

Alteración de la Mineralización de Tejidos Dentarios y Paradentarios Inducida por Bisfosfonatos en Ratas Wistar

Alteration of Mineralization of Dental and Paradental Tissues Induced by Bisphosphonates in Wistar Rats

Recibido: 04/08/2023

Aceptado: 03/10/2023

Rodríguez J¹, Gualdoni GS¹, Sosa De Lucca M², Biagini S¹, Angulo Pescorán FJP¹, Rodríguez T¹, Patitucci WE¹, Reboledo GL¹, De Lucca RC¹

1 Universidad de Buenos Aires. Facultad de Odontología. Cátedra de Histología y Embriología. Buenos Aires, Argentina.

2 Universidad de Buenos Aires. Facultad de Odontología. Cátedra de Bioquímica General y Bucal. Buenos Aires, Argentina.

RESUMEN

Desórdenes sistémicos de la homeostasis mineral o fallas en la mineralización de la matriz extracelular pueden afectar tanto a las piezas dentarias como a su aparato de sostén, conduciendo al fracaso de los tratamientos odontológicos. Existe poca evidencia científica sobre modelos animales que permitan estudiar la respuesta de tejidos dentarios/paradentarios frente a este tipo de desórdenes. El objetivo del presente trabajo fue estudiar experimentalmente alteraciones de la biomineralización inducidas por bisfosfonatos en ratas Wistar. Para ello, 20 ratas Wistar hembras y machos (35 ± 10 g) fueron tratados con 20 mg/kg de etidronato bisódico (EHBP) o solución fisiológica (control) vía intraperitoneal 5 veces por semana durante 3 semanas. Luego de la eutanasia, se extrajeron las mandíbulas para su procesamiento y análisis histológico (H&E). Mediante microfotografías digitales se evaluó: área ósea/área total, espesor de ligamento periodontal, áreas de dentina y de cemento. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante el test T de Student para comparaciones entre grupos y el test ANOVA de 2 vías para las comparaciones intersexo. Los grupos EHBP presentaron mayor proporción de osteoide, dentina y cemento no mineralizados respecto a los controles, siendo más marcadas las diferencias en las hembras. Las hembras del grupo EHBP mostraron una disminución significativa en el espesor del ligamento periodontal respecto de los controles, aunque esta tendencia no se observó en machos. Los resultados del presente estudio demuestran que el EHBP, en la dosis y tiempo estudiados, altera los procesos de biomineralización tanto del tejido óseo como de los tejidos dentarios.

Palabras clave: biomineralización, bisfosfonato, tejidos dentarios, tejido óseo interradicular.

ABSTRACT

Systemic disorders of mineral homeostasis or alterations in the mineralization of the extracellular matrix can affect both dental and supportive tissues, leading to the failure of dental treatments. There is

a lack of scientific information about animal models that allow to study the response of dental/paradental tissues in this type of disorders. The aim of the present work was to study the biomineralization alterations induced by bisphosphonates in Wistar rats and to study the response of dental and paradental tissues. Twenty Wistar rats (35±10 g) were divided in control (females, males) and EHBP (females, males) groups. The EHBP group received 20 mg/kg of ethidronate bisodium intraperitoneally 5 times a week for 3 weeks, while the control group received saline solution. After euthanasia, mandibles were resected and processed histologically to obtain oriented sections for H&E staining. Photomicrographs were used to evaluate: Bone area/total area, periodontal ligament thickness, dentin and cement area. Results were statistically analyzed using the Student's T test for comparisons between groups and the 2-way ANOVA test for male and female comparisons. The EHBP groups showed a higher amount of non-mineralized osteoid, dentin and cement compared to control groups, being more evident in females. Females in the EHBP group showed a significant decrease in periodontal ligament thickness compared to controls, although this profile was not observed in males. The results of the present study demonstrate that EHBP, at the dose and time studied, alters the biomineralization processes of both bone and dental tissues.

Keywords: Biomineralization, bisphosphonate, dental tissues, interradicular bone tissue.

INTRODUCCIÓN

Las piezas dentarias y su aparato de sostén están constituidas tanto por tejidos blandos (pulpa, ligamento periodontal) como por tejidos duros (esmalte, dentina, cemento, hueso alveolar). La dentina, el cemento y el hueso son tejidos conectivos mineralizados formados por una matriz extracelular y células características propias de cada uno de ellos. La matriz extracelular está formada por una parte orgánica, constituida principalmente por fibras de colágeno tipo I y en menor medida por proteínas no colagenosas, y otra inorgánica, constituida por cristales de hidroxapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$. El porcentaje de mineralización de estos tejidos varía desde un 45% en cemento hasta un 70% en dentina y hueso (Abou Neel et al., 2016).

