto Homeopático François Lamasson Ribeirão Preto/SP
2003-2004	Especialização em Odontopediatria Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP
2005	Curso de Aperfeiçoamento no Atendimento Odontológico a Pacientes Especiais Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP
2004-2007	Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria, nível Mestrado Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – FORP/USP
2008-2012	Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria, nível Doutorado Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – FORP/USP

A Deus,

*"Eu segurei muitas coisas em minhas mãos, e eu perdi tudo; mas tudo que eu coloquei nas
mãos de Deus eu ainda possuo" (Martin Luther King).*

"Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima." (Louis Pasteur).

*Senhor, em um dia não muito distante coloquei em tuas mãos minha vida e pedi: Refazei-
me, pois algo morreu dentro de mim... E por isso esta conquista tem um valor ainda
maior, **consegui** Pai.*

À Nossa Senhora das Graças,

*Misericordiosa distribuidora das graças divinas, tu que és Mãe, tu que foste coroada com
sua imensa sabedoria, humildade e compaixão, considera a minha dor e concede-me a
graça de que tanto necessito (Súplica à Virgem Santíssima das Graças).*

DEDICO ESTE TRABALHO,

As minhas filhas,

Clara e Laura, que me proporcionaram a dádiva de ser mãe e entender o verdadeiro sentido da vida, despertando o que há de melhor em mim. Vocês são e sempre serão minha prioridade, a cura de todas as minhas aflições, o sentido dos meus anseios, a luz de alegria e amor que completam minha vida.

Aos meus pais,

Luis Antônio Bagatin e Marisa Dieb Ristum Bagatin, por estarem comigo, em constante apoio, afeto e presença, suprimindo minhas vontades, subsidiando e aceitando minhas escolhas. Pelas inúmeras vezes que renunciaram aos seus sonhos para viverem os meus com indescritível amor incondicional.

Que essa conquista seja motivo de orgulho para vocês!

"A glória dos filhos são seus pais" (Livro dos Proverbios 17,6).

*Ao meu marido **Leandro Bielli Rossi**, que me deu essa família linda e abençoada, que me faz sentir a cada dia o quanto nos amamos e somos importantes uns para os outros! Por novamente ter sido meu suporte e constante incentivador nesta jornada, me amparando a cada nova dificuldade. A você minha gratidão e o meu amor, por todos os dias de minha vida.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Nelson-Filho,

Pela paciência e compreensão nos meus momentos de dificuldade. Exemplo de professor em seu sentido mais completo, com ações inspiradoras, atitudes e ensinamentos essenciais. Com uma convivência pautada no respeito e grande afeição, verdadeiro mestre por vocação, meu reconhecimento e gratidão por ter sido novamente escolhida sua orientada. Exemplo de amor à profissão e a valorização da seriedade quando se gera o conhecimento científico, meu mais profundo respeito. Muito Obrigada por insistir e acreditar que eu conseguiria!

À Profª. Dra. Regina Guenka Palma Dibb,

Pelo vínculo criado por meio da convivência no desenvolvimento deste trabalho. Por sua colaboração constante, com disponibilidade, atenção e paciência frente às minhas ansiedades. Pelo valioso auxílio abrindo-me as portas de seu laboratório, não medindo esforços para me auxiliar, ensinando-me que ser professor é acima de tudo compreender. Faço minhas as palavras de William M. Bulger: "Não há nada que melhor defina uma pessoa do que aquilo que ela faz quando tem toda a liberdade de escolha". Muito obrigada.

À amiga Dra. Jaciara Gomes da Silva,

Pela participação direta neste trabalho, abraçando minha causa como se fosse sua. Com cumplicidade, disposição, apoio e companhia constantes. Quantas vezes você me mostrou que as coisas iriam mudar, que você iria me ajudar e não me deixou desistir... Hoje a gratidão e a dívida que tenho com você não cabem em palavras ou ações. Espero que minhas filhas possam fazer pela sua tudo ou mais do que você fez por mim. Agradeço a Deus pela sua existência em minha vida, mostrando-me a cada dia que a verdadeira sabedoria está na bondade. Obrigada por tudo. Esta vitória é sua também!

*À querida pós-graduada **Marília Pacífico Lucisano**, pela participação direta na obtenção das amostras para este trabalho e ajuda durante toda esta jornada. Minha admiração e gratidão, com muito carinho. Sua disposição, apoio e dedicação constantes mostram o grande ser humano que é.*

MEUS AGRADECIMENTOS

À Prof.^ª Dr.^ª Léa Assed Bezerra da Silva, cujo comprometimento com o Ensino se estende além da carreira acadêmica, com dignidade e competência incontestáveis, minha admiração.

À Prof.^ª Dr.^ª Maria Cristina Borsatto, exemplo de dedicação e competência, tenho orgulho de ser sua aluna. Registro aqui meu carinho e gratidão a você. Seus ensinamentos foram mais do que acadêmicos. Muito obrigada.

À amiga e Prof.^ª Dr.^ª Raquel Assed Bezerra da Silva, apesar da distância continua sendo responsável direta pelo meu ingresso nesta pós-graduação. Pelas palavras de incentivo fundamentais nos momentos difíceis, sempre pronta a ajudar. Você é para mim um grande exemplo de responsabilidade e, acima de tudo, bondade e profissionalismo. Muito obrigada.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa do atual diretor Prof.Dr. Valdemar Mallet da Rocha Barros.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da coordenadora Prof.^ª Dr.^ª Léa Assed Bezerra da Silva e do Vice-Coordenador Prof. Dr. Paulo Nelson-Filho, pela oportunidade de participar deste conceituado Programa de Pós-graduação, me permitido vislumbrar perspectivas diferentes para minha vida.

Aos docentes do Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-USP, Prof.^ª Dr.^ª Sada Assed, Prof.^ª Dr.^ª Aldevina Campos de Freitas, Prof.^ª Dr.^ª Léa Assed Bezerra da Silva, Prof. Dr. Mário Roberto Leonardo, Prof. Dr. Paulo Nelson-Filho, Prof.^ª Dr.^ª Maria Cristina Borsatto, Prof.^ª Dr.^ª Alexandra Mussolino de Queiroz, Prof.^ª Dr.^ª Kranya Victória Díaz Serrano, Prof.^ª Dr.^ª Raquel Assed Bezerra da Silva, Prof.^ªDr.^ª Andiana De Rossi , Prof.^ª Dr.^ª Maria Conceição

Pereira Saraiva, Prof. Dr. Adilson Thomazinho, Prof. Dr. José Tarcísio Lima Ferreira, Prof. Dr. Fábio Lourenço Romano, Prof. Dr. Mirian Aiko Nakane Matsumoto e Prof. Dr. Maria Bernadete Sasso Stuaní, por dividirem comigo seus conhecimentos, pelo incentivo e pela convivência. Meu respeito e gratidão.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Micheli Cristina Leite Rovanholo, Filomena Leli Placciti, Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva, Mariana Pacífico Lucisano, Carolina Paes Torres Mantovani, Marco Antonio dos Santos, Carmo Eurípedes Terra Barretto, Dorival Gaspar, Nilza Letícia Magalhães, Fátima Aparecida Rizoli, Fátima Aparecida Jacinto Daniel, Renata Aparecida Fernandes e Matheus Morelli Zanela, pela eficiência em atender e ajudar, sempre fazendo o melhor para corresponder às necessidades de todos e, sobretudo, pela amizade e carinho que me ofereceram.

Às secretárias da Seção de Pós-Graduação Isabel Cristina Galino Solá e Regiane Cristina Moi Sacilotto, pela cordialidade, atenção e paciência em todos os momentos.

À técnica do laboratório de Pesquisa em Dentística da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Patricia Marchi, e a Prof. Dra. Juliana Jenjiroba Faraoni Romano, pela inestimável colaboração no processamento das amostras com atenção e disponibilidade. Minha profunda gratidão pela troca de experiências, paciência, atenção, boa vontade e excelente convívio.

Aos colegas de Pós-Graduação, Camila Scatena, Cíntia Guimarães de Almeida, Danielle Torres Azevedo, Luciane Almeida do Carmo, Marcela Martin Del Campo Fierro, Paula Dariana Fernandes Ferreira, Rodrigo Alexandre Valério, Talitha de Siqueira Mellara, Elaine Machado Pingueiro, Fernanda Regina Ribeiro Santos, Iliana Ferraz Sabbatini, Késsia Suênia Fidelis de Mesquita, Ligia Maria Napolitano Gonçalves, Cristiane Tomaz Rocha, Fabrício Kitazono de Carvalho, Maristela Soares Swerts Pereira, Regina Aparecida Segatto Saiani,

Rodrigo Teixeira Macri, Kleber Cortês Bonifácio, Larissa Moreira Spinola de Castro, Leonardo Bíscaio Pereira, Marina Fernandes de Sena, Marta Maria Martins Giamatei Contente, Walter Raucci Neto, Maya Fernanda Manfrin Arnez e Milena Silva Campos, pelos bons momentos compartilhados. Especialmente à Carolina Paes Torres Mantovani, Cristina Bueno Brandão, Jaciara Gomes Miranda Silva, Marcela C. D. Andruciole e Soraya Dibb Sheyer Gonçalves, pela disposição, ajuda e amizade demonstradas desde o início, em todos os momentos que convivemos.

Às minhas tias Nadima e Célia, pelo apoio, afeto e dedicação a mim e às minhas filhas. "In memoriam" às minhas tias Adinã e Salma, referências na história de minha vida e de toda nossa família. Minha saudade constante e a certeza de que continuam comigo.

À minha cunhada e amiga Ana Paula Bielli Rossi, pessoa indispensável em minha vida. Meu agradecimento por cuidar de mim e das minhas filhas nos momentos em que estive ausente física ou espiritualmente. Sem seu apoio e ajuda nada disso seria possível.

Aos meus sogros, Irene e Arlindo Rossi, obrigada por sempre me verem como uma filha, vibrando com as minhas conquistas e pela ajuda todos estes anos.

A toda a família Rossi, por compartilharem comigo as angústias e vitórias. Muito Obrigada. Especialmente à Ana Maria, por ter tornado meus dias mais alegres, pela ajuda, carinho e afeto com minhas filhas, presença constante e indispensável em nossas vidas.

À Dra Maria Priscila, Nadir e tia Sheila, pessoas responsáveis pela minha recuperação física e espiritual, tornando esse momento possível.

À Maria de Fátima Alves dos Santos Filha (Fafá), por sua dedicação às minhas filhas, trabalhando com responsabilidade e tanto carinho.

À Prefeitura Municipal de Sertãozinho, em especial ao Dr. Paulo Roberto Siqueira e Debora Silvano Pereira, por acreditarem no meu trabalho e compreenderem minhas necessidades e ausências para a finalização deste curso.

À Marcia Sicchieri de Antonio, Luciana R. dos Santos Doreto, Solange M. Machado Grecchi, Andrea J. Frugeri de Castro, Clemir C. da Silva Sposito, Neusa M. da Costa Cherubin e Silvana M. Capecci Alves, e a todos (alunos e professores) da EMEF Joanninha Gilberti, obrigada por me receberem tão bem, compreendendo minhas necessidades de mãe e pós-graduada, aceitando minhas ausências durante esse período. Espero continuar trabalhando com vocês por muito tempo!

Aos meus professores do curso de graduação em Odontopediatria da UNAERP, Profª Drª Delsa Deise Macchetti Kanaan, Profª Christiane Elen Barquete Grandini Zuccolotto, Profª Drª Yara Teresinha Correa da Silva-Souza, Profª Drª Maria Célia Tambasco de Oliveira, Prof. Dr. Luís José Florian e Prof. Dr. Vladimir Oliveira da Silva. Vocês foram o alicerce e a inspiração. Obrigada por me ensinarem, por meio de suas atitudes, que dedicação à profissão podem ser somadas à afeição e ternura pelos alunos e pacientes. Novamente, meu eterno carinho e amizade.

À CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo apoio e incentivo à pesquisa brasileira, buscando a excelência de nossa Pós-Graduação. Pelo fomento, indispensável ao desenvolvimento deste trabalho.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, minha lembrança e gratidão.

