

ROSANA HELENA SCHLITTLER HOFFMANN

***Efeito da Amoxicilina e do Fluoreto
no Desenvolvimento do Esmalte
Dental de Camundongos***

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Doutor em Odontologia - Área de Cariologia.

**Orientadora: Profa. Dra. Maria da Luz Rosário de Sousa
Co-orientador: Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho**

**PIRACICABA
2010**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**
Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

H675e	<p>Hoffmann, Rosana Helena Schlittler. Efeito da amoxicilina e do fluoreto no desenvolvimento do esmalte dental de camundongos. / Rosana Helena Schlittler Hoffmann. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2010.</p> <p>Orientadores: Maria da Luz Rosário de Sousa, João Ernesto de Carvalho. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p>1. Amoxicilina. 2. Fluoretos. 3. Esmalte dentário. I. Sousa, Maria da Luz Rosário de. II. Carvalho, João Ernesto de. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">(mg/fop)</p>
-------	--

Título em Inglês: The effect of amoxicillin and fluoride on the development of mouse dental enamel

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Amoxicillin. 2. Fluorides. 3. Dental enamel

Área de Concentração: Cariologia

Titulação: Doutor em Odontologia

Banca Examinadora: Maria da Luz Rosário de Sousa, Fábio Luiz Mialhe, Lydiane Karla Azevedo Rodrigues, Ronaldo Seichi Wada, Viviane Elisangela Gomes

Data da Defesa: 26-02-2010

Programa de Pós-Graduação em Odontologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 26 de Fevereiro de 2010, considerou a candidata ROSANA HELENA SCHLITTLER HOFFMANN aprovada.

Profa. Dra. MARIA DA LUZ ROSARIO DE SOUSA

Profa. Dra. LIDIANY KARLA AZEVEDO RODRIGUES

Profa. Dra. VIVIANE ELISÂNGELA GOMES

Prof. Dr. FABIO LUIZ MIALHE

Prof. Dr. RONALDO SEICHI WADA

Dedico este trabalho....

Ao **Jorge,**

amor eterno e amigo...

"...o que faz uma árvore forte é a sua raiz
e a raiz de uma planta não pode ajudar outra
planta crescer.
Estar junto no mesmo propósito, e deixar que
cada um cresça à sua maneira,
este é o caminho dos que desejam comungar com
Deus."

Ao **Fernando e Felipe,**

a continuidade da
existência;

"Vós sois os arcos dos quais vossos filhos são
arremessados como flechas vivas.
O arqueiro mira o alvo na senda do infinito
e vos estica com toda a sua força
Para que suas flechas se projetem, rápidas e
para longe.

Que vosso encurvamento na mão do arqueiro seja
vossa alegria:
Pois assim como ele ama a flecha que voa,
Ama também o arco que permanece estável.

À **Claudete e Henrique,**

que sempre souberam, com
firmeza, mostrar que os objetivos são
alcançados quando sabemos propor metas e ter
disciplina, mesmo diante de problemas que nos
são apresentados como de difícil solução;

"Nunca te é concedido um desejo sem que te
seja concedida
também a faculdade de torná-lo realidade.
Entretanto, é possível
que tenhas que lutar por ele."

À **Leonor e Ana Marili,** minhas queridas,

Aos Profs. **Steven M. Levy, Erika J. Ernest e Eric T Everett,**

pela
confiança,

Aos Profs. **João Ernesto de Carvalho e Ana Possenti,**

pela oportunidade do
conhecimento de "um pequeno" mundo animal,

Aos Profs. **Jaime A. Cury e Livia M. A. Tenuta,**

pela paciência em minhas limitações.

À minha família, **Jorge, Fernando e Felipe**

*pelo incentivo e compreensão em todos os
momentos.*

Agradeço Especialmente

Ao **Criador,**
pela Onipresença.

Agradecimentos

Ao Coordenador Responsável pela Área de Bioquímica do PPG - Odontologia, Prof. Dr. Jaime A. Cury.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos durante todo o período do curso de Doutorado.

Às secretárias Eliana, Elisa, Érica e Raquel, pela atenção em todas as fases administrativas.

A todos os docentes do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da FOP-UNICAMP, pelos importantes ensinamentos recebidos.

Aos professores Jaime A. Cury, Marcelo Rocha Marques, Glauce R. C. de Almeida, membros da Banca de Qualificação, como também os professores Fábio L. Mialhe, Lidiany K. A. Rodrigues, Ronaldo S. Wada e Viviane E. Gomes, membros da Banca de Defesa de Doutorado pelas importantes contribuições e sugestões para este trabalho.

A todos os queridos colegas do CPQBA pela colaboração e atenção.

Ao Prof. Ronaldo Seichi Wada, pela atenção e auxílio na análise estatística.

Ao amigo e “eterno filho” Fernando Neves Hugo pelo carinho e atenção.

À querida amiga Debora D. S. Harmitt pelas longas conversas a caminho de casa.

Aos meus colegas da Pós-Graduação: Luisa, Glauber, Glaubinho, Renzo, Rodrigo, Carol Aires, Marília Batista, Marília Correia, Renato, Karine, Lilian, Maria Paula, Camila, Regiane, Danilo, Stelinha, Juliana Fernandes, Cris, Karlinha, Ana Flávia, Sandro, Fabíola, Edna, Aline, Juliana Zanatta, Raquel, Luale, Cássia, Lu (Histo), Vivian (Micro), Willian (PPR) que na singularidade de cada um, possibilitou a troca e a comunhão em toda esta trajetória.

Aos queridos colegas da Histologia: Cidinha, Eliene e Gustavo pelo carinho e atenção.

Ao Prof. Dr. Sérgio R. P. Line pelos ensinamentos e oportunidade em usar laboratório.

Aos técnicos do Laboratório de Bioquímica da FOP: Alfredo e Waldomiro pela atenção.

À Luisa Helena Torres: encontro de uma nova e agradável amizade!

À Regiane Amaral, por sua amizade e contribuição para meu aprendizado de técnicas laboratoriais no laboratório de bioquímica da FOP.

Ao Prof. Jorge Valério, por me fazer refletir constantemente a respeito do valor de cada ser, cada momento... ”in ENGLISH”.

"Aos animais de pesquisa devemos não só nosso eterno reconhecimento e respeito, mas provavelmente nossa civilização, porque seu sacrifício garantiu a evolução da ciência e da humanidade. Suas vidas têm salvado nossas vidas. Sua dor tem aliviado nossas dores".