El proceso de biomineralización de los tejidos duros ocurre durante toda la vida. En este proceso, las fibras de colágeno forman un andamiaje sobre el cual se depositan los cristales de fosfato de calcio ordenadamente, esto ocurre de manera similar en todos los tejidos mineralizados confiriéndoles las propiedades mecánicas requeridas para su función (Cianferotti, 2022). Un desequilibrio en dicho proceso puede afectar la calidad, el desarrollo y el normal funcionamiento de las piezas dentarias y de su aparato de sostén. Tanto los procesos fisiológicos como las terapéuticas odontológicas podrían verse condicionadas por los defectos en la biomineralización.

Dentro de los defectos más estudiados en la biomineralización se encuentran la hiperosteoidosis (acumulación de matriz orgánica no mineralizada en tejido óseo) y la hipomineralización (déficit de mineralización de los tejidos duros) (Matsushima et al., 2003). Estas patologías pueden surgir como consecuencia del déficit de vitamina D, hipofosforemia o pueden ser generadas por fármacos como bisfosfonatos (Rico Lenza, 2002).

Los bisfosfonatos son productos sintéticos análogos al pirofosfato que se depositan directamente en la superficie externa del hueso, por lo que disminuye la capacidad de unión del osteoclasto en un 30-40%, reduce la acumulación de protones y la síntesis de proteínas en estas células, actuando como potentes inhibidores metabólicos. Estudios demostraron que los bisfosfonatos retardan la resorción ósea y por lo tanto son utilizados en el tratamiento de patologías óseas (Ponte Fernández et al., 2006).

Particularmente, el etidronato es un bisfosfonato de primera generación que ha sido utilizado durante algunos años en el tratamiento de osteogénesis imperfecta, enfermedad de Paget, etc. Sin embargo, se ha descubierto que este tipo de bisfosfonatos inhiben la mineralización de la matriz ósea e interfieren en los procesos de cicatrización de fracturas ya que tienen la capacidad de unirse al calcio e inhibir la formación de cristales y su disolución (Watts y et al., 2020). Se ha observado, además, que altas dosis de etidronato o su utilización en tratamientos prolongados generan osteomalacia, una patología ósea caracterizada, entre otras cosas, por producir hiperosteoidosis. (Hatano et al., 2021; Thomas et al., 1995; Boyce et al., 1984).

Si bien la hiperosteoidosis está ampliamente estudiada en huesos largos, es escasa la literatura que reporta el impacto de esta patología en maxilares y piezas dentarias. (Fouda et al., 1991; Van Den Bos y Beerttsen, 1987). Es por ello, que el objetivo del presente trabajo fue estudiar experimentalmente las alteraciones de la biomineralización inducidas por bisfosfonatos en ratas Wistar.

MATERIALES Y MÉTODOS

ANIMALES

Se utilizaron 20 Ratas Wistar machos (n=8) y hembras (n=12) de 21 días de edad y 30±5 g de peso corporal. Las condiciones de hábitat incluyeron jaulas de alambre galvanizado, con un máximo de 4 animales por jaula a una temperatura de 21-24 °C, una humedad de 52-54% y un fotoperíodo de 12 hs luz/oscuridad. Los animales tuvieron libre acceso a la bebida y al alimento (dieta estándar para rata-ratón marca Cooperación, Argentina). El protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Buenos Aires (N° CICUAL-ODON/FOUBA 001-2023) siguiendo las pautas establecidas para el cuidado y uso de animales (NRC, 2011).

DISEÑO EXPERIMENTAL

La mitad de los animales (4 machos y 6 hembras) fue tratada con 20 mg/kg de etidronato bisódico (EHBP) (Gador SA, Argentina) y la otra mitad con solución fisiológica (control) vía intraperitoneal 5 veces por semana durante 3 semanas. Al cabo de 3 semanas, se practicó la eutanasia con dosis intraperitoneales de 5 mg/kg xilacina (Laboratorio König, Argentina) y 50 mg/kg de ketamina (Laboratorio Holliday, Argentina) y una dosis intracardíaca de euthanyl (0,1-0,3 ml). Se extrajeron maxilares inferiores. Las muestras fueron fijadas en una solución 10% formaldehído-PBS pH 7.4 durante 48 hs, fueron descalcificadas en una solución 4M EDTA en 0.4M NaOH (Anedra, Argentina) pH 7.2 a temperatura ambiente y fueron procesadas histológicamente para su inclusión en parafina. Se realizaron cortes de hemimaxilares orientados en sentido mesio-distal a nivel del primer molar inferior y se colorearon con H&E.