RESUMO

Bagatin-Rossi CR. **Permeabilidade e Resistência a Desafios Ácidos do Esmalte de dentes de ratos, após o Uso Sistêmico de Alendronato de Sódio.** [tese]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2012.

Os bisfosfonatos representam uma classe de drogas que agem sobre o metabolismo ósseo e são amplamente utilizadas na prevenção e tratamento de estados osteopênicos e osteoporóticos. Tem sido demonstrado que alterações na estrutura dos tecidos dentais podem ocorrer como efeitos adversos à administração sistêmica do alendronato de sódio. No esmalte de dentes de ratos submetidos ou não ao uso sistêmico de alendronato de sódio, os objetivos do presente estudo foram: 1) avaliar a resistência do esmalte a desafios ácidos (indução artificial de lesões de cárie e indução artificial de lesões de erosão) por meio da mensuração da microdureza subsuperficial e da profundidade das lesões; 2) avaliar a permeabilidade do esmalte por meio de técnica histoquímica. Foi utilizada a porção coronária de 20 incisivos superiores de 10 animais submetidos à medicação com alendronato de sódio (grupo experimental) e 16 incisivos superiores de 8 animais que receberam apenas água destilada (grupo controle). Para os experimentos de indução artificial de lesão de cárie e de lesão de erosão, as porções coronárias de 18 incisivos superiores foram seccionadas ao meio, no sentido transversal, obtendo-se duas secções de aproximadamente 8 mm de comprimento de cada dente, num total de 36 secções que foram aleatoriamente divididas de acordo com o grupo experimental ($n=10/\text{grupo/experimento}$) e controle ($n=8/\text{grupo/experimento}$). Para a avaliação da permeabilidade, foram utilizados 18 incisivos superiores restantes, sendo 10 para o grupo experimental e 8 para o grupo controle. As variáveis de resposta quantitativa para o estudo foram a porcentagem da variação de perda de dureza subsuperficial (%VPD) na indução artificial de lesões de cárie e lesões de erosão, avaliadas em microdurômetro; e a profundidade das lesões de desmineralização de cárie/erosão e a permeabilidade do esmalte avaliadas em microscopia de luz. Os resultados foram submetidos à análise estatística por meio do teste ANOVA. O nível de significância adotado foi de 5%. De acordo com os resultados obtidos verificou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimental e controle ($p>0,05$), tanto na porcentagem de VPD quanto na profundidade das lesões de cárie/erosão. Com relação à permeabilidade não foi observada diferença significativa entre os grupos ($p>0,05$), mostrando penetração do agente traçador semelhante em ambos. Pôde-se concluir que, após o uso sistêmico do alendronato de sódio, o esmalte de dentes de ratos não apresentou maior resistência aos desafios ácidos (indução artificial de lesões de cárie e erosão) e não sofreu alteração em sua permeabilidade.

Palavras-chave: Alendronato de sódio, Esmalte, Microdureza subsuperficial, Microscopia de luz, Permeabilidade.

ABSTRACT

Bagatin-Rossi CR. **Permeability and Resistance to Acid Challenges, after Systemic Use of Sodium Alendronate: a study in rat tooth enamel.** [tese]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2012.

Bisphosphonates represent a class of drugs that act on bone metabolism and are widely used in the prevention and treatment of osteopenic and osteoporotic states. It has been demonstrated that structural alterations on dental tissues might occur as adverse effects of systemic sodium alendronate administration. In the dental enamel of rats subjected or not to systemic use of sodium alendronate, the objectives of the present study were: 1) to evaluate enamel resistance to acid challenges (artificial induction of carious lesions and artificial induction of erosion lesions) by analysis of subsurface microhardness and lesion depth; 2) to evaluate enamel permeability by a histochemical coloring method. The crowns of 20 upper incisors of 10 animals, which received chemically pure sodium alendronate (experimental group), and 16 upper incisors of 8 animals, which received distilled water (control group) were used in the study. For the experiments of artificial induction of carious and erosion lesions, the coronal portions of 18 upper incisors were bisected transversally to produce two 8-mm-long sections *per* tooth, totalizing 36 sections, which were randomly assigned according to the experimental group (n=10/group/experiment) and the control group (n=8/group/experiment). For the permeability test, the remaining 18 upper incisors were used, being 10 of the experimental group and 8 of the control group. The quantitative response variables were the percent subsurface Knoop microhardness change (%SHC) assessed with a microhardness meter at different depths from enamel surface for the artificially induced carious/erosion lesions; and the carious/erosion lesions depth and enamel permeability, measured by light microscopy. The results were subjected to statistical analysis by ANOVA test with significance level set at 5%. There was no statistically significant difference between the experimental and control groups ($p>0.05$) for either %SHC or depth of the artificially induced carious/erosion lesions. Data from the permeability test revealed no statistically significant difference ($p>0.05$) between the groups, showing similar penetration of the tracer agent in both of them. Therefore, it may be concluded that after the systemic use of sodium alendronate, the enamel of rat teeth did not present higher resistance to acid challenges (artificially induced carious/erosion lesions) and did not suffer alteration of its permeability.

Key words: alendronate, enamel, hardness, microscopy, permeability.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 PROPOSIÇÃO.....	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Aspectos éticos.....	24
3.2 Delineamento experimental	24
3.3 Obtenção dos incisivos de ratos	24
3.4 Preparo dos espécimes	28
3.5 Indução artificial das lesões de cárie	31
3.6 Indução artificial das lesões de erosão	33
3.7 Avaliação da Microdureza subsuperficial	35
3.8 Mensuração das lesões em Microscopia de Luz	38
3.9 Avaliação da Permeabilidade	40
4 RESULTADOS	44
4.1 Da microdureza e mensurações das lesões artificiais de cárie	45
4.2 Da microdureza e mensurações das lesões artificiais de erosão	46
4.3 Da Permeabilidade	48
5 DISCUSSÃO.....	51
5.1 Microdureza.....	55
5.2 Microscopia de luz.....	57
5.3 Permeabilidade.....	58
6 CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS	61
ANEXO	68

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O esmalte é um tecido que reveste a coroa dental e difere dos demais tecidos mineralizados por ser de origem ectodérmica, desprovido de células e incapaz de reparar-se ou remodelar-se. É o mais duro e resistente dos tecidos mineralizados do corpo humano, apresentando 96% em peso de conteúdo inorgânico, associado a 4% de água e material orgânico (Gwinnett, 1992; Ten Cate, 2001; He e Swain, 2009).

A porção inorgânica do esmalte é representada por fosfato de cálcio cristalino e de apatita, nas formas hidroxí, carbonatada ou fluoretada (Stack 1954; Meckel et al., 1965; Gwinnett, 1992; Gomes-Silva, 2011). Os elementos químicos que compõem a base desse tecido são o cálcio e o fosfato (Brudevold et al., 1963). Variações secundárias ocorrem na sua composição, em que elementos químicos como alumínio, bário, estrôncio, magnésio e vanádio também podem ser encontrados (Gwinnett, 1992; Saleh et al., 2004; Oliveira et al., 2010).

Na cavidade bucal o esmalte dental é constantemente submetido a desafios térmicos, mecânicos e químicos. A degradação química ocorre como consequência de um desequilíbrio entre os processos dinâmicos e progressivos de desmineralização e remineralização, os quais resultam em perda mineral. As perdas irreversíveis da estrutura dental decorrentes da ação de ácidos são denominadas lesões cariosas e/ou erosivas (Gwinnett, 1992; Eisenmann, 2001; Turssi et al., 2010).

A cárie dental é uma doença infecciosa, crônica, multifatorial e biofilme-dependente (Marsh, 1995; Fejerskov e Kidd, 2005; Nelson-Filho e Silva, 2005). A erosão, no entanto, é o resultado físico de uma perda patológica, crônica, localizada e indolor, de tecido dental mineralizado submetido quimicamente ao ataque ácido, sem o envolvimento de microrganismos (Litonjua et al., 2003; Lussi et al., 2011).

Dentre os fatores etiológicos relacionados ao estabelecimento e progressão das lesões cariosas e erosivas estão as características do substrato. Neste contexto, distúrbios no desenvolvimento das estruturas dentais podem provocar uma predisposição dos mesmos às perdas minerais. Dentre os fatores que afetam a formação e mineralização dos tecidos dentários mineralizados está a ingestão de substâncias químicas, como os fluoretos e outras drogas (Eisenmann, 2001; Wang et al., 2006; Sawan et al., 2010; Leite et al., 2011).

Em estudos recentes (Massa et al., 2006; do Espírito-Santo et al., 2010), têm sido relatadas alterações na estrutura dos tecidos dentais, como efeitos adversos à administração

do alendronato de sódio, que é um composto aminobisfosfonato, empregado no tratamento de distúrbios ósseos (Reid, 2003; Orbak et al., 2006; Bala et al., 2011; Sugata et al., 2011).

Os bisfosfonatos (BFs) representam uma classe de drogas que agem sobre o metabolismo ósseo e são amplamente utilizadas na prevenção e tratamento de estados osteopênicos e osteoporóticos como a Doença de Paget, a osteoporose e a hipercalemia maligna (Fleisch, 1998; Russell et al., 2007; 2008; Inoue et al., 2008; Bachrach e Ward, 2009; Lewiecki, 2010; Kawate et al., 2010; Reid, 2010; Pluskiewicz et al., 2012). Estes medicamentos são análogos ao pirofosfato, um regulador endógeno da mineralização, apresentando dois grupos fosfatos ligados a um átomo central de carbono (P-C-P), o qual possui duas cadeias referidas como R1 e R2. Esta estrutura confere aos bisfosfonatos afinidade pelo Ca^{2+} e, conseqüentemente, pela superfície mineral óssea, particularmente em sítios de atividade osteoclástica, propriedade exclusiva de captação seletiva pelo seu órgão alvo (Ebetino et al., 1998; Russell et al., 2008).

As cadeias laterais R1 e R2 ligadas ao átomo de carbono são responsáveis pela larga variação de atividade observada entre os BFs. Os substituintes R1, tais como hidroxila ou amino, melhoram a quimioabsorção ao mineral (Van Beek et al., 1996), enquanto que a variação dos substituintes R2 resulta em diferenças na potência antirreabsortiva de várias ordens de magnitude (Ebetino et al., 1998).

Alguns dos mecanismos moleculares de ação dos BFs têm sido elucidados recentemente. Dependendo da presença de um átomo de nitrogênio na cadeia alquílica da molécula, os BFs agem sendo tóxicos aos osteoclastos ou interferindo com vias intracelulares específicas no interior das células osteoclásticas (Massa et al., 2006).

O primeiro grupo de BFs compreende aqueles que não contêm nitrogênio, como o etidronato, o clodronato e o tiludronato, os quais são convertidos, no meio intracelular, em análogos citotóxicos de adenosina-trifosfato (ATP), por reverter reações envolvidas na ativação de aminoácidos durante a síntese protéica, resultando em nucleotídeos não-hidrolisáveis (AppCp). O acúmulo intracelular destes metabólitos causa inibição das funções osteoclásticas e pode induzir à apoptose destas células, constituindo o principal modo de ação deste grupo de BFs (Russell et al., 2008).

Por outro lado, o segundo grupo contém os mais potentes BFs aminados, como o pamidronato, o alendronato, o ibandronato, o risedronato e o zoledronato. Os membros deste grupo interferem com outras reações metabólicas, notadamente na via biossintética do mevalonato, bem conhecida pelo seu papel na biossíntese do colesterol e de outros esteróis. Sabe-se que o principal alvo é a enzima farnesil pirofosfato sintase (FPPS), a qual é inibida por todos os bisfosfonatos aminados usados clinicamente. A FPPS está presente em

peroxissomos, mas também nas mitocôndrias e no citosol, sendo que o local de ação desses BFs permanece desconhecido. A inibição da FPPS bloqueia a síntese da farnesil pirofosfato (FPP), o que reduz a concentração desse substrato necessário para a geranilgeranil pirofosfato (GGPP) sintase produzir GGPP. Tanto a FPP como a GGPP (lipídeos isoprenóides) são metabólitos requeridos para a prenilação (modificação lipídica) de pequenas proteínas que se ligam ao GTP (pequenas GTPases), as quais são responsáveis pela integridade do citoesqueleto e pela sinalização intracelular (Fleish, 2002; Massa et al., 2006; Russell, 2007).