"Se toda coincidência
Tende a que se entenda
E toda lenda
Quer chegar aqui
A ciência não se aprende

Resumo

Dados da literatura têm sugerido que o uso da amoxicilina poderia estar associado com defeitos no esmalte, porém existem poucos estudos sobre esta possível relação. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da amoxicilina e do íon flúor na estrutura do esmalte dental em camundongos. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Estadual de Campinas (nº 1370-1/2007). Camundongos de linhagem isogênica C57BL/UNI foram distribuídos em 9 grupos (n= 9) recebendo os seguintes tratamentos: G1- control group (0 ppm F and 0 mg/Kg amoxicillin) ; G2- 0 ppm F and 25 mg/kg amoxicillin; G3- 0 ppm F and 75 mg/kg amoxicillin; G4- 50 ppm F and 0 mg/kg amoxicillin; G5- 100 ppm F and 0 mg/kg amoxicillin; G6- 25 mg/kg amoxicillin + 50 ppm F; G7- 25 mg/kg amoxicillin + 100 ppm F; G8- 75 mg/kg amoxicillin + 50 ppm F e G9 - 75 mg/kg amoxicillin + 100 ppm F. Após tratamento por um período de 60 dias, os camundongos tiveram seus dentes incisivos inferiores extraídos e analisados através de um microdurômetro (acoplado software FM-ARS) que mediu a variação da espessura do esmalte dental, e também usou-se um sistema de fluorescência quantitativa modificado (FQ) para avaliar possível mudança na estrutura do esmalte. Ambos os tratamentos (amoxicilina e fluoreto) quando usados separadamente, mostraram mudanças significantes no espessamento do esmalte dental (fluoreto diminuiu [p<0,0001] e amoxicilina aumentou

[$p=0,0005$] a espessura do esmalte dental). Não foi observada diferença estatisticamente significativa na espessura do esmalte quando a amoxicilina e o fluoreto foram administrados conjuntamente ($p=0,7718$). Em relação às mudanças na estrutura do esmalte verificadas pela fluorescência quantitativa (FQ), os resultados mostraram diferenças estatisticamente significantes na estrutura para todos os tratamentos, inclusive na associação destes ($p<0,0001$). Os resultados sugeriram que tanto a amoxicilina quanto o fluoreto influenciaram na espessura e possível mudança na sua estrutura, porém, outros estudos tais como análise histológica, dosagem de amoxicilina e fluoreto no plasma sanguíneo são necessários para melhor compreensão do efeito induzido dos tratamentos na estrutura do esmalte.

Palavras-chave: desenvolvimento esmalte dental; amoxicilina; espessura do esmalte; fluoreto; fluorescência quantitativa.

Abstract

Amoxicillin has been associated with dental enamel defects; however, few studies were found on this possible relationship. The aim of this study was to evaluate the effect of amoxicillin and fluoride on dental development enamel of mouse dental enamel. This study was approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation, State University of Campinas (# 1370-1/2007). Isogenic mice (C57BL/UNI) were assigned to 9 groups (n=9) receiving the following treatments: G1- control group (0 ppm F and 0 mg/Kg amoxicillin) ; G2- 0 ppm F and 25 mg/kg amoxicillin; G3- 0 ppm F and 75 mg/kg amoxicillin; G4- 50 ppm F and 0 mg/kg amoxicillin; G5- 100 ppm F and 0 mg/kg amoxicillin; G6- 25 mg/kg amoxicillin + 50 ppm F; G7- 25 mg/kg amoxicillin + 100 ppm F; G8- 75 mg/kg amoxicillin + 50 ppm F e G9 - 75 mg/kg amoxicillin + 100 ppm F. After 60 days of treatment, the animals had their lower incisors extracted and analyzed: 1- using a microdurometer (coupled software FM-ARS) to measure enamel thickness variation; 2- using a Modified Quantitative Light Fluorescence (QF) system to evaluate possible changes in dental enamel structure. SAS (Proc GLM) was used for multiple comparison tests considering all treatments (Tukey-Kramer). Amoxicillin and fluoride, when used separately, were found to produce significant changes in the enamel thickness, with fluoride decreasing ($p < 0.0001$) and amoxicillin ($p = 0.0005$) increasing enamel thickness. No significant difference toward enamel thickness was observed when fluoride was combined with amoxicillin ($p = 0.7718$). QF values revealed significant changes on enamel structure for all treatments ($p < 0.0001$).

The results suggested that as amoxicillin as fluoride could influence enamel thickness and possible change on the enamel structure, therefore, further studies like amoxicillin and fluoride plasma levels, histological analyzes are needed to better comprehension about the induced effect of treatments on the enamel structure.

Keywords: dental enamel development; amoxicillin; enamel thickness; fluoride; quantitative fluorescence.

Sumário

Introdução Geral.....	1
Proposição.....	7
Capítulo	8
Conclusão Geral.....	27
Referência Geral.....	28

Anexos

1- Aprovação Comitê de Ética em Pesquisa Animal.....	30
2- Comprovante de submissão do manuscrito.....	31

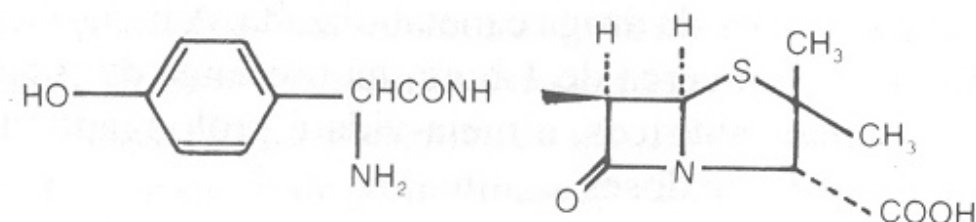
1 Introdução Geral e Revisão da Literatura

Dados da literatura ² mostram que a prevalência da fluorose dental está aumentando. Embora seja importante e necessário continuar a se investigar as várias exposições ao íon flúor, outros fatores que também poderiam estar ligados ao aumento da prevalência e severidade de alterações de esmalte que se assemelham clinicamente com a fluorose deveriam ser estudados. Estudos ^{8,9} têm sugerido que o uso da amoxicilina pode estar associado com defeitos de desenvolvimento do esmalte, particularmente as opacidades difusas. Estas ocorrem possivelmente devido a hipomineralização do esmalte, aparentando similaridade clínica à fluorose dental. Porém, apenas estudos observacionais são inadequados para determinar se a amoxicilina é causa dos defeitos observados no esmalte.