ESTUDIOS MORFOMÉTRICOS

Se tomaron microfotografías digitales y mediante la utilización del software Image Pro Plus 5.1 (UTHSCSA) se realizaron determinaciones histomorfométricas según Dempster et al. (2013). En el área que se muestra en la figura 1, se evaluaron los siguientes parámetros: Área ósea/área total (%), espesor de ligamento periodontal (μm), área de dentina (mm^2) y área de cemento (μm^2).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresaron como la media \pm desvío estándar. Se analizaron estadísticamente mediante el test T de Student para comparaciones entre grupos del mismo sexo y el test ANOVA de 2 vías para las comparaciones entre hembras y machos usando el software InfoStat. Valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

RESULTADOS

Durante el tiempo de tratamiento con EHBP, se realizó el seguimiento de los animales mediante la observación de su comportamiento y ganancia de peso corporal. Los animales no presentaron síntomas

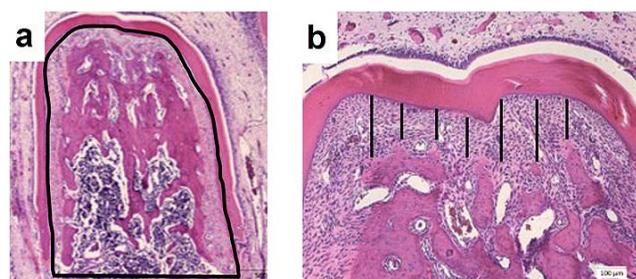


FIGURA 1. Áreas de medición de hueso interradicular de primer molar (a), de ligamento periodontal (b).

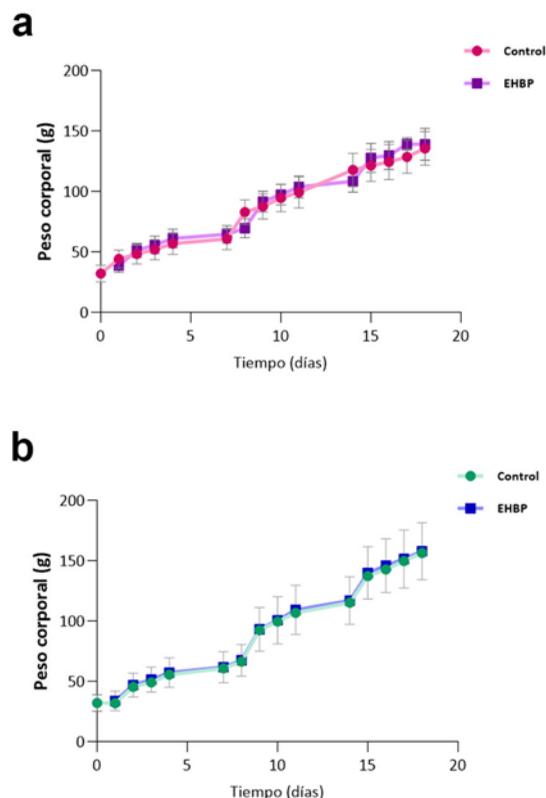


FIGURA 2. Curva de peso corporal diaria de hembras (a) y de machos (b) durante el ensayo.

de deshidratación, dolor, ni cambio de coloración o textura del pelaje (dato no mostrado). Tampoco se observaron diferencias significativas en el peso corporal entre grupos tratados ni en hembras, ni en machos (Figura 2).

El análisis histológico de los maxilares por microscopía óptica convencional, mostró zonas no mineralizadas en dentina, en cemento y en hueso alveolar en los grupos que recibieron EHBP independientemente del sexo de los animales (Figura 3).

Al analizar los tejidos dentarios se observó un aumento significativo en el porcentaje de tejido óseo no mineralizado u osteoide en ambos grupos tratados con EHBP respecto a su control (%) (hembras: control: 1.5 ± 1.5 y EHBP: 23.8 ± 4.1 ; machos: control: 1.6 ± 0.6 y EHBP: 7.7 ± 0.8). Un hallazgo importante es que el porcentaje de osteoide en ratas tratadas con EHBP fue significativamente mayor en hembras que en machos (%) (hembras EHBP: 23.8 ± 4.1 ; machos EHBP: 7.7 ± 0.8 , ANOVA 2 vías). Las hembras tratadas con EHBP además presentaron un aumento significativo de área ósea total con respecto al control (%) (control: 37.7 ± 3.8 ; EHBP: 46.4 ± 1.5). A pesar de las diferencias halladas en el porcentaje de osteoide, los machos no mostraron diferencias significativas en el área ósea total entre grupos (%) (control: 41.6 ± 0.2 ; EHBP: 41.7 ± 0.9) (Figura 4).