O alendronato de sódio é um composto capaz de ligar-se aos cristais de hidroxiapatita no osso e unir-se, preferencialmente, às superfícies ósseas reabsorvidas, particularmente àquelas que estão sofrendo atividade de reabsorção osteoclástica (Reid, 2003). A afinidade do alendronato por fosfato de cálcio e sua forte ligação à hidroxiapatita levam a uma rápida incorporação ao esqueleto, estimando-se que seu tempo de vida seja entre 1 e 10 anos, variando em diferentes espécies e dependendo do índice de *turnover* ósseo (Orbak et al., 2006).

Embora o mecanismo de ação do alendronato sódico seja principalmente avaliado no tecido ósseo (Inoue et al., 2008; Okada et al., 2008), pouco se sabe sobre seus efeitos na formação dos tecidos dentários mineralizados, incluindo esmalte e dentina (Massa et al., 2006; do Espírito-Santo et al., 2010; Lucisano, 2010; Nelson-Filho et al., 2012).

Uma vez que esta droga é indicada na terapia de diversas desordens ósseas pediátricas, como osteoporose infantil, osteogênese imperfeita, intoxicação por vitamina D, hiperparatireoidismo primário, hipercalcemia e hipercalciúria (Orbak et al., 2006; Inoue et al., 2008; Bachrach e Ward, 2009; Leanne et al., 2009), é possível que a administração de alendronato sódico a gestantes, crianças ou adolescentes, nos quais a odontogênese e/ou erupção dentária está ocorrendo, possa induzir alterações nas estruturas dentais ou no processo eruptivo (Bradaschia-Correa et al., 2007).

Alguns autores têm evidenciado que a administração de BFs não aaminados, em elevadas e sucessivas doses, afeta o processo de mineralização da dentina e do esmalte dental (Simmelink, 1987; Fejerskov et al., 1990; Fouda et al., 1991; Weile et al., 1993). Estudos microscópicos em ratos demonstraram que o tratamento com alguns BFs, como o etidronato, interfere na amelogênese, ocasionando distúrbios nos ameloblastos e, consequentemente, no desenvolvimento do esmalte, incluindo hipomineralização e formação de cistos subameloblásticos (Simmelink, 1987; Fejerskov et al., 1990; Fouda et al., 1991).

Várias alterações foram relatadas com relação à hipomineralização de esmalte e dentina em incisivos de ratos induzida pela administração de etidronato (1-hidroxietilideno-1,1-bisfosfonato ou HEBP). A inibição da mineralização da dentina promove defeito na

secreção e deposição protéica do esmalte, resultando em evidentes zonas livres de esmalte que interrompem a continuidade de sua camada (Ogawa et al., 1989). Foi relatado também que ratos que receberam injeções de etidronato, por 7 dias, desenvolveram hipoplasia de esmalte, devido a um distúrbio na secreção de proteínas (Fuangtharntip et al., 2000; Yamada et al., 2000).

No entanto, atualmente, o alendronato de sódio ou os bisfosfonatos aminados em geral são clinicamente mais indicados para tratamento de desordens ósseas que o etidronato (Orbak et al., 2006; Inoue et al., 2008; Lewiecki, 2010; Kawate et al., 2010).

Segundo Massa et al. (2006), o principal efeito do alendronato na estrutura dental é romper o equilíbrio de secreção/degradação de amelogenina na matriz de esmalte, que é controlado pelos ameloblastos durante o estágio secretório da amelogênese. Embora os achados sugiram que as moléculas desta proteína tenham sido secretadas em excesso pelos ameloblastos, é possível que elas possam ter sido insuficientemente degradadas, durante o período secretório da amelogênese. Outros autores (do Espírito-Santo et al., 2010) relataram uma redução de 10-15% na microdureza das camadas internas do esmalte de ratos tratados com etidronato e alendronato de sódio. No grupo tratado com o alendronato, a redução nos valores de microdureza estaria relacionada a alterações morfológicas nos cristais de hidroxiapatita, como resultado de mudanças moleculares no estágio secretório da matriz orgânica extracelular.

Em 2012, Nelson-Filho et al., avaliaram o efeito do uso sistêmico do alendronato de sódio nas estruturas dentárias mineralizadas de incisivos de ratos observando, por meio da espectrometria na região do infravermelho, espectroscopia de fluorescência, microdureza transversal, microscopia eletrônica de varredura e microscopia de luz polarizada que o alendronato incorporou-se às estruturas dentais mineralizadas, porém sem provocar efeitos significativos na microdureza e na morfologia do esmalte.

Diante do exposto, justifica-se a necessidade de estudos para avaliar se a incorporação desse medicamento na estrutura do esmalte poderia afetar a resistência deste substrato frente à ação de ácidos, particularmente em relação à cárie e erosão dental, o que apresentaria grande relevância clínica.

Proposição

2 PROPOSIÇÃO

Empregando ratos submetidos ou não ao uso sistêmico de alendronato de sódio, os objetivos do presente estudo foram:

- Avaliar a resistência do esmalte a desafios ácidos (indução artificial de lesões de cárie e indução artificial de lesões de erosão) por meio da mensuração da microdureza subsuperficial e da profundidade das lesões.
- Avaliar a permeabilidade do esmalte, por meio de técnica histoquímica.

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo foi inicialmente submetido à avaliação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, processo número 10.1.468.53.5, recebendo parecer favorável (Anexo A).

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O fator em estudo foi o tipo de substrato em dois níveis:

- Esmalte de incisivos de ratos sem tratamento (controle).
- Esmalte de incisivos de ratos submetidos à medicação sistêmica com alendronato de sódio.

As unidades experimentais foram 54 fragmentos de incisivos de ratos da linhagem *Wistar* (*Rattus norvegicus*). Os espécimes foram submetidos à indução artificial de lesões de cárie, indução artificial de lesões de erosão e avaliação da permeabilidade.

As variáveis de resposta quantitativa para o estudo foram a porcentagem de perda de dureza subsuperficial, a profundidade das lesões de desmineralização e a permeabilidade do esmalte.

3.3 OBTENÇÃO DOS INCISIVOS DE RATOS

Para a realização da pesquisa foram utilizados incisivos superiores extraídos de 18 ratos albinos da linhagem *Wistar* (*Rattus norvegicus*), machos, com 36-42 dias de idade, pesando em média 200-230g. Os animais foram mantidos no Biotério convencional da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, recebendo os cuidados de rotina. Os animais permaneceram em caixas grandes (até 4 ratos por caixa) em ambiente com umidade natural e temperatura local de $24 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, controlada por condicionador de ar quente/frio. A iluminação foi automatizada, controlada por timer, com ciclo de 12 horas claro/12 horas

escuro. Os animais receberam ração e água filtrada à vontade e foram divididos aleatoriamente em 2 grupos:

- *Grupo experimental*, constituído por 10 animais submetidos à medicação com alendronato sódico.
- *Grupo controle*, constituído por 8 animais que receberam apenas água destilada (veículo).

Considerando que o índice metabólico de murinos apresenta-se duas vezes maior que o de humanos (Keidel, 1971), foram administradas duas doses semanais de 1mg/Kg de alendronato de sódio (Alendronato Monossódico Triidratado, Galena Química e Farmecêutica Ltda, Índia) quimicamente puro diluído em água destilada, via gavagem (sonda inserida via bucal), no volume de 0,3mL, durante um período de 60 dias, enquanto que os animais do grupo controle receberam apenas água destilada. Este procedimento foi realizado no período da manhã (9 horas), às terças e sextas-feiras. Para a administração da droga ou da água destilada via gavagem, os animais foram contidos manualmente. Foi utilizada uma sonda descartável siliconizada (sonda gástrica Levine, Mark Med Industria e Comércio Ltda, Bragança Paulista-SP, Brasil) número 6, com 3 centímetros de comprimento, acoplada a uma seringa descartável de 1mL (seringa de insulina Injex Indústrias Cirúrgicas Ltda, Ourinhos-SP, Brasil), para que a solução fosse injetada diretamente no trato gastrointestinal.

Semanalmente, os animais foram pesados em balança eletrônica (Modelo 3400, ©Toledo do Brasil) para controle do peso corporal e para que uma nova solução de alendronato fosse preparada com a concentração adequada, de acordo com a média do peso obtida, ajustando a dose de alendronato ao peso dos animais, a cada semana.

Essa metodologia, previamente descrita e utilizada por Nelson-Filho et al. (2012), permite que os animais submetidos ao uso sistêmico de alendronato de sódio, via gavagem, não apresentem interferências em seu crescimento natural, e apresentem maior densidade mineral óssea, em comparação ao grupo controle. Além disso, esse protocolo permite que o alendronato de sódio seja incorporado aos ossos, aumentando a densidade mineral, e que seja incorporado aos tecidos dentais mineralizados.

Decorrido um período de 60 dias, os animais foram mortos por sobredose anestésica, por meio do uso de associação de ketamina (300mg/Kg) e xilasina (30mg/Kg) e, em seguida, os incisivos superiores foram extraídos.

Trinta e seis incisivos superiores, sendo 20 para o grupo experimental e 16 para o grupo controle, foram adequadamente limpos com curetas periodontais e armazenados em freezer à temperatura de -20°C, até o início dos experimentos.

Para os experimentos de indução artificial de lesões de cárie e de erosão, foram utilizados 18 incisivos superiores, sendo 10 para o grupo experimental e 8 para o grupo controle. Para a avaliação da permeabilidade, foram utilizados 18 incisivos superiores, sendo 10 para o grupo experimental e 8 para o grupo controle.

A sequência da metodologia empregada para determinação do peso corporal dos animais e administração do alendronato de sódio ou da água destilada encontra-se ilustrada na figura 1.

Figura 1 - Metodologia empregada para a determinação do peso corporal dos animais e administração do alendronato de sódio.

3.4 PREPARO DOS ESPÉCIMES PARA A INDUÇÃO ARTIFICIAL DAS LESÕES

Os 18 dentes foram submetidos à profilaxia com pasta de pedra-pomes e água, com o auxílio de uma escova Robinson, montada em contra-ângulo, em baixa rotação. Em seguida, foram examinados sob lupa estereoscópica, com aumento de 10 X (Carl Zeiss, Jena, Alemanha), para certificação da ausência de trincas, fraturas ou alterações de estrutura que pudessem comprometer os resultados do estudo.

Os dentes tiveram as raízes seccionadas na porção cervical, por meio de um disco diamantado (#7015; KG Sorensen, Barueri-SP, Brasil) adaptado em máquina de corte (Miniton; Struers A/S, Copenhagen, Dinamarca), sob-refrigeração. Posteriormente, as coroas dentais foram fixadas em uma base de acrílico (lâmina de *plexiglass*) com auxílio de cera para escultura (Kota Ind. e Com. Ltda, São Paulo-SP, Brasil), aquecida em gotejador elétrico (Guelfi Equipamentos, Ribeirão Preto-SP, Brasil). Por meio de um disco diamantado (#7015; KG Sorensen, Barueri-SP, Brasil) adaptado em máquina de corte (Miniton; Struers A/S, Copenhagen, Dinamarca), sob-refrigeração, as porções coronárias foram seccionadas ao meio, no sentido transversal, obtendo-se duas secções (espécimes incisal e cervical) de aproximadamente 8mm de comprimento cada.

Todos os 36 espécimes foram individualmente revestidos com cera pegajosa (Kota Ind. e Com. Ltda, São Paulo-SP, Brasil), aquecida em gotejador elétrico (Guelfi Equipamentos, Ribeirão Preto-SP, Brasil) de forma que apenas as superfícies vestibulares dos dentes ficassem expostas. Em seguida, os espécimes do grupo experimental (n=10/grupo/experimento) e controle (n=8/grupo/experimento) foram aleatoriamente divididos para a realização dos seguintes experimentos: indução artificial de lesão de cárie e de lesão de erosão.