1.1 Mecanismo de ação da Amoxicilina

Desenvolvidos para interferir em uma fase da fisiologia celular que é própria do patógeno, os antibióticos se utilizam, essencialmente, de diferenças estruturais inerentes entre as células humanas, bacterianas, virais e fungicas e são classificados de acordo com o seu mecanismo de ação, estrutura química e espectro de ação contra organismos particulares¹⁸.

A amoxicilina é uma penicilina semi-sintética e pertence à classe das aminopenicilinas tendo a seguinte forma estrutural:



É ainda desconhecido se a amoxicilina tem algum efeito na estrutura do esmalte dental. Sua absorção pelo trato gastrointestinal atinge 75 a 90% da dose oral. Uma a 2 horas após a administração de uma dose de 500 mg, atinge-se concentrações séricas máximas, de 6 a 8 µg/ml. A amoxicilina se liga às proteínas plasmáticas na taxa de cerca de 20%. Distribui-se primariamente no líquido extracelular e atinge elevadas concentrações na bile e na urina. É eliminada rapidamente por secreção tubular renal. Cerca de 50 a 70% são excretados de forma inalterada pela urina. É metabolizada na taxa de 10%. As penicilinas, a exemplo de todos os antibióticos β-lactâmicos como a amoxicilina, inibem o crescimento das bactérias ao interferir numa etapa específica da síntese da parede celular bacteriana. A parede celular é composta de um complexo polímero de ligações cruzadas, o peptidoglicano (mureína, mucopeptídio), que consiste em polissacarídeos e polipeptídeos. O polissacarídeo contém aminoaçúcares alternados, *N*-acetilglicosamina e ácido *N*-acetilmurâmico. Existe um peptídio de cinco aminoácidos ligado ao açúcar de ácido *N*-acetilmurâmico que termina em D-

alanil-D-alanina. As proteínas de ligação da penicilina (PBP, *penicillin-binding proteins*) catalisam a reação de transpeptidase que remove a alanina terminal para formar uma ligação cruzada com um peptídeo adjacente, conferindo à parede celular a sua rigidez estrutural. Os antibióticos beta-lactâmicos inibem as transpeptidases de modo que as ligações cruzadas, responsáveis pela estrutura da parede celular, não se realizam ¹⁹.

1.2 Fluoretos e Defeitos no Esmalte

O íon flúor tem um papel importante na promoção da saúde bucal nos últimos 50 anos, entretanto sua ingestão durante o desenvolvimento do dente, particularmente no estágio de maturação do esmalte dentário, pode resultar na fluorose dentária¹, constituindo-se em um dos defeitos de desenvolvimento mais comum no esmalte. O efeito do fluoreto é altamente dose-dependente ¹², existindo uma clara relação linear entre dose de fluoreto e desenvolvimento da fluorose dentária ¹³.

Em relação à ingestão do fluoreto, este pode induzir mudanças no desenvolvimento do esmalte, referidas na literatura como fluorose de esmalte. Durante as últimas quatro décadas, muitos estudos experimentais e cultura de células têm investigado mecanismos pelos qual o fluoreto pode afetar a amelogenese¹² a qual pode ser dividida em pelo menos três fases: I - secreção, quando a maior parte das proteínas é secretada; II - transição, quando os

ameloblastos perdem a maioria de suas organelas secretórias, há um encurtamento e perda dos processos de Tomes, e ocorre uma invasão capilar dentro do órgão do esmalte; III - maturação, onde o esmalte perde água e material orgânico, que é substituído pelo crescimento dos cristais, tornando-se o tecido mais mineralizado do corpo¹⁴. Os ameloblastos, células que secretam a matriz do esmalte, são sensíveis a danos ocorridos ao ambiente de desenvolvimento, havendo ainda dúvidas se a reação dos mesmos a altas concentrações do íon flúor é específica ou diferente das reações a outras formas de danos ³. Na literatura existem relatos de fatores tais como a má nutrição e doenças infecciosas da infância também podem agir individualmente ou em conjunto na produção de defeitos como a fluorose dentária ^{4,5}.

1.3 Efeitos de outras drogas na estrutura do esmalte

Relatos da literatura mostram que várias drogas têm o potencial de induzir mudanças nos dentes ^{11,17} ocasionando descolorações (intrínsecas e extrínsecas), danos físicos à estrutura do dente (esmalte, dentina e cemento) e ainda alterações na sensibilidade do dente. A tetraciclina é um exemplo bem conhecido. Usada durante o segundo ou terceiro trimestre da gravidez ou durante o período inicial da infância, pode resultar em uma descoloração clinicamente visível do dente. O esmalte dentário onde a tetraciclina foi incorporada pode mudar de sua coloração natural para uma cor amarelada brilhante com manchas acinzentadas ou marrons com o transcorrer do tempo.

Durante as últimas décadas, muitos antibióticos, incluindo a amoxicilina, tem sido prescritos para o tratamento de infecções infantis ^{6,7}. Porém, muito pouco é conhecido, se existe ou não, relação entre outras classes de antibióticos e o desenvolvimento dentário.

Hong *et al* ⁹ em um estudo de coorte (Iowa Fluoride Study) avaliou a associação entre fluorose dental e o uso de amoxicilina durante a infância. Os autores usaram um questionário aplicado a cada 3-4 meses aos responsáveis das crianças participantes (do nascimento até completarem 32 meses) contendo informações sobre a ingestão de flúor e uso da amoxicilina. Os resultados mostraram que a amoxicilina usada durante a infância parece estar ligada à opacidade difusa tanto de primeiros molares permanentes quanto de incisivos centrais permanentes.

Laisi *et al.* ¹⁰ avaliaram se o uso de amoxicilina, penicilina V, cefalosporinas, macrolídeos, sulfonamidas e trimetoprim estavam associados aos defeitos chamados de “Molar Incisor Hypomineralization” (MIH) e se a amoxicilina poderia causar distúrbios de desenvolvimento em células de molares de camundongos em cultura. Células de germes dentais foram cultivadas por 10 dias com e sem amoxicilina. Aquelas tratadas com amoxicilina mostraram um aumento na espessura do esmalte dental, porém não na dentina. Os autores concluíram que um padrão alterado de amelogênese pode ter interferido na mineralização e que o uso da amoxicilina na infância está incluído entre os fatores causais da MIH.