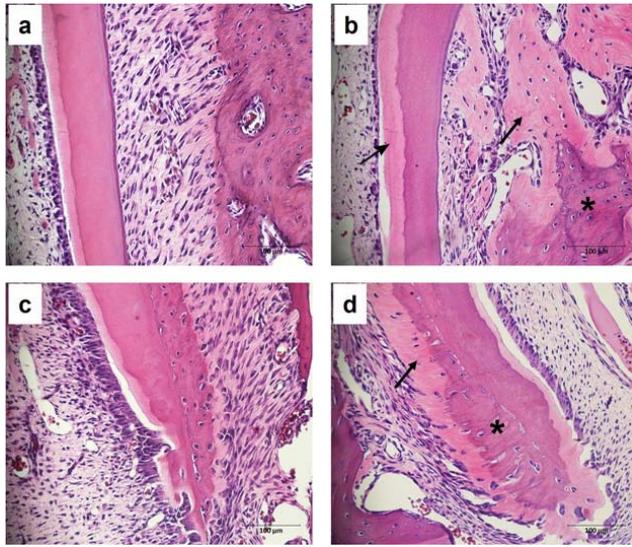


FIGURA 3. Microfotografías de dentina, de hueso interradicular y de cemento de hembras control (a,c) y EHBP (b,d). Nótese la diferencia de coloración entre las zonas no mineralizadas (→) y las mineralizadas (*). H&E.

Se registró un menor espesor de ligamento periodontal en hembras del grupo EHBP respecto del grupo control (control: 486 ± 111 ; EHBP: 186 ± 92) ($p < 0.05$). Sin embargo, los machos no mostraron la misma tendencia (control: 475 ± 36 ; EHBP: 434 ± 112) ($p > 0.05$) (Figura 5).

El porcentaje de dentina no mineralizada aumentó significativamente en animales que recibieron EHBP respecto de los controles ($p < 0.05$) tanto en hembras (control: $6,3 \pm 1,3$; EHBP: $14,3 \pm 1,3$) como en machos (control: $5,7 \pm 2,3$; EHBP: $11,6 \pm 2,5$), siendo más marcadas las diferencias en hembras. La misma tendencia se observa en el cemento (Figura 6).

DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio demuestran que la administración crónica de EHBP en una concentración de 20 mg/kg altera significativamente los procesos de biomineralización del hueso alveolar, de la dentina y del cemento conduciendo a la acumulación de matriz extracelular no mineralizada en ellos. Estudios clínicos han observado que la administración de EHBP en el tratamiento de enfermedades como la enfermedad de Paget afecta la formación ósea produciendo un cuadro similar a osteomalacia (Gibbs et al., 1986; Hoppé et al., 2012). Estudios *in vivo*, realizados por Jowsey et al., (1970), han demostrado que la administración de EHBP genera un aumento de osteoide en huesos largos. En este trabajo se observó que el EHBP también produce un aumento de osteoide en el hueso interradicular y esto podría deberse a la capacidad del EHBP de unirse al calcio e inhibir la formación de cristales y su disolución. Los tejidos mineralizados del organismo son el tejido

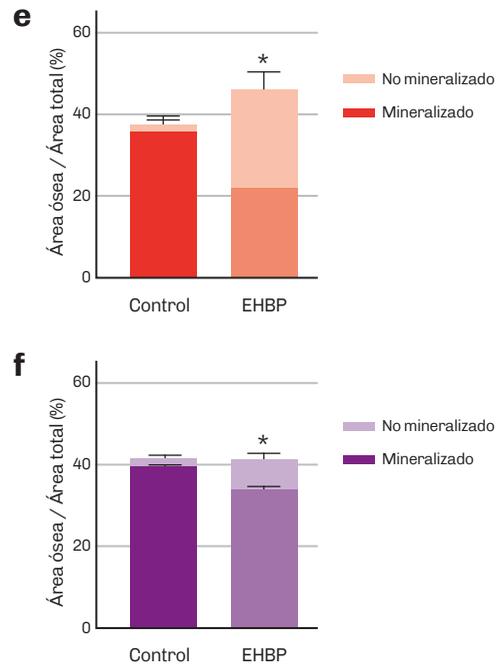
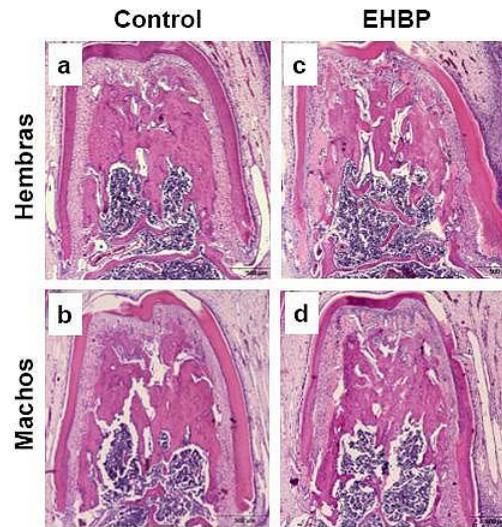


FIGURA 4. Microfotografías de hueso interradicular correspondientes a hembras (a,c) y machos (b,d). H&E. Gráficos correspondientes al porcentaje área ósea/área total en función del tratamiento en hembras (e) y machos (f). Los resultados se expresan como el promedio \pm desvío estándar. * $p < 0.05$ (Test T de Student).