Todos os espécimes tiveram suas porções cervical e incisal isoladas com resina fotopolimerizável (sem condicionamento ácido e sem uso de sistema adesivo), para evitar a penetração das soluções no interior do canal radicular e na dentina.

Após serem isolados, os espécimes tiveram metade de toda a sua superfície (4mm) impermeabilizada com cera, mantendo expostos aos desafios ácidos (cárie e erosão dental) os 4mm restantes do esmalte. Desta forma, áreas controles e áreas testes de cada grupo estariam presentes em cada um dos espécimes.

Os espécimes foram mantidos em água destilada e deionizada, a $\pm 4^{\circ}\text{C}$, até o início dos experimentos. Vinte e quatro horas antes dos experimentos, esses foram imersos em

saliva artificial (Laboratório Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP, Brasil) e mantidos em estufa a 37°C (Olidef CZ Indústria e Comércio de Aparelhos Hospitalares Ltda, Ribeirão Preto-SP, Brasil). A sequência de preparo dos espécimes está ilustrada na Figura 2.

Figura 2 – Fluxograma da metodologia empregada para o preparo dos espécimes.

3.5 INDUÇÃO ARTIFICIAL DAS LESÕES DE CÁRIE

Para o desafio cariogênico, as amostras foram submetidas a ciclagens de pH em soluções desmineralizante (DES) e remineralizante (RE), como preconizado por Serra e Cury (1992) e Amaechi e Higham (2001), respectivamente.

Primeiramente, as amostras foram imersas em aproximadamente 20mL de solução desmineralizante (2mmol/l de cálcio, 2mmol/l de fosfato e 75mmol/l de acetato em pH 4,6), na qual permaneceram imersas por 2 horas em 2 ciclos com intervalo de 2 horas entre eles, totalizando 4 horas de exposição. Em seguida, estas foram lavadas com água destilada e deionizada por 10 segundos e levemente secas com papel absorvente. Em seguida as amostras foram imersas em aproximadamente 20mL de solução remineralizante de acordo com Amaechi e Higham (2001) (2,0 g/l de metil-p-hidroxibenzoato; 10,0 g/l de carboximetilcelulose de sódio; 8,38mM de KCl; 0,29mM de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; 1,13mM de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 4,62mM de K_2HPO_4 ; 2,40mM de KH_2PO_4 e 0,022 ppm de flúor sendo o pH da solução ajustado para 7,2 usando-se KOH) por 2 horas em 2 ciclos com intervalo de 2 horas entre eles, totalizando 4 horas de exposição. Em seguida os espécimes foram imersos por 16 horas em solução que apresenta um grau de saturação dos minerais semelhante à saliva, como proposto por Amaechi et al. (1999) (metilhidroxibenzoato 2,0 g, carboximetilcelulose 10,0g, KCl 0,625g; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0,059g; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,166 g; K_2HPO_4 0,804 g; e KH_2PO_4 0,326 g em 1000 ml de água deionizada). Todo o procedimento foi realizado em estufa a 37°C.

A cada imersão foi utilizada uma nova solução de DES e RE. As ciclagens ocorreram em 7 dias, como determinado em estudo piloto prévio. Para certificação da formação das lesões os espécimes foram observados em microscópio de luz (Carl Zeiss, Jena, Alemanha) com aumento de 40x. A metodologia da indução artificial das lesões de cárie está representada na Figura 3.

Figura 3 – Fluxograma da metodologia empregada para a indução das lesões de cárie.

3.6 INDUÇÃO ARTIFICIAL DAS LESÕES DE EROSÃO

Para a indução artificial de lesões de erosão, os desafios erosivos foram realizados com 4 ciclos de imersão em refrigerante à base de cola por 15 segundos cada, sob agitação em mesa agitadora (CT-155, Cientec/Imprint, Campinas, São Paulo) e à temperatura ambiente, com intervalo de 2 horas. Após cada ciclo de imersão/agitação, os espécimes foram lavados com água destilada e deionizada por 10 segundos e levemente secos com papel absorvente para, em seguida, serem mantidos em 20mL de solução remineralizante de acordo com Amaechi e Higham (2001) (2,0 g/l de metil-p-hidroxibenzoato; 10,0 g/l de carboximetil celulose de sodio; 8,38mM de KCl; 0,29mM de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; 1,13mM de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 4,62mM de K_2HPO_4 ; 2,40mM de KH_2PO_4 e 0,022 ppm de flúor sendo o pH da solução ajustado para 7,2 usando-se KOH) até o próximo ciclo. Ao término dos 4 ciclos de imersão/agitação, os espécimes permaneceram imersos por 16 horas em solução que apresenta um grau de saturação dos minerais semelhante à saliva, como proposto por Amaechi et al. (1999) (metilhidroxibenzoato 2,0 g, carboximetilcelulose 10,0g, KCl 0,625g; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0,059g; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,166 g; K_2HPO_4 0,804 g; e KH_2PO_4 0,326 g em 1000 ml de água deionizada). Foram realizados 4 ciclos de desafios erosivos por dia durante 7 dias, como determinado em estudo piloto prévio. Todo o procedimento foi realizado em estufa a 37°C.

A bebida à base de cola utilizada nos desafios erosivos estava a $\pm 4^\circ C$, correspondendo à temperatura que normalmente é ingerida. Após cada imersão/agitação, um novo refrigerante à base de cola, foi usado sendo o mesmo imediatamente desprezado após o uso. A metodologia da indução das lesões de erosão está representada na Figura 4.

Figura 4 – Fluxograma da metodologia empregada para a indução das lesões de erosão.

Após a indução das lesões por desafios ácidos (lesões de cárie e lesões de erosão), os espécimes foram incluídos em resina acrílica autopolimerizável transparente. A seguir, os espécimes foram desgastados nas faces proximais para expor o esmalte e a dentina, com lixas d'água aplicadas em ordem decrescente de abrasividade (#600 a #1200), em uma politriz (Politriz Universal Aropol 2 V; Arotec, Cotia-SP, Brasil), sob refrigeração abundante, para em seguida serem polidos com disco de feltro embebido em pasta de alumina (Struers A/S, Copenhagen, Dinamarca) de granulações 0,3 µm e 0,05 µm. Os espécimes foram então levados à cuba ultrassônica (Ultrasonic Cleaner T-1449-D; Odontobrás Ind. e Com., Ribeirão Preto-SP, Brasil), durante 5 minutos (Torres et al., 2010).

3.7 AVALIAÇÃO DA MICRODUREZA SUBSUPERFICIAL

A microdureza subsuperficial dos grupos experimentais (n=10/grupo/experimento) e controles (n=8/grupo/experimento), após indução artificial das lesões de cárie e erosão, foi avaliada utilizando-se um microdurômetro (HMV-2000; Shimadzu Corporation, Tóquio, Japão), com um penetrador diamantado piramidal tipo Knoop, com carga estática de 10gf, aplicada durante 10 segundos, como determinado em estudo piloto prévio. Foi mensurada a microdureza subsuperficial das áreas expostas à indução artificial das lesões de cárie e erosão e das áreas não expostas aos desafios ácidos, para o cálculo da porcentagem de Variação da Perda de Dureza (%VPD) em cada espécime, de acordo com a seguinte fórmula (Torres et al., 2010):

$$\%VPD = \frac{\text{MICRODUREZA DA ÁREA NÃO EXPOSTA} - \text{MICRODUREZA DA ÁREA EXPOSTA}}{\text{MICRODUREZA INICIAL}} \times 100$$

Para a mensuração da microdureza os blocos de resina contendo os espécimes foram fixados com cera utilidade a uma base de acrílico com o auxílio de um paralelômetro (ElQuip, São Carlos-SP, Brasil), de forma a deixar a superfície a ser analisada paralela à placa, o que é essencial para a realização das medidas de microdureza.

Para medir as indentações realizadas, duas marcas que aparecem no visor do microdurômetro foram sobrepostas aos vértices agudos do losango correspondente à indentação, determinando o comprimento da maior diagonal e, conseqüentemente, o valor de dureza Knoop, em KHN, foi calculado automaticamente pelo *software* do equipamento, por meio da equação:

$$\text{KHN} = \frac{C \cdot c}{D^2}$$

Onde: KHN = valor de dureza Knoop

C (constante) = 14,230

c = 10 gramas

D = comprimento da maior diagonal da indentação.

As medidas foram obtidas a 20, 40 e 60 μm de profundidade, em relação à superfície do esmalte, sendo realizadas 3 indentações em cada profundidade, com distância de 70 μm entre elas para, em seguida, ser calculada a média dos dados obtidos (Figura 5). Foram realizadas, em cada espécime, indentações do lado desmineralizado e do lado não submetido aos desafios de desmineralização.

Figura 5 - Esquema das indentações para avaliação da microdureza subsuperficial na área exposta ao desafio de indução artificial de lesão (cárie/erosão) e na área não exposta ao desafio ácido. JAD: Junção Amelo-Dentinária.

■ : Área de esmalte exposto

□ : Área de esmalte não exposto

A sequência da metodologia empregada para a análise da microdureza está ilustrada na Figura 6.

Figura 6 – Fluxograma da metodologia empregada para a análise da microdureza sub-superficial, nos espécimes submetidos à indução artificial das lesões de cárie/erosão.

3.8 MENSURAÇÃO DA PROFUNDIDADE DAS LESÕES APÓS OS DESAFIOS ÁCIDOS, EM MICROSCOPIA DE LUZ

Após as medidas de microdureza, os espécimes (experimentais n=10/grupo e controle n=8/grupo) foram seccionados longitudinalmente, obtendo-se uma secção de 300µm de espessura para cada espécime, utilizando disco diamantado (#7015: KG Sorensen, Barueri-SP, Brasil) sob refrigeração, acoplado em uma máquina de corte (Miniton; Struers A/S, Copenhagen, Dinamarca). As secções foram lixadas e polidas manualmente utilizando-se lixas d'água de granulação #600 e #1200, com a finalidade de obter uma espessura variando de 150 a 180µm. A espessura foi controlada com o auxílio de um paquímetro universal com leitura eletrônica (Digimatic Caliper; Mitutoyo, Suzano-SP, Brasil), com precisão de 0,01mm. Em seguida, os espécimes foram levados a uma cuba ultrassônica (Ultrasonic Clearner T; Odontobrás Ind. e Com., Ribeirão Preto-SP, Brasil), durante 5 minutos, e lavados abundantemente em água destilada.

Os espécimes foram então, observados em microscópio de luz (Carl Zeiss, Jena, Alemanha) em aumento de 10x e suas imagens analisadas utilizando-se o *software* AxioVision (Carl Zeiss, Jena, Alemanha), conectado a uma câmara digital (AxioCam MRc; Carl Zeiss, Jena, Alemanha). Em cada secção foram realizadas, em média, 15 mensurações, expressas em micrometros, da área desmineralizada. A média desses valores foi calculada, representando a indução artificial de lesão de cárie/erosão que o esmalte sofreu em cada secção. A sequência da metodologia empregada para a mensuração das lesões em microscopia de luz está ilustrada na Figura 7.

Figura 7 – Fluxograma da metodologia empregada para a mensuração das lesões em microscopia de luz.

3.9 AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE

Para a análise da permeabilidade do esmalte, 18 incisivos superiores, sendo 10 do grupo experimental e 8 do grupo controle, foram adequadamente limpos com curetas periodontais e armazenados em freezer à temperatura de -20°C até o início dos experimentos.

Os dentes foram submetidos à profilaxia com pasta de pedra-pomes e água, com o auxílio de uma escova de Robinson, montada em contra-ângulo, em baixa rotação. Em seguida, foram examinados sob lupa estereoscópica, com aumento de 10 X (Carl Zeiss, Jena, Alemanha), para certificação da ausência de trincas, fraturas ou alterações de estrutura que pudessem comprometer os resultados do estudo.

Os dentes tiveram as raízes seccionadas na porção cervical, por meio de um disco diamantado (#7015; KG Sorensen, Barueri-SP, Brasil) adaptado em máquina de corte (Miniton; Struers A/S, Copenhagen, Dinamarca), sob refrigeração.