O dente incisivo de animais roedores é o único modelo para estudo de processos patológicos dentais por causa do seu crescimento contínuo, sendo que

os tecidos odontogênicos permanecem funcionais durante toda a vida do animal¹⁵. Por causa desta propriedade peculiar, estes dentes são um indicador biológico valioso, pois espelham e registram toda a condição metabólica do animal durante o seu desenvolvimento¹⁶.

Assim, conduzir um estudo que possibilite verificar possíveis mudanças induzidas por administração de amoxicilina e de fluoreto ocorridas no esmalte dental de camundongos é importante na avaliação de outros fatores de risco para alterações dentárias além dos já conhecidos na literatura.

2 Proposição

O presente estudo é apresentado no formato alternativo de tese conforme deliberação 002/06 da Comissão Central de Pós-Graduação (CCPG) da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. O manuscrito intitulado “The effect of amoxicillin and fluoride on the development of mouse dental enamel” foi submetido ao periódico Archives of Oral Biology e teve como objetivos:

- 1- Verificar se a amoxicilina e o fluoreto em diferentes concentrações utilizadas de forma isolada, ou em associação, apresentam influência na espessura do esmalte em dente de camundongo em desenvolvimento.
- 2- Verificar se a amoxicilina e o fluoreto em diferentes concentrações utilizadas de forma isolada, ou em associação, apresentam influência na estrutura do esmalte em dente de camundongo em desenvolvimento.

Capítulo 1

The effect of amoxicillin and fluoride on the development of mouse dental enamel*

Hoffmann RHS, Carvalho JE, Levy SM, Ernst EJ, Everett ET, Sousa MLR **

****Corresponding author:**

Maria da Luz Rosário de Sousa

Av. Limeira, 901

13414-903, Piracicaba, SP

Brazil

Phone: #55-19-2106-5364

E-mail: luzsousa@fop.unicamp.br

*Based on a thesis submitted by the first author to the Faculty of Dentistry of Piracicaba, UNICAMP, SP, Brazil, as a partial fulfillment of the requirements of Doctoral Program in Dentistry (Cariology Area).

Abstract

Concerns have been raised about amoxicillin use during enamel formation contributes to increases in the prevalence and/or severity of fluorosis or directly in enamel defects resembling enamel fluorosis. The aim of this study was to evaluate the effect of amoxicillin and fluoride on the development of mouse dental enamel. Male C57BL/UNI mice were assigned to 9 groups (n=9) receiving the following treatments: G1- control group (0 ppm F and 0 mg/Kg amoxicillin) ; G2- 0 ppm F and 25 mg/kg amoxicillin; G3- 0 ppm F and 75 mg/kg amoxicillin; G4- 50 ppm F and 0 mg/kg amoxicillin; G5- 100 ppm F and 0 mg/kg amoxicillin; G6- 25 mg/kg amoxicillin + 50 ppm F; G7- 25 mg/kg amoxicillin + 100 ppm F; G8- 75 mg/kg amoxicillin + 50 ppm F e G9 - 75 mg/kg amoxicillin + 100 ppm F. After 60 days of treatment, the animals had their lower incisors extracted and analyzed: 1- using a microdurometer (coupled software FM-ARS) to measure enamel thickness variation; 2- using Quantitative Fluorescence (QF) system to evaluate possible changes in dental enamel structure. SAS (Proc GLM) was used for multiple comparison tests considering all treatments (Tukey-Kramer). Amoxicillin and fluoride, when used separately, were found to produce significant changes in the enamel thickness, with fluoride decreasing ($p < 0.0001$) and amoxicillin ($p = 0.0005$) increasing enamel thickness. No significant differences in enamel thickness were observed when fluoride was combined with amoxicillin ($p = 0.77$). QF values revealed significant changes on the enamel structure for both treatments and a significant interaction ($p < 0.0001$). The results suggested that both amoxicillin and

fluoride could influence enamel thickness and/or possible changes in the enamel structure. Therefore, studies concerning amoxicillin and fluoride plasma levels, as well as histological analyses are needed to better understand the effect of these treatments on enamel structure.

Keywords: dental enamel development; amoxicillin; enamel thickness; fluoride; quantitative fluorescence.

Introduction

Enamel is formed by ameloblasts, which are derived from the inner enamel epithelium of the developing tooth bud. Differentiation of the ameloblasts from undifferentiated epithelial cells is controlled by various growth factors and interactions between the developing epithelium and mesenchyme ¹. As ameloblasts differentiate, they express enamel matrix proteins ². These proteins undergo self-assembly to form an enamel extracellular organic matrix that controls the initiation, rate of growth, and organization of the hydroxyapatite crystals or other octacalcium phosphate precursors ³. Subsequently, these inorganic crystallites are originally seeded and elongated in the initial matrix ⁴. As older matrix is degraded and reabsorbed, the crystals grow in width and thickness and almost entirely replace the organic phase during maturation ⁵.

Despite the highly successful use of fluoride in preventing dental caries, its mechanism of action on dental enamel development is not totally understood. Epidemiological research has emphasized that dental fluorosis caused by fluoride intake during tooth development as a global public health problem, but there are groups of knowledge about other factors that could cause diffuse opacities of dental enamel.

Experimental studies show that fluoride affects ameloblasts and enamel formation differently at different stages of the life cycle, resulting in different types of enamel defects ⁹. Several substances that can be used during tooth development are known to affect dental enamel structure ⁶. These include

anticancer drugs, such as cyclophosphamide, and some antibiotics such as tetracyclines that can result in clinically evident tooth discoloration ¹⁶. Amoxicillin is one of the most common β -lactam antibiotics used among pediatric patients, mainly for the treatment of otitis media ^{15, 17}.

Ingested fluoride is the only well-documented etiologic factor for enamel fluorosis ²⁰, but some recent studies have suggested that amoxicillin use might be a contributing factor to enamel defects, particularly diffuse opacities. These diffuse opacities, possibly due to enamel hypomineralization, appear clinically similar to dental fluorosis ¹⁸. Hong *et al* ¹⁹ assessed the association between dental fluorosis and amoxicillin during early childhood and the results suggested a link between amoxicillin use and fluorosis-like enamel defects, but the findings were not conclusive because of the substantial limitations of the study.

Thus, the aim of this study was to explore whether amoxicillin used in different dosages associated or not with fluoride might both influence enamel thickness and structure in mice.