óseo y los tejidos dentarios, los cuales comparten varios mecanismos que gobiernan su desarrollo y mineralización (Kovacs et al., 2021). En este trabajo, la administración de EHBP no solo alteró la mineralización del tejido óseo, sino que también aumentó el porcentaje de dentina no mineralizada. Estos resultados coinciden con lo observado por Larsson (1974) en un ensayo en el cual mostró que la administración de 7.5 y 10 mg de EHBP en cortos períodos de tiempo inhibe la deposición de cristales de hidroxiapatita de

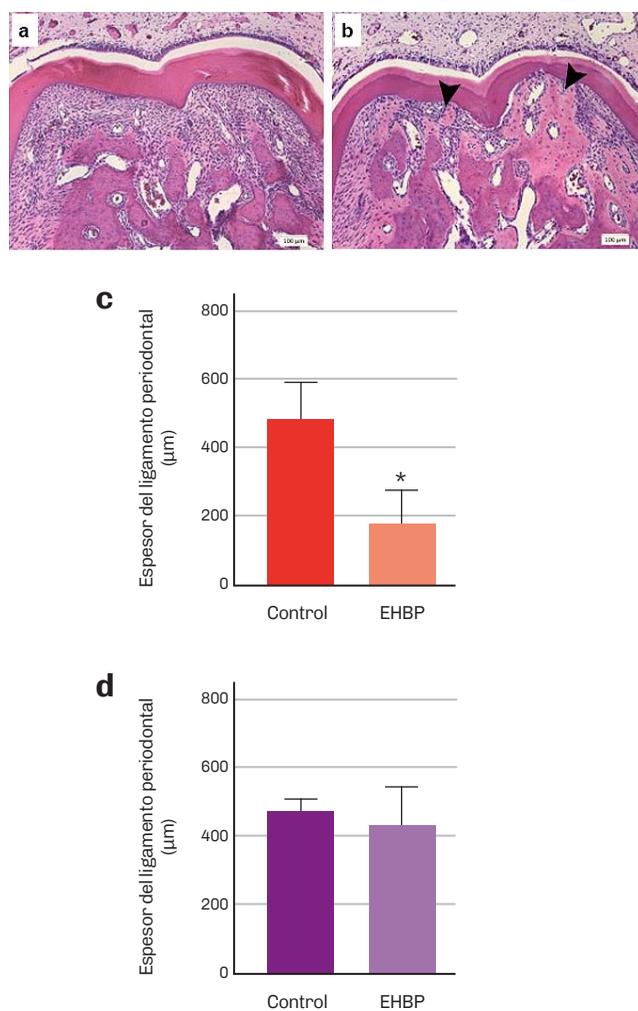


FIGURA 5. Microfotografías donde se observa el ligamento periodontal en hembra control (a) y con EHPB (b). Nótese que en algunos sectores del área bajo la furca el ligamento periodontal esta casi ausente (punta de flecha). Gráficos correspondientes al espesor del ligamento periodontal en función del tratamiento en hembras (c) y machos (d). Los resultados se expresan como el promedio±desvío estándar. * $p < 0.05$ (Test T de Student).

la dentina durante la formación de las piezas dentarias de la rata. Contrariamente, Bozal et al., (2005), mostraron que ratas tratadas con dosis de 7 mg/kg de EHPB aplicado no más de 48 horas produjo efectos positivos como quelante de metales y procesos anabólicos demostrando que no solo la cantidad de droga es determinante en el efecto biológico sino también el medio y tiempo de exposición. Beertsen et al., (1985), observaron que el EHPB inhibe la formación de dentina circumpulpar en el incisivo de crecimiento continuo de la rata principalmente debido a la interacción del EHPB con los cristales y en menor medida por la inhibición que genera en la síntesis de fosfoproteínas de la matriz dentinaria. En concordancia con los resultados obtenidos en dentina, en este trabajo, el EHPB generó un aumento de cemento no mineralizado. Los tejidos parodontarios también