Todos os espécimes tiveram suas porções cervical e incisal isoladas com resina fotopolimerizável (sem condicionamento ácido/adensivo) para evitar a penetração das soluções no interior do canal radicular e na dentina.

O estudo da permeabilidade foi efetuado de acordo com a metodologia histoquímica descrita por Schiavoni et al. (2006), e adaptada para o presente estudo efetuado com dentes de ratos.

Os espécimes impermeabilizados foram imersos em um recipiente contendo 10 mL de solução de sulfato de cobre a 10% (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) por 7 dias, sendo que nos primeiros 5 minutos a imersão foi realizada sob vácuo. Em seguida, os espécimes foram secos com papel absorvente e imersos em 10 mL de solução alcoólica de ácido rubiânico a 1% (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), por 7 dias, sendo que nos primeiros 5 minutos a imersão foi realizada sob vácuo. O ácido rubiânico revela os íons cobre formando um composto com coloração que varia do azul escuro ao preto, dependendo da quantidade de íons presente. A profundidade da infiltração destes íons quantifica a permeabilidade do substrato. Após a coloração, os espécimes foram lavados em água destilada, durante 15 segundos, secos e mantidos em um recipiente vedado, com algodão embebido em amônia por um período de 7 dias, em estufa a 37°C (Pécora et al., 1991; Azevedo, 2011) para a evidência do cobre.

Após o armazenamento em amônia, os espécimes foram lavados, secos e incluídos em blocos de resina de poliéster (Milflex Indústria Química Ltda., São Bernardo do Campo, São Paulo, Brasil) e, em seguida, foram seccionados em uma máquina de corte (Minitom, Struers A/S, Copenhagen, DK-2610, Denmark) montada com um disco diamantado (#7015; KG Sorensen, Barueri-SP, Brasil), para obtenção de três secções transversais com espessura média de 300 μm . As secções foram lixadas e polidas manualmente utilizando-se lixas d'água de granulação #600 e #1200, com a finalidade de obter uma espessura variando de 150 a 180 μm . A espessura foi controlada com o auxílio de um paquímetro universal com leitura eletrônica (Digimatic Caliper; Mitutoyo, Suzano, Brasil), com precisão de 0,01 mm. Em seguida, os espécimes foram levados a uma cuba ultrassônica (Ultrasonic Cleaner T-1449-D; Odontobrás Ind. e Com., Ribeirão Preto-SP, Brasil) durante 5 minutos e lavados abundantemente em água destilada. Foram então, observados em microscópio de luz (Carl Zeiss, Jena, Alemanha), com aumento de 10X, e suas imagens analisadas utilizando-se o *software* AxioVision (Zeiss), conectado a uma câmara digital (AxioCam MRc; Carl Zeiss, Jena, Alemanha). As imagens obtidas foram avaliadas quanto à profundidade de penetração do corante no esmalte (Schiavoni et al., 2006).

Foi efetuada a mensuração da profundidade de penetração dos íons cobre ao longo da área total do esmalte, sendo considerada a média dos valores de três secções centrais de cada espécime.

A sequência da metodologia empregada para a análise da permeabilidade do esmalte em microscopia de luz está ilustrada na Figura 8.

Figura 8 – Fluxograma da metodologia empregada para a análise da permeabilidade do esmalte em microscopia de luz.

3.10 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados foram analisados quanto à sua distribuição e homogeneidade optando-se pelo teste ANOVA, utilizando o software OriginPro 8.0 (OriginLab, Northampton-MA, EUA). O nível de significância adotado foi de 5%.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 DA MICRODUREZA E MENSURAÇÕES DAS LESÕES ARTIFICIAIS DE CÁRIE

Microdureza

Embora numericamente a menor perda de microdureza tenha ocorrido no grupo experimental (uso sistêmico de alendronato de sódio, via gavagem), não foi possível evidenciar diferença estatisticamente significativa ($p = 0,056$) nos resultados de Microdureza obtidos (%VPD) nos grupos experimental (uso sistêmico de alendronato de sódio) e controle (veículo). Os valores médios e os desvios-padrão obtidos para cada grupo estão apresentados na Tabela 1.

TABELA 1 - Médias da porcentagem de Variação da Perda de Dureza (%VPD), dos grupos experimental (uso sistêmico de alendronato de sódio) e controle (veículo)

	%VPD	DP*	p**
Grupo Experimental	20,54	$\pm 13,2$	0,056
Grupo Controle	22,72	$\pm 21,17$	

* DP: Desvio-padrão

** valor de p para o teste ANOVA

Microscopia de luz

A tabela 2 mostra que as lesões de cárie observadas no esmalte de dentes de ratos tratados sistemicamente com alendronato de sódio embora apresentem menor profundidade, não foram estatisticamente diferentes das lesões observadas nos dentes do grupo controle ($p=0,58$).

TABELA 2 - Médias (μm) da profundidade das lesões de cárie dos grupos experimental (uso sistêmico de alendronato de sódio) e controle (veículo)

	Médias	DP*	p**
Grupo Experimental	62,29 μm	$\pm 11,45 \mu\text{m}$	0,58
Grupo Controle	72,07 μm	$\pm 5,31 \mu\text{m}$	

* DP: Desvio-padrão

** valor de p para o teste ANOVA

4.2 DA MICRODUREZA E MENSURAÇÕES DAS LESÕES ARTIFICIAIS DE EROSÃO

Microdureza

De acordo com a tabela 3, observa-se que não houve diferença significativa ($p=0,26$) entre os grupos experimental e controle, com relação à porcentagem de Variação da Perda de Dureza na superfície do esmalte, após a indução das lesões de erosão.

TABELA 3 - Médias da porcentagem de Variação da Perda de Dureza (%VPD), dos grupos experimental (uso sistêmico de alendronato de sódio) e controle (veículo)

	%VPD	DP*	p**
Grupo Experimental	62,95	$\pm 8,10$	0,26
Grupo Controle	54,45	$\pm 9,58$	

* DP: Desvio-padrão

** valor de p para o teste ANOVA

Microscopia de luz

De acordo com os resultados obtidos na tabela 4, não houve diferença significativa ($p=0,19$) na profundidade das lesões de erosão observadas no esmalte dos dentes tratados com alendronato (experimental) e dos dentes do grupo controle, embora houvesse uma tendência de menor tamanho das lesões erosivas no esmalte do grupo experimental, em relação ao controle.

TABELA 4 - Médias (μm) da profundidade das lesões de erosão dos grupos experimental (uso sistêmico de alendronato de sódio) e controle (veículo)

	Médias (μm)	DP*	p**
Grupo Experimental	23,78 μm	$\pm 19,93 \mu\text{m}$	0,19
Grupo Controle	32,21 μm	$\pm 10,88 \mu\text{m}$	

* DP: Desvio-padrão

** valor de p para o teste ANOVA

Os dados da indução de lesões de cárie e erosão são coerentes quando mostram que o esmalte dos dentes tratados com alendronato (grupo experimental) apresentou menores valores numéricos de porcentagem de Variação da Perda de Dureza (maior resistência), quando comparado aos valores do esmalte dos dentes do grupo controle, embora sem diferença estatisticamente significativa.

A Figura 9 representa as médias, os desvios-padrão e os valores máximos e mínimos de microdureza subsuperficial em KHN, nos espécimes submetidos à indução artificial de lesões de cárie (A) e à indução de lesões de erosão (KHN) de ambos os grupos experimental (Exp-NE=não exposto, Exp-E=exposto) e controle (Cont-NE=não exposto, Cont-E=exposto).

Figura 9 – Box Plots representando as médias, os desvios-padrão e os valores máximos e mínimos de microdureza subsuperficial em KHN, nos espécimes submetidos à indução artificial de lesões de cárie (A) e de lesões de erosão (KHN) de ambos os grupos experimental (Exp-NE=não exposto, Exp-E=exposto) e controle (Cont-NE=não exposto, Cont-E=exposto).

4.3 DA PERMEABILIDADE

Com relação à permeabilidade, não foi possível observar diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,050$), evidenciando que a penetração do agente traçador foi semelhante no esmalte de dentes expostos ao alendronato (grupo experimental) e no esmalte dos dentes do grupo controle (Figuras 14 e 15). Os valores médios, em μm e os desvios-padrão obtidos para os substratos, de ambos os grupos, estão apresentados na Tabela 5.

TABELA 5 – Médias (μm) do percentual de penetração do agente traçador, nos grupos experimental (uso sistêmico de alendronato de sódio) e controle (veículo)

	Médias (μm)	DP*	p**
Grupo Experimental	25,58 μm	$\pm 12,73 \mu\text{m}$	0,050
Grupo Controle	25,40 μm	$\pm 4,67 \mu\text{m}$	

* DP: Desvio-padrão

** valor de p para o teste ANOVA

As imagens representativas do esmalte de dentes de ratos, das mensurações da profundidade das lesões de desmineralização e da penetração do agente traçador (permeabilidade) de ambos os grupos, controle e experimental, estão apresentadas na figura 10, respectivamente.

Figura 10 - Imagens representativas, observadas em microscopia de luz no esmalte de dentes de ratos (20x)

1) LESÕES DE CÁRIE/EROSÃO

GRUPO CONTROLE:

- A- Aspecto do esmalte.
- B- Mensuração da profundidade da lesão.

GRUPO EXPERIMENTAL:

- C -Aspecto do esmalte.
- D -Mensuração da profundidade da lesão.

2) PERMEABILIDADE

GRUPO CONTROLE:

- E -Aspecto do esmalte.
- F -Mensuração da profundidade de penetração do agente traçador.

GRUPO EXPERIMENTAL:

- G -Aspecto do esmalte.
- H -Mensuração da profundidade de penetração do agente traçador.

Discussão

5 DISCUSSÃO

Diferente de outros tecidos mineralizados, o esmalte perde a grande maioria das proteínas e da água presente em sua matriz orgânica durante o progresso de sua formação, também conhecido como amelogênese, resultando no tecido mais mineralizado que pode ser observado em mamíferos. Por esta razão, o esmalte não sofre remodelação uma vez concluída sua formação e, conseqüentemente, substâncias incorporadas ou alterações em sua estrutura são marcas (características) permanentes (Gerlach et al., 2002).

É conhecido que uma grande variedade de condições e drogas podem causar distúrbios na formação e mineralização do esmalte humano (Small e Murray, 1978), sendo os defeitos de desenvolvimento do esmalte classificados em hipoplasia e hipomineralização (Suckling, 1989).

Vários estudos demonstraram os efeitos dos bisfosfonatos na mineralização tanto da dentina quanto do esmalte (Simmelink, 1987; Ohya et al., 1989; Fejerskov et al., 1990; Weile et al., 1990; 1993; Fouda et al., 1991; Takano et al., 1998). O uso do etidronato (HEBP), bisfosfonato que não contém nitrogênio, interfere na fibrillogênese de colágeno na dentina (Larsson, 1974; Ogawa et al., 1989), na síntese de matriz dentinária (Beertsen et al., 1985), na mineralização da dentina (Takano et al., 1998; Sakai et al., 1999), mineralização do esmalte (Weile et al., 1990), na morfologia do ameloblasto (Fejerskov et al., 1990; Josephsen et al., 1990) e nas funções dessas células, incluindo efeitos na síntese e secreção de proteínas (Fuangtharnthip et al., 2000; Yamada et al., 2000).

O etidronato interfere também na síntese e nas propriedades biológicas de glicosaminoglicanas, proteoglicanas, colágeno e fosfolípidos (Larsson, 1974), afetando a mineralização da dentina e do esmalte (Simmelink, 1987; Ohya et al., 1989; Fejerskov et al., 1990; Weile et al., 1990; 1993; Fouda et al., 1991; Takano et al., 1998).

O etidronato (HEBP) é um dos bisfosfonatos básicos e apresenta um efeito inibitório relativamente maior na mineralização que na reabsorção óssea (Schenk et al., 1973). O etidronato é um bisfosfonato não aminado, diferente do alendronato, medicamento pertencente ao grupo dos bisfosfonatos aminados, que são mais amplamente prescritos atualmente, do ponto de vista clínico, em pacientes com desordens ósseas (Orbak et al., 2006; Inoue et al., 2008; Kawate et al., 2010). Além disso, o alendronato possui elevada afinidade mineral e potente atividade antirreabsortiva, dada a sua capacidade de afetar processos celulares bioquímicos, como a inibição da enzima farnesil pirofosfato sintase (FPPS) (Russell et al., 2008).