Materials & Methods

Experimental Design

This study was approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation, State University of Campinas (1370-1/2007). Eighty-one inbred male mice

(CB57BL/UNI), aged three weeks, weighing 18-21 g were obtained from CEMIB/UNICAMP (Multidisciplinary Center for Biological Investigation) were used. The animals were kept in plastic boxes and received the same feed (Nutrilab) and deionized water. The temperature in the climate-controlled room, which had a 12-hour light/dark cycle, was $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Animal Treatment

Animals were randomly divided into eight experimental groups and one control: (G1- control group; G2- 25 mg/kg amoxicillin; G3- 75 mg/kg amoxicillin; G4- 50 ppm F; G5- 100 ppm F; G6- 25 mg/kg amoxicillin + 50 ppm F; G7- 25 mg/kg amoxicillin + 100 ppm F; G8- 75 mg/kg amoxicillin + 50 ppm F and G9 - 75 mg/kg amoxicillin + 100 ppm F. Amoxicillin (Medley Lab) was appropriately diluted in deionized water and administered (oral gavage) daily each morning. Experimental groups (G4 to G9) received water *ad libitum* containing fluoride (NaF) while G1, G2 and G3 received only deionized water. All animals were killed 60 days after treatment and the lower incisor of each animal was then extracted.

Sample Collection for Enamel Thickness

The right lower incisors (n=81) were kept in a 10% buffered formalin solution, pH 7, for 10 days⁸. A diamond disc was then used to obtain a 3-mm-long slab from the middle portion of each tooth. The slabs were then embedded in acrylic resin and

polished using Al₂O₃ sandpaper (# 400, 600, and 1200) and polishing cloths with 1 µm diamond paste. Readings of maximal enamel thickness perpendicular to the DEJ (dentin-enamel junction) were measured (millimeters) using 10x magnification in a microhardness tester (Future-Tech Corp., Tokyo, Japan) coupled to software FM-ARS 900.

Quantitative Fluorescence

A quantitative fluorescence (QF) system, which is a modified QLF (Quantitative Light Fluorescence) system, was used to measure fluorescence for evaluating possible changes in dental enamel^{21, 22, 23}. In this study a Nikon epifluorescence microscope equipped with a Chroma Gold 11006v2 set cube (exciter D360/40x, dichroic 400DCLP, and emitter E515LPv2) was used. The lower left incisors of each animal were removed, rinsed briefly in 10% formalin, and allowed to remain slightly moistened. Teeth were viewed labial side up and flat on a black background at 40X magnification. Twelve mega-pixel Tiff images were acquired under standardized exposure conditions. The bright areas on images reflected increased fluorescence. Each image was analyzed using Image J software version 1.33u (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). The amount of fluorescence was converted to grayscale values (0-256). Briefly, one researcher (ETE) measured ten 100 x 100 pixel areas randomly positioned over the incisor and the mean grayscale values for each square determined. The average grayscale values for all 10 regions were then determined. Larger grayscale values correlate with greater dental enamel

changes. The samples were coded therefore the researcher (ETE) unknown the treatment groups.

Fluoride Analysis

Remaining apical and incisal parts of each lower right incisor were ground separately in a porcelain crucible. The powder was dried for 24 hours at 60 ° C. The powder was dissolved with 2.0 mL of 0.5 M HCl. Then 2.0 mL of TISAB II (0.5 M) containing 20 g NaOH / L was used to neutralize the acid. After the acid neutralization, the tubes were centrifuged for 3 min to determine the fluoride concentration using a fluoride ion electrode (94-06) and a reference electrode (Ref Flex - WPI) both coupled to a potentiometer (Orion EA-940), previously calibrated with standard levels of fluoride and the same concentration of HCl and NaOH. The results were expressed in mg F / g (dry weight).

Statistical Analysis

Data underwent square root transformation to analysis of variance (ANOVA) using the procedure GLM (General Linear Models) for a 3x3 factorial design (three different concentrations of fluoride and three different concentrations of amoxicillin). The significance level was set at 5%. SAS for Windows™ Version 8.01 (SAS Institute Inc., Cary, NC) was used.

Statistical analysis showed significant differences between each pair of groups by fluoride concentrations (0 x 50 ppm [$p < 0.0001$], 0 x 100 ppm [$p < 0.001$], and 50 x 100 ppm [$p = 0.0003$]).

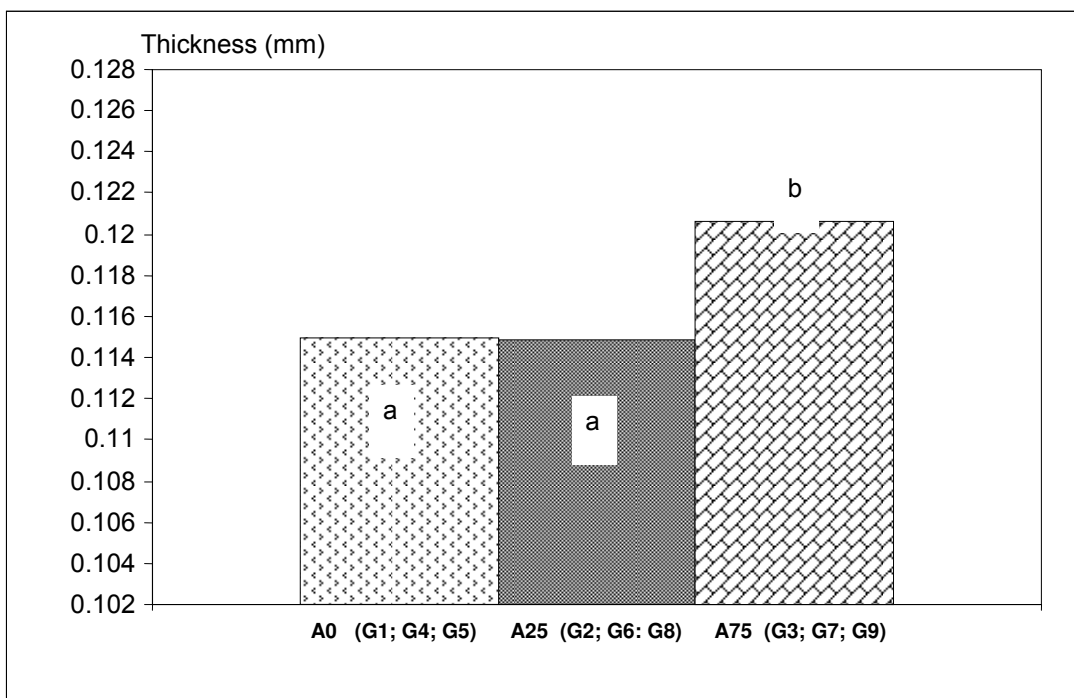


Figure 1- Enamel thickness of mouse teeth according to the different amoxicillin concentrations. Different letters (“a” and “b”) represent significant differences ($p < 0.05$).