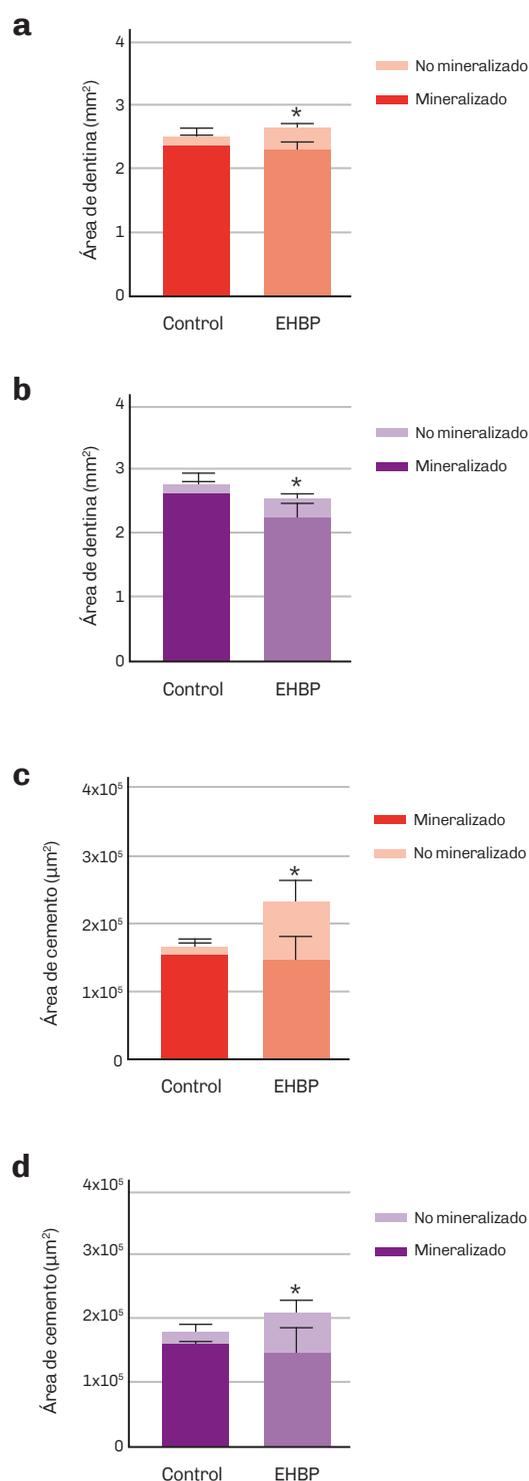


FIGURA 6. Gráficos correspondientes al área de dentina y cemento en función del tratamiento en hembras (a,c) y machos (b,d). Los resultados se expresan como el promedio±desvío estándar. * $p < 0.05$ (Test T de Student)

se vieron afectados, dado que se observó una disminución del espesor de ligamento periodontal en ratas tratadas con EHPB. En algunos casos y en ciertas zonas de la furca el ligamento se vio invadido en todo

su espesor por tejido osteoide. Esto condice con los ensayos de Schaaf et al., (1978), en donde hámsteres que recibieron EHBP durante 6 meses mostraron anquilosis con concomitante pérdida de ligamento periodontal y cemento.

Dadas las deficiencias en la mineralización encontradas en nuestro modelo a nivel de hueso interradicular, dentina y cemento, podemos decir que el nuestro es un modelo de hiperosteoidosis. La hiperosteoidosis es una característica de las patologías óseas como el raquitismo y la osteomalacia. El raquitismo además presenta alteraciones en el cartílago de crecimiento dado que afecta a pacientes en crecimiento (Corrêa et al., 1992; Uday y Högler, 2020). Nuestros resultados mostrarían mayor compatibilidad con un cuadro clínico de osteomalacia.

Los estrógenos son factores que influyen sobre el metabolismo óseo. Estas hormonas tienen un papel importante en el crecimiento largo y ancho de los huesos durante la pubertad y en la regulación hormonal de la remodelación ósea (Noirrit-Esclassan et al., 2021). Se sabe que los osteoblastos poseen receptores de estrógenos que estimulan la síntesis de osteoprotegerina modulando indirectamente la actividad osteoclástica. De esta manera, las mujeres posmenopáusicas al presentar un rápido descenso en los niveles de estrógenos durante el climaterio presentan una mayor predisposición a desarrollar osteoporosis que los hombres de edad adulta (Choi et al., 2021). En este trabajo se observó que las hembras resultaron ser más susceptibles que los machos a la influencia del EHBP dado que mostraron valores de osteoide significativamente mayores.

En los últimos años, se ha sugerido que el aislamiento obligatorio por la pandemia COVID-19 podría haber provocado una disminución en los niveles de Vit D séricos provenientes de la absorción cutánea. Lo cual afecta la captación de calcio intestinal produciendo una hipocalcemia. La disminución de calcio en sangre desencadenaría, entre otras cosas, alteraciones en los procesos de biomineralización predisponiendo a la aparición de patologías óseas. En este contexto es esperable que pacientes con este tipo de alteraciones se presenten con mayor frecuencia a la consulta odontológica.