Os estudos que avaliaram o comportamento do alendronato sistêmico no esmalte de dentes de ratos apresentam resultados discordantes, possivelmente pelas diferentes vias de administração e diferentes doses empregadas. No estudo realizado por Massa et al., em 2006, cujo objetivo foi avaliar o efeito desta droga (2,5mg/Kg/dia por 3 dias), por meio de imunoistoquímica, na deposição de amelogenina durante os estágios iniciais da odontogênese de molares de ratos recém-nascidos, os resultados revelaram alterações evidentes na matriz extracelular em todos os estágios da odontogênese. Martins-Ortiz (2004) observou, em estudo histopatológico, que a administração de alendronato desde o início da odontogênese pode aumentar a resistência dos tecidos à reabsorção dentária. Em 2012, Nelson-Filho et al., ao avaliarem as estruturas dentárias mineralizadas de incisivos de ratos expostos sistemicamente ao alendronato de sódio, evidenciaram que a incorporação do alendronato à estrutura dentária não foi capaz de provocar nenhum efeito significativo.

Sabendo-se que o comportamento dos bisfosfonatos é dose e tempo dependente, segundo Yamada et al. (2000), os distúrbios na amelogênese ocorrerem apenas quando a concentração sanguínea deste composto é alta. Da mesma forma, Simmelink (1987) relatou que quando os bisfosfonatos (HEBP e Cl_2MDP) foram injetados subcutaneamente em concentrações menores (2,5mg/Kg), o efeito na amelogênese foi menor, ao contrário de quando foram administradas doses maiores. Considerando que a meia vida dos bisfosfonatos em humanos é muito maior do que nos ratos, considerando a farmacocinética e o mecanismo de ação desses medicamentos, não se deve projetar trabalhos em ratos administrando os bisfosfonatos por períodos curtos, inferiores a um mês (Martins-Ortiz, 2004).

Com base nestes aspectos, Nelson-Filho et al. (2012), para uma possível extrapolação dos resultados obtidos em modelos animais, utilizaram de uma dosagem comparável à humana, considerando o índice metabólico do rato como animal experimental. Este índice determina a velocidade e tempo em que a droga permanecerá em níveis terapeuticamente ativos na circulação sanguínea e nos tecidos e, para a sua determinação, deve-se levar em conta o peso e a superfície corporal. O índice metabólico é muito variável de espécie para espécie, sendo que os ratos têm um índice metabólico 2 vezes mais rápido que o do homem (Keidel, 1971).

Por estes aspectos, considerando-se a dose de alendronato recomendada para humanos, o protocolo de utilização da droga empregado no presente estudo foi a administração de 1mg/Kg de peso de alendronato sódico, duas vezes por semana, durante um período de 60 dias.

O presente estudo baseou-se no mesmo protocolo de Nelson-Filho et al. (2012) para a administração sistêmica do alendronato de sódio por se tratar do primeiro estudo que analisou, por meio de métodos químicos, se o alendronato se incorpora à estrutura dentária durante a mineralização. Segundo a análise desses autores, por espectrometria na região do infravermelho, foi possível detectar a presença de alendronato sódico na amostra do grupo experimental e de acordo com o teste de espectroscopia de fluorescência empregado, também foi possível determinar a quantidade de droga encontrada, em média, em cada elemento dental, que foi de aproximadamente 0,0018%. Esse resultado comprova a elevada afinidade deste composto pela hidroxiapatita, fazendo com que seja rapidamente incorporado à matriz em mineralização, seja de tecido ósseo ou de outros tecidos mineralizados, inclusive o dente.

Por essa razão, delineamos o protocolo experimental do presente estudo, com o objetivo de avaliar se o alendronato de sódio, uma vez presente no dente, poderia alterar sua resistência à desmineralização após desafios ácidos, tornando o elemento dental mais ou menos susceptível à cárie e aos processos erosivos.

Deve-se ressaltar que no presente estudo observou-se que os dentes expostos ao uso sistêmico do alendronato de sódio apresentaram valores numéricos de microdureza subsuperficial do esmalte superiores aos dos dentes do grupo controle. Esses resultados possivelmente podem ser explicados pelo fato do uso do alendronato sistemicamente promover a incorporação nos tecidos dentais mineralizados (Nelson-Filho et al., 2012).

O preparo dos espécimes utilizados neste estudo baseou-se em trabalhos cujo objetivo era a avaliação do esmalte de ratos (Saiani et al., 2009), de humanos (Torres et al., 2010; Honório et al., 2010; Correa-Afonso et al., 2012) e de bovinos (Amaechi e Higman, 2001; Faraoni-Romano et al., 2008; Rehder-Neto et al., 2009), por meio principalmente da microdureza e da análise em microscopia de luz.

Assim como relatado por Saiani et al. (2009), salientamos a grande dificuldade técnica em manipular os espécimes dos dentes de ratos, devido às suas reduzidas dimensões e espessura mínima necessária para a correta avaliação em microscopia de luz e no microdurômetro, tornando necessário descartar alguns espécimes, em função da perda de parte do esmalte ao longo da extensão do fragmento.

Para as ciclagens de pH, a solução desmineralizante utilizada no presente trabalho foi preparada de acordo com modelo proposto por Serra e Cury (1992), por ser capaz de induzir lesões *in vitro* em esmalte de forma semelhante ao ambiente bucal, enquanto a solução remineralizante preconizada por Amaechi e Higman (2001), contendo cálcio, fosfato e flúor, possui um efeito remineralizador em esmalte desmineralizado artificialmente, como

relatado em estudos prévios (Gelhard et al., 1983; Vissink et al., 1985; Torres et al., 2010). A saliva artificial utilizada neste experimento foi baseada no estudo de Amaechi et al. (1999), no qual demonstraram que esta teve o mesmo efeito remineralizador da saliva humana fresca.

Para a indução artificial das lesões de erosão optou-se pelo uso de refrigerante à base de cola, por demonstrar um potencial erosivo (Ehlen et al., 2008) capaz de diminuir a dureza do esmalte de espécimes *in vitro* (Panish e Poolthong, 2009). As bebidas do tipo cola apresentam baixa concentração de cálcio, fosfato e flúor e baixo valor de pH (Lussi et al., 2004). Normalmente, contém 0,1% de ácido fosfórico (Hughes et al. 2000) conferindo a elas ação erosiva. As imersões foram realizadas sob agitação para simular a forma como os dentes são banhados no momento da ingestão de bebidas, uma vez que durante o consumo as soluções não permanecem estáticas na cavidade bucal. Além disso, a dinâmica produzida pela agitação permite que haja renovação do líquido sobre a estrutura do esmalte (Torres et al., 2010).

Na literatura específica, não foram encontrados trabalhos que utilizaram esmalte de dentes de ratos tratados ou não com alendronato de sódio, sugerindo um protocolo para indução de lesões de desmineralização e/ou erosão, nesse modelo animal. Por esse motivo, adotou-se neste estudo a metodologia sugerida em vários trabalhos *in vitro* para indução de lesões e avaliação do esmalte desmineralizado de dentes humanos e bovinos (Torres et al., 2010; Honório et al., 2010; Correa-Afonso et al., 2012; Rehder-Neto et al., 2009; Faraoni-Romano et al., 2008; Derceli, 2010).

5.1 MICRODUREZA

A avaliação da microdureza é um método viável para quantificar as alterações dos tecidos dentais (DenBesten et al., 2001; Ozbek et al., 2004; Porto et al., 2009; Torres, 2010, 2011; Gomes-Silva, 2011;) submetidos a desafios erosivos (Barbour e Rees, 2004; Attin, 2006; Stenhagen et al., 2010; Torres et al., 2010) e de indução de lesões de cárie (Muller et al., 2007; Rehder-Neto et al., 2009; Honório et al., 2010; Correa-Afonso et al., 2012). A avaliação da microdureza é definida como a mensuração da resistência à deformação permanente de uma superfície quando uma carga é aplicada por um indentador (aço, tungstênio ou diamante). A medida da dureza se dá pela relação entre unidade de força pela unidade de área deformada (Kinney et al., 2003).

A Microdureza Knoop, empregada neste estudo, tem sido amplamente utilizada nos substratos dentários, pois sua indentação permite medidas mais precisas, mesmo em áreas onde as marcas são rasas, devido ao fato de sua ponta de penetração possuir uma diagonal longa (Kinney et al., 2003). Considera-se que a microdureza é o método quantitativo mais empregado para verificar a desmineralização e erosão dental, por ser uma técnica de execução simples e de relativo baixo custo, apresentando resultados satisfatórios (Barbour e Rees, 2004).

Utilizou-se o microdurômetro e com auxílio de um penetrador de diamante para dureza Knoop (KHN) adaptando-se a técnica para analisar esmalte de rato, onde aplicou-se uma carga de 10gf com duração de 10 segundos, de maneira que a ponta do penetrador permanecesse paralela à subsuperfície do esmalte. Os valores de carga de força e distância de penetração foram determinados em estudo piloto prévio, sendo inferior aos valores utilizados em outros trabalhos (Honório et al., 2010; Turssi et al., 2010; Correa-Afonso et al., 2012), uma vez que o esmalte de dentes de ratos apresentam menor dimensão e espessura. Da mesma maneira, em razão da pequena espessura e extensão das penetrações que foram realizadas na região de subsuperfície do esmalte, apenas 3 medidas foram utilizadas para a análise dos dados, sendo a primeira marcação localizada 20 μ m abaixo da região de análise e as marcações seguintes realizadas a 40 e 60 μ m na mesma direção, sendo realizadas 3 indentações em cada espécime com distância de 70 μ m entre elas.

Apesar de se tratar de uma metodologia de escolha para análise *in vitro* (Rehder-Neto et al., 2009; Torres et al., 2010; Honório et al., 2010; Correa-Afonso et al., 2012) e *in situ* (Faraoni-Romano et al., 2008; Turssi et al., 2010; Correa-Afonso et al., 2012) da indução artificial de lesões de cárie e erosão, observando-se sempre resultados de perda de dureza do esmalte submetido ao desafio, a literatura é escassa em estudos envolvendo avaliação da microdureza em esmalte de dentes de ratos (Vieira et al., 2005; do Espírito Santo et al., 2010; Nelson-Filho et al., 2012), evidenciando valores em média de 260KHN para os dentes normais (controle) e 255KHN para os dentes formados em presença de alendronato, que são médias de valores semelhantes aos obtidos no presente estudo. Como já salientado, não há estudos publicados avaliando dentes de ratos tratados sistemicamente com alendronato de sódio e submetidos a desafios ácidos, o que impossibilita a comparação direta dos resultados obtidos no presente estudo.

Embora o alendronato de sódio, no trabalho de Nelson-Filho et al. (2012), tenha sido incorporado ao esmalte de dentes de ratos, não se observou alterações estruturais de acordo com os parâmetros avaliados. Entretanto, este é um resultado muito valioso que

comprova a elevada afinidade deste composto pela hidroxiapatita, fazendo com que seja rapidamente incorporado à matriz em mineralização, seja de tecido ósseo ou de outros tecidos mineralizados, inclusive o dente. A literatura evidencia que outros elementos, assim como o alendronato, incorporam-se aos tecidos dentais, porém causam efeitos severos. Um excelente exemplo é o flúor, conhecido por reduzir a solubilidade do substrato dental ao ataque ácido em desafios cariogênicos, exercendo importante função na prevenção e controle da cárie dental (Leite et al., 2011). Outro exemplo é o chumbo, que possui grande afinidade aos tecidos mineralizados e pode ser incorporado ao esmalte dental após exposições sistêmicas e subclínicas ficando aprisionado no tecido que uma vez formado, não se remodela (Swan et al., 2010).