Figure 3 presents in the absence of fluoride, the effect of amoxicillin concentrations compared (25 vs. 75 mg / kg) showed no statistically significant difference, although both concentrations differed from the control group ($p < 0.0001$) suggesting a possible change on the enamel structure (higher fluorescence due to treatments - higher values in grayscale).

When the fluoride concentration was 50 ppm, the effect of amoxicillin concentration (25 and 75 mg / kg) showed statistically significant difference ($p = 0.0105$). However, the effect of amoxicillin concentrations was not statistically significant from control. The amoxicillin concentration of 25 mg / kg increased the enamel fluorescence; while the concentration of 75 mg / kg decreased the fluorescence when combined with fluoride at 50 ppm.

No statistically significant difference was found when the concentration of 25 mg / kg amoxicillin was compared to the control group ($p = 0.99$) nor the concentration of amoxicillin 75 mg / kg ($p = 0.0789$) in the presence of fluoride concentration of 100 ppm. However, the concentration of amoxicillin 75 mg / kg showed a significant difference when compared to the control group ($p = 0.0045$) with fluoride at 100 ppm. These results are better visualized in Figure 3.

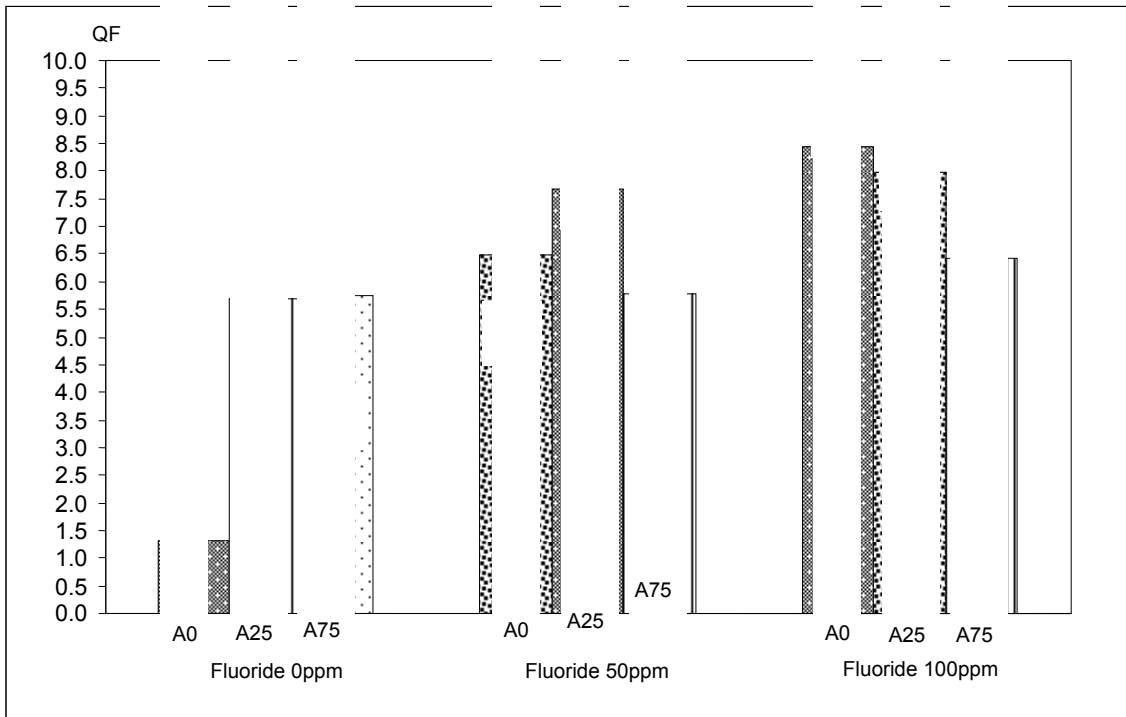


Figure 3- Means values “Grayscale” (QF) in mice teeth according to amoxicillin and fluoride treatments.

Different letters (“a”and “b”) represent significant differences ($p < 0.05$).

a

Discussion

The results of this study showed that exposure to fluoride concentrations of 50 and 100 ppm decreased the enamel thickness agreeing to Zhou *et al.*¹² study that found a thickness reduction in enamel of about 10% with chronic exposure to fluoride in drinking water or repeated injections of moderate fluoride doses. The reduction in enamel thickness is possibly attributed to a limited disruption of vesicular transport in fluorotic secretory ameloblasts and subsequent intracellular

degradation of a minor portion of the matrix by the lysosomal system^{13, 14}. The damage to early-secretory ameloblasts was correlated with the amount of mineral deposited in the aprismatic enamel and inversely with the thickness of the enamel present before fluoride was given. The thinner the layer of enamel, the more intensely it hypermineralized, and the more severely the adjacent ameloblasts are affected^{10, 11}.

When amoxicillin was administered in the absence of fluoride, the results of this study showed an increase in the enamel thickness. Laisi *et al.*⁷ found that exposure of cultured mouse embryonic tooth explants to amoxicillin enhanced enamel formation. After 10 days in culture, they found that enamel was present on all molars exposed to amoxicillin at a high concentration (4 mg/mL), but was present in just over one-third of the controls. In addition, where enamel was present in either controls or in molars exposed to just 100 µg/mL amoxicillin, it was thinner than enamel present on molars treated with concentrations of amoxicillin ≥ 1 mg/mL. The possible explanation suggested by Laisi *et al.*⁷ was that amoxicillin induces earlier enamel formation and/or accelerates the accretion rate of the established enamel.

This study explored the possible relationship between dental fluorosis and amoxicillin in mice, using the QLF to assess hypomineralization if present. According to the present QLF results, different fluoride concentrations showed positive dose response effect (higher fluoride concentration, higher fluorescence). QLF analysis is able to indicate the severity of dental fluorosis (increased porosity in dental structure). As amoxicillin concentrations also showed significant results in

relation to fluorescence (compared to control group), we can suggest that amoxicillin may have effect on the enamel structure through the fluorescence proposed by QLF. The results also showed interaction of treatments; however this interaction is dependent on the amoxicillin and fluoride concentrations.