Tener en cuenta las características de los tejidos mineralizados es importante al momento de decidir y pronosticar el éxito de diferentes tratamientos odontológicos. Hoy en día es habitual la consulta por desórdenes en la oclusión, muchos de los cuales se tratan con ortodoncia. Es sabido que los movimientos ortodóncicos requieren condiciones saludables del tejido óseo, por lo tanto, modelos experimentales de alteraciones en la biomineralización contribuirían al estudio y esclarecimiento de los mecanismos involucrados en la mecánica ortodóncica.

CONCLUSIONES

En el presente estudio se demuestra que la administración continua de EHBP en una concentración de

20 mg/kg altera significativamente los procesos de biomineralización del hueso alveolar, la dentina y el cemento, conduciendo a la acumulación de matriz extracelular no mineralizada en ellos y en el espacio del ligamento periodontal. Por otro lado, las ratas Wistar hembras recién destetadas desarrollan cuadros de alteración en la mineralización más severos que los machos de la misma edad.

Contar con un modelo eficiente y reproducible de alteraciones en la biomineralización, permite desarrollar diferentes líneas de investigación para dilucidar el comportamiento de los tejidos mineralizados en respuesta a procesos fisiológicos y terapéuticos, entre los cuales podríamos mencionar el movimiento dentario. Los resultados de dichas investigaciones permitirían adecuar el diagnóstico, pronóstico y terapéuticas odontológicas a pacientes con este tipo de alteraciones.

REFERENCIAS

- Abou Neel, E. A., Aljabo, A., Strange, A., Ibrahim, S., Coathup, M., Young, A. M., Bozec, L., y Mudera, V. (2016). Demineralization-remineralization dynamics in teeth and bone. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 4743–4763. <https://doi.org/10.2147/IJN.S107624>
- Beertsen, W., Niehof, A., y Everts, V. (1985). Effects of 1-hydroxyethylidene-1, 1-bisphosphonate (HEBP) on the formation of dentin and the periodontal attachment apparatus in the mouse. *The American Journal of Anatomy*, 174(1), 83–103. <https://doi.org/10.1002/aja.1001740107>
- Boyce, B. F., Smith, L., Fogelman, I., Johnston, E., Ralston, S. y Boyle, I. T. (1984). Focal osteomalacia due to low-dose diphosphonate therapy in Paget's disease. *Lancet (London, England)*, 1(8381), 821–824. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(84\)92272-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(84)92272-4)
- Bozal, C. B., Martinez, A. B., Cabrini, R. L., y Ubios, A. M. (2005). Effect of ethane-1-hydroxy-1,1-bisphosphonate (EHBP) on endochondral ossification lesions induced by a lethal oral dose of uranyl nitrate. *Archives of Toxicology*, 79(8), 475–481. <https://doi.org/10.1007/s00204-005-0649-5>
- Choi, K. H., Lee, J. H., y Lee, D. G. (2021). Sex-related differences in bone metabolism in osteoporosis observational study. *Medicine (Baltimore)*, 100(21), e26153. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000026153>
- Cianferotti L. (2022). Osteomalacia is not a single disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(23), 14896. <https://doi.org/10.3390/ijms232314896>

- Corrêa, P. H., Leite, M. O., Borelli, A., y Wajchenberg, B. L. (1992). Effect of testosterone on bone mineralization of the hypophosphataemic rat. *Acta Endocrinologica*, 126(6), 510–514. <https://doi.org/10.1530/acta.0.1260510>
- Dempster, D. W., Compston, J. E., Drezner, M. K., Glorieux, F. H., Kanis, J. A., Malluche, H., Meunier, P. J., Ott, S. M., Recker, R. R., y Parfitt, A. M. (2013). Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *Journal of Bone and Mineral Research*, 28(1), 2–17. <https://doi.org/10.1002/jbmr.1805>
- Fouda, N., Caracatsanis, M., Kut, I. A., y Hammarström, L. (1991). Mineralization disturbances of the developing rat molar induced by mono- and bisphosphonates. *Journal de Biologie Buccale*, 19(1), 106–115.
- Gibbs, C. J., Aaron, J. E., y Peacock, M. (1986). Osteomalacia in Paget's disease treated with short term, high dose sodium etidronate. *British Medical Journal (Clinical Research Ed.)*, 292(6530), 1227–1229. <https://doi.org/10.1136/bmj.292.6530.1227>
- Hatano, M., Kitajima, I., Yamamoto, S., Nakamura, M., Isawa, K., Hirota, Y., Hoshino, J., Sawa, N., y Ubara, Y. (2021). Case report: osteomalacia due to bisphosphonate treatment in a patient on hemodialysis. *BMC Nephrology*, 22(1), 298. <https://doi.org/10.1186/s12882-021-02509-5>
- Hoppé, E., Masson, C., Laffitte, A., Chappard, D., y Audran, M. (2012). Osteomalacia in a patient with Paget's bone disease treated with long-term etidronate. *Morphologie*, 96(313), 40–43. <https://doi.org/10.1016/j.morpho.2012.08.001>
- Jowsey, J., Holley, K. E., y Linman, J. W. (1970). Effect of sodium etidronate in adult cats. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 76(1), 126–133. <https://doi.org/10.5555/uri:pii:0022214370901022>
- Kovacs, C. S., Chaussain, C., Osdoby, P., Brandi, M. L., Clarke, B., y Thakker, R. V. (2021). The role of biomineralization in disorders of skeletal development and tooth formation. *Nature Reviews. Endocrinology*, 17(6), 336–349. <https://doi.org/10.1038/s41574-021-00488-z>
- Larsson, A. (1974). The short-term effects of high doses of ethylene-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate upon early dentin formation. *Calcified Tissue Research*, 16(2), 109–127. <https://doi.org/10.1007/BF02008217>
- Matsushima, S., Torii, M., Ozaki, K., y Narama, I. (2003). Iron lactate-induced osteomalacia in association with osteoblast dynamics. *Toxicologic Pathology*, 31(6), 646–654. <https://doi.org/10.1080/01926230390241990>
- National Research Council (NRC). (2011) *Guide for the care and use of laboratory animals*. (8va ed.) National Academy Press. <https://doi.org/10.17226/12910>
- Noirrit-Esclassan, E., Valera, M. C., Trémollières, F., Arnal, J. F., Lenfant, F., Fontaine, C., y Vinel, A. (2021). Critical role of estrogens on bone homeostasis in both male and female: from physiology to medical implications. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1568. <https://doi.org/10.3390/ijms22041568>
- Ponte Fernández, N., Estefania Fresco, R., y Aguirre Urizar, J. M. (2006). Bisphosphonates and oral pathology I. General and preventive aspects. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, 11(5), E396–E400. http://www.medicinaoral.com/pubmed/medoralv11_i5_pE396.pdf
- Rico Lenza, H. (2002). Osteomalacias. *Medicine*, 8(83), 4475–4482. [https://doi.org/10.1016/S0304-5412\(02\)70833-0](https://doi.org/10.1016/S0304-5412(02)70833-0)
- Schaaf J. E., Kafrawy AH y Standish SM (1978). Effects of a diphosphonate on experimental periodontal disease in hamsters. *Journal of Dental Research*, 57, 195, abstract nro. 483.
- Thomas, T., Lafage, M. H., y Alexandre, C. (1995). Atypical osteomalacia after 2 year etidronate intermittent cyclic administration in osteoporosis. *The Journal of Rheumatology*, 22(11), 2183–2185.
- Uday, S., y Högler, W. (2020). Nutritional rickets & osteomalacia: A practical approach to management. *The Indian Journal of Medical Research*, 152(4), 356–367. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_1961_19
- Van Den Bos, T., & Beertsen, W. (1987). Effects of 1-hydroxyethylidene-1, 1-bisphosphonate (HEBP) on the synthesis of dentin matrix proteins in the mouse. *Collagen and Related Research*, 7(2), 135–147. [https://doi.org/10.1016/s0174-173x\(87\)80005-5](https://doi.org/10.1016/s0174-173x(87)80005-5)
- Watts, N. B., Chesnut, C. H., 3rd, Genant, H. K., Harris, S. T., Jackson, R. D., Licata, A. A., Miller, P. D., Mysiw, W. J., Richmond, B., y Valent, D. (2020). History of etidronate. *Bone*, 134, 115222. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2020.115222>

AGRADECIMIENTOS

Subsidio: UBACyT 20020190200157BA, Universidad de Buenos Aires. Los autores quieren expresar su gratitud a Ht Mariela Lacave y a Bt Carlos A. Bárcenas por su asistencia técnica y al Dr. Ariel Gualtieri por su asistencia en el análisis estadístico.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés

Dirección para correspondencia

Cátedra de Histología y Embriología

Facultad de Odontología

Marcelo T. de Alvear 2142 Piso 1, lado A.

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, C1125AAH

juliana.rodriguez@odontologia.uba.ar

La Revista de la Facultad de Odontología de la Universidad de Buenos Aires se encuentra bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivadas 2.5 Argentina