No presente trabalho, embora os valores de microdureza Knoop tenham sido maiores no esmalte de dentes de ratos tratados com alendronato de sódio, comparativamente aos dentes de ratos do grupo controle, observou-se não haver diferença significativa na porcentagem de Variação da Perda da Dureza entre os grupos, tanto na indução de lesões de cárie quanto de lesões de erosão. Esses resultados evidenciam que, estatisticamente, mesmo sendo incorporado ao esmalte de dentes de ratos, o alendronato não tornou esse substrato mais resistente aos desafios ácidos.

5.2 MICROSCOPIA DE LUZ

A microscopia de Luz permite avaliar os aspectos morfológicos das estruturas estudadas (Simmelink, 1997; Porto et al., 2009; Honório et al., 2010), fornecendo dados qualitativos e quantitativos uma vez que as imagens são capturadas e digitalizadas permitindo mensurações em extensão ou profundidade (Saiani et al., 2009; Correa-Afonso et al., 2012). É utilizada para avaliar alterações nas lesões de esmalte, pois permite reconhecer mudanças definidas em diferentes partes do tecido (Fejerskov, 1979; Saiani et al., 2009).

Embora vários estudos tenham empregado a microscopia de luz em dentes de bovinos (Derceli, 2010), de humanos (Honório et al., 2010; Correa-Afonso et al., 2012) ou de ratos (Mori et al., 2009; Saiani et al., 2009; Porto et al., 2009; do Espírito Santo et al., 2010; Nelson-Filho et al., 2012), nenhum estudo mensurou possíveis alterações da permeabilidade das estruturas dentais mineralizadas em presença ou não de alendronato incorporado, impossibilitando a comparação direta dos resultados obtidos no presente estudo, também nesse aspecto.

5.3 DOS RESULTADOS DA PERMEABILIDADE

O conteúdo orgânico no esmalte está presente em concentrações muito baixas (1%), sob a forma de pequenos peptídeos e aminoácidos distribuídos pelo tecido como remanescentes da matriz orgânica sintetizada na fase de desenvolvimento do substrato, provavelmente ligados aos cristais de hidroxiapatita. Na região interprismática existe menor densidade de cristais e, portanto, maior conteúdo orgânico. Esta fase protéica associada à presença da água (4%) permite a difusão de substâncias, conferindo a propriedade de permeabilidade deste substrato (Brik et al., 2000).

A análise da permeabilidade constitui-se um método eficaz para a avaliação de procedimentos preventivos e das alterações dos tecidos dentários frente aos materiais restauradores (Turssi et al., 2006; Chersoni et al., 2011).

A metodologia histoquímica utilizada na análise da permeabilidade no presente estudo, foi originalmente descrita para o tecido dentinário. Porém, estudos prévios realizaram a adaptação da metodologia para avaliação da permeabilidade em esmalte (Schiavoni et al., 2006; Turssi et al., 2006) e, posteriormente, para a análise em esmalte de dentes decíduos (Azevedo, 2011).

No presente estudo, ao avaliar se o esmalte dos dentes expostos ao alendronato de sódio se comportaria de forma diferente do esmalte dos dentes do grupo controle, pela análise da permeabilidade, observamos que houve penetração do agente traçador em ambos os grupos, sem diferença significativa entre eles, demonstrando que o alendronato não interferiu na capacidade de difusão de substâncias pelo esmalte de dentes de ratos.

No entanto, até o momento, essa metodologia não foi empregada para avaliar as estruturas dentais de dentes de ratos submetidos a tratamentos sistêmicos.

Por outro lado, Gandolfi et al. (2007) avaliaram, em esmalte dental humano, o efeito tópico do alendronato de sódio por meio da imersão dos fragmentos de esmalte em soluções a 0,1M de alendronato de sódio com diferentes valores de pH, por 10 minutos. Por meio da análise de liberação de cálcio em agitador magnético, observaram que o uso tópico do alendronato reduziu a desmineralização do esmalte dental humano.

Assim, estudos adicionais são necessários a fim de avaliar se outras formas de utilização de alendronato de sódio poderiam influenciar na progressão/controle das lesões de cárie e/ou erosivas.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

Considerando-se as condições específicas deste trabalho e com base nos resultados obtidos nas diferentes metodologias empregadas, pôde-se concluir que:

Após o uso sistêmico do alendronato de sódio, o esmalte de dentes de ratos não apresentou maior resistência aos desafios ácidos (indução artificial de lesões de cárie e erosão) e não sofreu alteração em sua permeabilidade.

Referencias

REFERÊNCIAS*

- Amaechi BT, Higham SM. *In vitro* remineralization of eroded enamel lesions by saliva. J Dent 2001; 29:371-76.
- Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM. Factors influencing the development of dental erosion in vitro: enamel type, temperature and exposure time. J Oral Rehabil 1999;26:624-30.
- Attin T. Methods for assessment of dental erosion. Monographs in Oral Science 2006;20:152-72.
- Azevedo DT. Avaliação in vitro da resistência ácida e da permeabilidade do esmalte dental decíduo irradiado com laser Nd:YAG associado ou não ao flúor. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; Ribeirão Preto, 2011 72p.
- Bachrach LK, Ward LM. Clinical Review: Bisphosphonate Use in Childhood Osteoporosis. J Clin Endocrinol Metab 2009;94:400-9.
- Bala Y, Farlay D, Chapurlat R, Boivin G. Modifications of bone material properties in postmenopausal osteoporotic women long-term treated with alendronate. Eur J Endocrinol. 2011;165:647-55.
- Barbour ME, Rees JS. The laboratory assessment of enamel erosion: review. Journal of Dentistry. 2004; 32:591-02.
- Beertsen W, Niehof A, Everts V. Effects of 1-hydroxyethylidene-1,1-bisphosphonate (HEBP) on the formation of dentin and the periodontal attachment apparatus in the mouse. Am J Anat 1985;174:83-03.
- Bradaschia-Correa V, Massa LF, Arana-Chavez VE. Effects of alendronate on tooth eruption and molar root formation in young growing rats. Cell Tissue Res 2007; 330:475-85.
- Brik A, Haskell E, Brik V, Scherbina O, Atamanenko O. Anisotropy effects of EPR signals and mechanisms of mass transfer in tooth enamel and bones. Appl Radiat Isot 2000;52:1077-83.
- Brudevold F, Steadman LT, Smith FA. Inorganic and organic components of tooth structure. Ann N Y Acad Sci 1960;29:110-32.
- Chersoni S, Bertacci A, Pashley DH, Tay FR, Montebugnoli L, Prati C. In vivo effects of fluoride on enamel permeability. Clin Oral Investig 2011;15:443-9.
- Correa-Afonso AM, Ciconne-Nogueira JC, Pécora JD, Palma-Dibb RG. In vitro assessment of laser efficiency for caries prevention in pits and fissures. Microsc Res Tech. 2012;75:245-52.

*Normas internas do Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria da FORP-USP (2009), de acordo com o International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for manuscripts submitted to Medical Journal, 1997. Disponível em: <http://www.mja.com.au/public/information/uniform.html>. Acesso em janeiro de 2012.

DenBesten PK, Machule D, Gallagher R, Marshall GW Jr, Mathews C, Filvaroff E. The effect of TGF-beta 2 on dentin apposition and hardness in transgenic mice. *Adv Dent Res* 2001;15:39-41.

Derceli, JR. Avaliação do efeito da associação da irradiação laser Er:YAG com flúor no esmalte dental submetido à erosão. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; Ribeirão Preto, 2010 78p.

do Espírito Santo AR, Frozoni MR, Ramos-Peres FM, Novaes PD, Line SR. Birefringence of the secretory-stage enamel organic extracellular matrix from rats submitted to successive injections of bisphosphonates. *Connect Tissue Res* 2010;51:208-15.

Ebetino FH, Francis MD, Rogers MJ, Russell RGG. Mechanisms of action of etidronate and other bisphosphonates. *Rev Contemp Pharmacother* 1998;9:233-43.

Ehlen LA, Marshall TA, Qian F, Wefel JS, Warren JJ. Acidic beverages increase the risk of *in vitro* tooth erosion. *Nutr Res* 2008;28:299-03.

Eisenmann DR. Estrutura do Esmalte. In: Ten Cate, A. R. *Histologia Bucal- Desenvolvimento, Estrutura e Função*. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara- Koogan; 2001.

Faraoni-Romano JJ, Da Silveira AG, Turssi CP, Serra MC. Bleaching agents with varying concentrations of carbamide and/or hydrogen peroxides: effect on dental microhardness and roughness. *J Esthet Restor Dent* 2008;20:395-02.

Fejerskov O, Josephsen K, Weile V. The effect of a single dose of 1-hydroxyethylidene-1,1-bisphosphonate (HEBP) on secretory ameloblasts and enamel formation in rat incisors. *J Biol Buccale* 1990;18:339-54.

Fejerskov O, Kidd E. *Cárie Dentária: a doença e seu tratamento clínico*. 1 ed. São Paulo: Editora Santos; 2005.

Fejerskov O, Yaeger JA, Thylstrup A. Microradiography of acute and chronic administration of fluoride on human and rat dentine and enamel. *Arch Oral Biol* 1979;24:123-30.

Fleisch H. Bisphosphonates: mechanisms of action. *Endocr Rev* 1998;19:80-00.

Fleish H. Development of bisphosphonates. *Breast Cancer Res* 2002;4:30-4.

Fouda N, Caracatsanis M, Kut IA, Hammarstrom L. Mineralization disturbances of the developing rat molar induced by mono- and bisphosphonates. *J Biol Buccale* 1991;19:106-15.

Fuangtharnthip P, Yamada Y, Takagi Y, Ohya K. Autoradiographic investigation of the effect of 1-hydroxyethylidene-1, 1-bisphosphonate on matrix protein synthesis and secretion by secretory ameloblasts in rat incisors. *Arch Oral Biol* 2000;45:495-06.

Gandolfi MG, Nucci C, Prati C, Mongiorgi R. Dental enamel dissolution after alendronate treatment. *Am J Dent* 2007;20:235-40.

Gelhard TB, Fidler V, s-Gravenmade EJ, Vissink A. Remineralization of softened human enamel in mucin- or CMC-containing artificial salivas. *J Oral Pathol* 1983; 12:336-41.

- Gerlach RF, Cury JA, Krug FJ, Line RP. Effect of lead on dental enamel formation. *Toxicol* 2002;175:27-34.
- Gomes-Silva JM. Propriedades químicas e físicas do esmalte de dentes decíduos e permanentes. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2011 83p.
- Gwinnett AJ. Structure and composition of enamel. *Oper Dent* 1992;5:10-7.
- He LH, Swain MV. Enamel - A functionally graded natural coating. *J Dent* 2009;37:596-603.
- Honório HM, Rios D, Júnior ES, de Oliveira DS, Fior FA, Buzalaf MA. Effect of acidic challenge preceded by food consumption on enamel erosion. *Eur J Dent* 2010;4:412-7.
- Hughes JA, West NX, Parker DM, Newcombe RG, Addy M. Development and evaluation of a low erosive blackcurrant juice drink *in vitro* and *in situ*. 1. Comparison with orange juice. *J Dent* 1999; 27:285-9.
- Inoue Y, Shimojo N, Suzuki S, Arima T, Tomiita M, Minagawa M, Kohno Y. Efficacy of intravenous alendronate for the treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis in children with autoimmune diseases. *Clin Rheumatol* 2008;27:909-12.
- Josephsen K, Fejerskov O, Baelum V, Weile V. The effect of a single dose of 1-hydroxyethylidene-1,1-bisphosphonate (HEBP) on presecretory ameloblast differentiation in rat incisors. *J Biol Buccale* 1990;18:321-37.
- Kawate H, Ohnaka K, Adachi M, Kono S, Ikematsu H, Matsuo H, Higuchi K, Takayama T, Takayanagi R. Alendronate improves QOL of postmenopausal women with osteoporosis. *Clin Interv Aging* 2010;5:123-31.
- Keidel WD. *Fisiologia*. 2.ed., Barcelona, Salvat, 1971.
- Kinney JH, Marshall SJ, Marshall GW. The mechanical properties of human dentin: a critical review and re-evaluation of the dental literature. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003;14:13-29.
- Larsson A. The short-term effects of high doses of ethylene-1-hydroxy-1,1-diphosphonates upon early dentin formation. *Calcif Tissue Res* 1974;16:109-27.
- Leanne W, Andrea T, Phuc-Nhi P, Ann C, Nick B, Isabelle G, Frank R, Peter T, David M. Bisphosphonate therapy for children and adolescents with secondary osteoporosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, Issue 3, 2009.
- Leite GA, Sawan RM, Teófilo JM, Porto IM, Sousa FB, Gerlach RF. Exposure to lead exacerbates dental fluorosis. *Arch Oral Biol* 2011;56:695-02.
- Lewiecki EM. Intravenous zoledronic acid for the treatment of osteoporosis: The evidence of its therapeutic effect. *Core Evid* 2010;4:13-23.
- Litonjua LA, Andreana S, Bush PJ, Cohen RE. Tooth wear: attrition, erosion, and abrasion. *Quintessence Int* 2003; 34:435-46.
- Lucisano, MP. Efeito do uso sistêmico de alendronato sódico no tecido ósseo e nas estruturas dentárias mineralizadas: Estudo químico, mecânico e morfológico, em modelo murino. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2010 84 p.
- Lussi A, Jaeggi T, Zero D. The role of diet in the aetiology of dental erosion. *Caries Res* 2004; 38:34-44.