It has been suggested ^{18, 19} that amoxicillin use may be associated with developmental enamel defects, particularly diffuse opacities. These diffuse opacities, possibly due to enamel hypomineralization, appear clinically similar to dental fluorosis. Hong *et al.* ¹⁹ in a cohort study (Iowa Fluoride Study) evaluated the association between dental fluorosis and amoxicillin use during infancy. The authors followed the subjects from birth to 32 months and used questionnaires collecting information on fluoride intake and amoxicillin use. The results showed that amoxicillin use during infancy appears to be linked to dental fluorosis on both permanent first molars and central incisors.

Laisi *et al.* ⁷ studied whether the use of amoxicillin and other antibiotics were associated with molar incisor hypomineralization (MIH) in children and whether amoxicillin could disturb mouse embryonic molar tooth development in culture. Their results showed that MIH was more common among children who had taken amoxicillin (OR=2.06; 95% CI, 1.01-4.17). Regarding the mouse embryonic molar tooth development, after 10 days in culture, enamel was present on all molars exposed to amoxicillin (4mg/mL), but was present in only just over one-third of the controls. These authors suggested that amoxicillin could interfere with ameloblast function and either advances the initiation of amelogenesis and/or accelerates the enamel accretion rate.

The results suggested that both amoxicillin and fluoride could influence enamel thickness and/or possible changes in the enamel structure. Therefore, studies concerning amoxicillin and fluoride plasma levels, as well as histological analyses are needed to better understand the effect of these treatments on enamel structure.

Acknowledgements

The authors thank the excellent assistance of Profs. Jaime A. Cury, Livia A. Tenuta, Department of Biochemistry/FOP-UNICAMP e Ana Possenti, CPQBA/UNICAMP during the development of this research. The authors state that there is no possible conflict of interest such as patent, ownership, stock ownership, consultancies or speaker's fee.

Funding: This study was supported by the (Brazilian) National Research Council (CNPq).

Competing interests: We state that none of the authors have any conflict of interests.

Ethical approval: Ethics Committee for Animal Experimentation, State University of Campinas (1370-1/2007).

References

- 1- Aberg T, Wang XP, Kim JH, Yamashiro T, Bei M, Rice R, Ryoo HM, Thesleff I. Runx2 mediates FGF signaling from epithelium to mesenchyme during tooth morphogenesis. *Dev Biol* 2004; 270: 76-93.
- 2- Couwenhoven RI, Snead ML. Early determination and permissive expression of amelogenin transcription during mouse mandibular first molar development. *Dev Biol* 1994; 164: 290-299.
- 3- Bartlett JD, Ganss B, Goldberg M, Moradian-Oldak J, Paine ML, Snead ML, Wen X, White SN, Zhou YL. Protein-protein interactions of the developing enamel matrix. *Curr Top Dev Biol* 2006; 74:57-115.
- 4- Robinson CBH, Atkinson PJ, Weatherell JA. Matrix and mineral changes in developing enamel. *J Dent Res* 1979; 58: 871-882.
- 5- Fong H, White SN, Paine ML, Luo W, Snead ML, Sarikaya M. Enamel structure properties controlled by engineered proteins in transgenic mice. *J Bone Miner Res* 2003; 18:2052-2059.
- 6- Billings RJ, Berkowitz RJ, Watson G. Teeth. *Pediatrics* 2004;113(4 Suppl):1120-1127.
- 7- Laisi, S; Ess, A; Sahlberg, C; Arvio P; Lukinmaa, P-L; Alaluusua, A. amoxicillin may cause molar incisor Hypomineralization. *J Dent Res* 2009; 132-136.
- 8- Dominici JT, Eleazer PD, Clark SJ, Staat RH, Scheetz JP. Disinfection/sterilization of extracted teeth for dental student use. *J Dent Edu* 2001; 65:1278-1280.
- 9- Bronkers ALJJ; Lyaruu DM; DenBesten PK. The impact of fluoride on ameloblasts and the mechanisms of enamel fluorosis. *J Dent Res* 2009; 88:877-893.
- 10-Bronkers AL; Bervoets TJ; Wöltgens JH; Lyaruu DM. Effect of calcium, given before or after a fluoride insult, on hamster secretory amelogenesis in vitro. *Eur J Oral Sci* 2006; 114(Suppl1):116-122.
- 11-Lyaruu DM; Bervoets TJ; Bronkers AL. Short exposure to high levels of fluoride induces stage-dependent structural changes in ameloblasts and enamel mineralization. *Eur J Oral Sci* 2006; 114 (Suppl 1):111-115.
- 12-Zhou R; Zaki AE, Eisenmann DR. Morphometry and autoradiography of altered rat enamel protein processing due to chronic exposure to fluoride. *Arch Oral Biol* 1996; 41:739-747.
- 13-Bronkers AL; Lyaruu DM; Bervoets TJ; Wöltgens JH. Fluoride enhances intracellular degradation of amelogenins during secretory phase of amelogenesis of hamster teeth in organ culture. *Connect Tissue Res* 2002; 43:456-465.
- 14-Matsuo S; Inai T; Kurisu K; Kiyomiya K, Kurebe; M. Influence of fluoride on secretory pathway of the secretory ameloblast in rat incisor tooth germs exposed to sodium fluoride. *Arch Toxicol* 1996;70:420-429.
- 15-McCaig, LF; Hghes, JM. Trends in antimicrobial drug prescribing among office based physicians in the United States. *JAMA*. 1995; 273:214-219.

- 16-Simpson, MP. Effects of demineralizing tetracycline- stained human dentine. *Calcif Tissue Int.* 1981; 33:101-104.
- 17-Bergus, GR; Levy, SM; Kirchner, HL; Warren, JJ; Levy, BT. A prospective study of antibiotic use and associated infections in young children. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2001; 15:61-67.
- 18- Hong L; Levy SM; Warren JJ; Bergus GR; Dawson DV; Wefel JS; Broffitt B. Primary tooth fluorosis and amoxicillin use during infancy. *J Public Health Dent.* 2004;64:38-44.
- 19-Hong, L; Levy, SM; Warren, JJ; Dawson, DV, Bergus, MD; Wefel, JS. Association of amoxicillin use during early childhood with developmental tooth enamel defects. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2005; 159: 943-948.
- 20- Beltrán_Aguilar ED; Gruffin SO; Lockwood SA. Prevalence and trends in enamel fluorosis in the United States from the 1930s to the 1980s. *J Am Dent Assoc.* 2002; 133:157-165.

Conclusão Geral

Os resultados deste estudo sugerem que tanto a amoxicilina quanto o fluoreto influenciam o desenvolvimento do esmalte dental em camundongos, porém outros estudos são necessários para avaliar mecanismo de ação, dosagem, metabolismo, etc. para melhor compreensão dos efeitos dessas drogas no desenvolvimento do esmalte dental.

Referências (Geral)

- 1 - Whelton HP, Ketley CE, Mc Sweeney F, O'Mullane DM. A review of fluorosis in the European Union: prevalence, risk factors and aesthetic issues. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2004;32 (Suppl. 1):9-18.
- 2 - Rozier RG. The prevalence and severity of enamel fluorosis in North American children. *J Public Health Dent.* 1999;59:239-246.
- 3 – DenBesten PK, Glambro N. Dental fluorosis. In: Robinson C, Kirkham J, Shore R, eds. *Dental enamel formation to destruction: 245-64.* Boca Raton, FL: CRC Press Inc, 1995.
- 4– Li Y, Navia JM, Bian JY. Prevalence and distribution of developmental enamel defects in primary dentition of Chinese children 3-5 years old. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1995;23: 72-79.
- 5 – Chen YX, Lin MQ, Xiao YD, Gan WM, Min D, Chen C. Nutrition survey in dental fluorosis – affected areas. *Fluoride.* 1997;30:77-80.
- 6 – Sabella C, Goldfarb J. Penicillin-resistant pneumococcal infections. *Clin Pediatr.* 1999;38: 609-610.
- 7 – McCaig LF, Hughes JM. Trends in antimicrobial drug prescribing among Office-based physicians in the United States. *JAMA.* 1995;273:214-219.
- 8 – Hong L, Levy SM, Warren JJ, Bergus GR, Dawson DV, Wefel JS, Broffitt B. Primary tooth fluorosis and amoxicillin use during infancy. *J Public Health Dent.* 2004;64(1):38-44.
- 9 - Hong L, Levy SM, Warren JJ, Dawson DV, Bergus MD, Wefel JS. Association of amoxicillin use during early childhood with developmental tooth enamel defects. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2005;159:943-948.
- 10 - Laisi S, Ess A, Sahlberg C, Arvio P, Lukinmaa P-L, Alaluusua A. Amoxicillin may cause molar incisor hypomineralization. *J Dent Res.* 2009(2):132-136.
- 11- Billings RJ, Berkowitz RJ, Watson G. Teeth. *Pediatrics.* 2004;113(4 Suppl):1120-1127.
- 12- Bronkers ALJJ, Lyaruu DM, DenBesten PK. The impact of fluoride on ameloblast and the mechanisms of enamel fluorosis. *J Dent Res* 2009;88:877-893.
- 13- Warren JJ, Levy SM, Broffitt B, Cavanaugh JE, Kanellis MJ, Weber-Gasparone K. Considerations on optimal fluoride intake using dental fluorosis and dental caries outcomes – a longitudinal study. *J Public Health Dent.* 2009; 69:111-115.
- 14- Porto IM, Merzel J, Sousa FB *et al.* Enamel mineralization in the absence of maturation stage ameloblasts. *Arch Oral Biol* 2009;54:313-321.

- 15- Kuijpers MHM, van de Kooij AJ, Slootweg PJ. The rat incisor in toxicologic pathology. *Toxicol Pathol* 1996;34:346-360.
- 16- Schour I; Massler M. The teeth. 1963. Pp104-165. *In: The rat in laboratory investigations* (Farris EJ, Griffith JQ eds.) JB Lippincott Co.
- 17- Abe T, Miyajima H, Okada K. Effects of a macrolide antibiotics on enamel formation in rat incisors-primary lesion of ameloblast at the transition stage. *J Vet Med Sci* 2003;65(9):985-988.
- 18- Atlas de Farmacologia de Netter – Raffa RB, Rawls SM, Beyzarov EP. Cap.1- pp. 297-298. Ed. Artmed – 2006 – 1 ed.
- 19- Farmacologia – Penildo Silva. pp. 1025-1026. Guanabara Koogan - 2002 - 6^a ed.

Anexo 1- Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1370-1, sobre "O efeito da amoxicilina no desenvolvimento de defeitos de esmalte dental" sob a responsabilidade de Profa. Dra. Maria da Luz Rosário de Sousa Rosana / Helena Schlittler Hoffmann está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em 19 de dezembro de 2007.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1370-1, entitled "The effect of the amoxicilin on the development of the tooth enamel defects", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on December 19, 2007.

Campinas, 19 de dezembro de 2007.

Profa. Dra. Liana Verinaud
Respondendo pela presidência

Fátima Ajonso
Secretária Executiva

CEEA/Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
Telefax: (19) 3521-6356
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

Assunto: A manuscript number has been assigned AOB-D-10-00080

De: "Archives of Oral Biology" <AOB@elsevier.com>

Data: Qui, Fevereiro 18, 2010 7:12 am

Para: rosana@fop.unicamp.br

Prioridade: Normal

Opções: [Ver cabeçalho completo](#) | [Ver Versão para Impressão](#) | [Baixar como um arquivo](#)

Archives of Oral Biology

Ref: AOB-D-10-00080

Title: The effect of amoxicillin and fluoride on the development of mouse dental enamel

Authors: Rosana Helena Schlittler Hoffmann, Doctoral Student; João E Carvalho,

Professor Titular; Steven M Levy, Wright-Bush-Shreves Professor of Research; Erika J

Ernst, Associate Professor; Eric T Everett, Associated Professor; Maria da Luz R

Sousa, Titular Professor

Article Type: Original Paper

Dear Rosana,

Your submission entitled "The effect of amoxicillin and fluoride on the development

of mouse dental enamel" has been assigned the following manuscript number:

AOB-D-10-00080.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial

System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/aob/>.

Thank you for submitting your work to this journal. Please do not hesitate to

contact me if you have any queries.

Kind regards,

Rosie Pyne

Journal Manager

Archives of Oral Biology

For any technical queries about using EES, please contact Elsevier

Author Support at

authorsupport@elsevier.com