- Lussi A, Schlueter N, Rakhmatullina E, Ganss C. Dental erosion--an overview with emphasis on chemical and histopathological aspects. *Caries Res* 2011;45:2-12.
- Marsh PD. The role of microbiology in models of dental caries. *Adv Dent Res* 1995;9:244-254.
- Martins-Ortiz MF. Influência dos bisfosfonatos na movimentação dentária induzida, nas frequência e nas dimensões das reabsorções radiculares associadas. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. Bauru, 2004 187p.
- 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;54:713-25.
- Meckel AH, Griebstein WJ, Neal RJ. Structure of mature human dental enamel as observed by electron microscopy. *Arch Oral Biol* 1965;10:775-83.
- Mori GG, de Moraes IG, Nunes DC, Castilho LR, Poi WR, Capaldi ML. Biocompatibility evaluation of alendronate paste in rat's subcutaneous tissue. *Dent Traumatol* 2009;25:209-12.
- Müller KP, Rodrigues CR, Núñez SC, Rocha R, Jorge AO, Ribeiro MS. Effects of low power red laser on induced-dental caries in rats. *Arch Oral Biol* 2007;52:648-54.
- Nelson-Filho P, Lucisano MP, Silva RAB, Silva RS, Serra MC, Gerlach RF, Rehder-Neto FC, Carneiro ZA, Zamarioli A, Morse L, Battaglino R. Systemically Alendronate was incorporated into dental tissues but did not cause morphological or mechanical changes in rats teeth. *Microscopy Research and Technique* 2000; *in press*.
- Nelson-Filho P, Silva LAB. Adequação do Meio Bucal. In: Sada Assed. *Odontopediatria. Bases científicas para a prática clínica*. 1 ed. São Paulo, SP: Artes Médicas, 2005.
- Ogawa Y, Adachi Y, Hong S, Yagi T. 1-hydroxyethylidene-1,1-bisphosphonate (HEBP) simultaneously induces two distinct types of hypomineralization in the rat incisor dentine. *Calcif Tissue Int* 1989;44:46-60.
- Ohya K, Matakai S, Wakamatsu H, Ogura H. Effects of successive injections of 1-hydroxyethylidene-1,1-bisphosphonate (HEBP) on the rat incisors enamel. In Fearnhead RW, ed. *Tooth Enamel V*, Yokohama, Florence Publishers 1989;227-34.
- Okada Y, Nawata M, Nakayamada S, Saito K, Tanaka Y. Alendronate Protects Premenopausal Women from Bone Loss and Fracture Associated with High-dose Glucocorticoid Therapy. *J Rheumatol* 2008;35:2249-54.
- Oliveira MAHM, Torres CP, Gomes-Silva JM, Chinelatti MA, Menezes FCH, Palma-Dibb RG, Borsatto MC. Microstructure and mineral composition of dental enamel of permanent and deciduous teeth. *Microsc Res Tech* 2010;73:572-77.
- Orbak Z, Doneray H, Keskin F, Turgut A, Alp H, Karakelleoglu C. Vitamin D intoxication and therapy with alendronate (case report and review of literature). *Eur J Pediatr* 2006;165:583-4.
- Ozbek M, Dural S, Kankli A, Tuncel M, Orhan K. Morphological Evaluation of Rat Incisor Enamel and Dentin Induced by Pregnancy and Lactation using A Scanning Electron Microscope. *J Vet Med Sci* 2009;71:1273-7.

- Panich M, Poolthong S. The effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate and Coca soft drink on in vitro enamel hardness. *J Am Dent Assoc* 2009;140:455-60.
- Pluskiewicz W, Adamczyk P, Czekajło A, Grzeszczak W, Burak W, Drozdowska B. Epidemiological Data on Osteoporosis in Women From the RAC-OST-POL Study. *J Clin Densitom* 2012; 1:1-7.
- Porto IM, Merzel J, Sousa FB, Bachmann L, Cury JA, Line SR, Gerlach RF. Enamel mineralization in the absence of maturation stage ameloblasts. *Arch Oral Biol* 2009;54:313-21.
- Rehder Neto FC, Maeda FA, Turssi CP, Serra MC. Potential agents to control enamel caries-like lesions. *J Dent* 2009;37:786-90.
- Reid IR. Bisphosphonates: new indications and methods of administration. *Curr Opin Rheumatol* 2003;15:458-63.
- Reid DM. Update on the use of zoledronic acid in the management of osteoporosis. *Curr Osteoporos Rep* 2010;8:145-50.
- Russell RGG. Bisphosphonates: Mode of Action and Pharmacology. *Pediatrics* 2007;119:S159-62.
- Russell RGG, Watts NB, Ebetino FH, Rogers MJ. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int* 2008;19:733-59.
- Sakai H, Takano Y, Ohya K, Kurosaki N. Intermittent inhibition of dentin mineralization of rat incisors under continual infusion of 1-hydroxyethylidene-1,1-bisphosphonate (HEBP) using subcutaneous mini osmotic pump. *Arch Histol Cytol* 1999;62:171-9.
- Saleh J, Willke LW, Bassani IA, Kraether L, Molz RF, Santos LA. Obtenção e avaliação de hidroxiapatita in vivo. XVI Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, Porto Alegre, 2004.
- Sawan RM, Leite GA, Saraiva MC, Barbosa F Jr, Tanus-Santos JE, Gerlach RF. Fluoride increases lead concentrations in whole blood and in calcified tissues from lead-exposed rats. *Toxicol* 2010;271:21-26.
- Schenk R, Merz WA, Mühlbauer R, Russell RGG, Fleisch H. Effect of ethane-1-hydroxy-1,1-diphosphonate (EHDP) and dichloromethylene diphosphonate (Cl₂MDP) on the calcification and resorption of cartilage and bone in the tibial epiphysis and metaphysis of rats. *Calcif Tissue Res* 1973;11:196-214.
- Schiavoni RJ, Turssi CP, Rodrigues Jr AL, Serra MC, Pécora JD, Fröner IC. Assessing the effect of bleaching agents on enamel permeability. *Am J Dent* 2006;19:313-6.
- Serra MC, Cury JA. The in vitro effect of glass-ionomer cement restoration on enamel subjected to a demineralization and remineralization model. *Quintessence Int* 1992;23:143-7.
- Simmelink JW. Ultrastructural effects of diphosphonates on dental enamel. *Adv Dent Res* 1987;1:356-65.
- Small BW, Murray JJ. Enamel opacities: prevalence, classifications and aetiological considerations. *J Dent* 1978;6:33-42.
- Stack MV. Organic constituents of enamel. *J Am Dent Assoc* 1954;48:297-06.
- Stenhagen KR, Hove LH, Holme B, Taxt-Lamolle S, Tveit AB. Comparing different methods to assess erosive lesion depths and progression in vitro. *Caries Res* 2010;44:555-61.

Suckling GW. Developmental defects of enamel- Historical and present-day perspectives on their pathogenesis. *Adv Dent Res* 1989;3:87-94.

Sugata Y, Sotome S, Yuasa M, Hirano M, Shinomiya K, Okawa A. Effects of the systemic administration of alendronate on bone formation in a porous hydroxyapatite/collagen composite and resorption by osteoclasts in a bone defect model in rabbits. *J Bone Joint Surg Br* 2011;93:510-6.

Takano Y, Sakai H, Baba O, Sakamoto Y, Terashima T, Ohya K, Kurosaki N. Demonstration of putative Ca-binding domains in dentin matrix of rat incisors after daily injections of 1-hydroxyethylidene-1,1-bisphosphonate (HEBP). *Eur J Oral Sci* 1998;106:274-81.

Ten Cate AR. *Oral histology: development, structure and function*, 4 ed. St. Louis, MO: Mosby, 1994.

Torres CP, Chinelatti MA, Gomes-Silva JM, Rizoli FA, Oliveira MAHM, Palma-Dibb RG, Borsatto MC. Surface and Subsurface Erosion of Primary Enamel by Acid Beverages over Time. *Braz Dent J* 2010; 21: 337-45.

Torres CP. Análise das propriedades físicas e químicas da dentina de dentes decíduos e permanentes – estudo in vitro. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2011 89p.

Turssi CP, Schiavoni RJ, Serra MC, Fröner IC. Permeability of enamel following light-activated power bleaching. *Gen Dent* 2006;54:323-6.

Turssi CP, Messias DF, Corona SM, Serra MC. Viability of using enamel and dentin from bovine origin as a substitute for human counterparts in an intraoral erosion model. *Braz Dent J* 2010;21:332-6.

Van Beek E, Löwik C, Que I, Papapoulos S. Dissociation of binding and antiresorptive properties of hydroxybisphosphonates by substitution of the hydroxyl with an amino group. *J Bone Miner Res* 1996;11:1492-7.

Vieira APGF, Hancock R, Eggertsson H, Everett ET, Grynpas MD. Tooth Quality in Dental Fluorosis: Genetic and Environmental Factors. *Calcif Tissue Int* 2005;76:17-25.

Vissink A, Gravenmade EJ, Gelhard TB, Panders AK, Franken MH. Rehardening properties of mucin- or CMC-containing saliva substitutes on softened human enamel. Effects of sorbitol, xylitol and increasing viscosity. *Caries Res* 1985; 19:212-8.

Wang LJ, Tang R, Bonstein T, Bush P, Nancollas GH. Enamel demineralization in primary and permanent teeth. *J Dent Res* 2006;85:359-63.

Weile V, Josephsen K, Fejerskov O. Effects of single doses of 1-hydroxyethylidene-1,1-bisphosphonate on the mineralizing front of rat incisor enamel: a microradiographic and scanning electron microscopic study. *Archs oral Biol* 1990;35:857-67.

Weile V, Josephsen K, Fejerskov O. Scanning electron microscopy of final enamel formation in rat mandibular incisors following single injections of 1-hydroxyethylidene-1,1-bisphosphonate. *Calcif Tissue Int* 1993;52:318-24.

Yamada Y, Fuangtharntip P, Tamura Y, Takagi Y, Ohya K. Gene expression and immunolocalization of amelogenin in enamel hypoplasia induced by successive injections of bisphosphonate in rat incisors. *Arch Oral Biol* 2000;45:207-15.

A_{nexos}

ANEXO A- APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 10.1.468.53.5), intitulado "Avaliação do Efeito do Alendronato no Esmalte e na Dentina de Incisivos Murinos", de autoria de **Paulo Nelson Filho** por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA

This is to certify that the work (Protocol number 10.1.468.53.5), entitled: "Avaliação do Efeito do Alendronato no Esmalte e na Dentina de Incisivos Murinos", by **Paulo Nelson Filho**, is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the *Campus* of Ribeirão Preto – USP, and was approved in the meeting

Presidente da CEUA

Prof. Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro