



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**CONSEQUÊNCIAS DA EXPOSIÇÃO MATERNA AO ETANOL**  
**DURANTE A GESTAÇÃO E A LACTAÇÃO NA FORMAÇÃO**  
**E MINERALIZAÇÃO DENTÁRIA EM RATOS**

**PAOLA BEZ GOULART**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
CURSO DE ODONTOLOGIA**

**PAOLA BEZ GOULART**

**CONSEQUÊNCIAS DA EXPOSIÇÃO MATERNA AO ETANOL DURANTE A  
GESTAÇÃO E A LACTAÇÃO NA FORMAÇÃO E MINERALIZAÇÃO DENTÁRIA  
EM RATOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Universidade Federal de Santa Catarina, como  
requisito para obtenção do título de bacharel em  
Odontologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ariane Zamoner Pacheco de Souza

**Florianópolis**

**2015**

Paola Bez Goulart

CONSEQUÊNCIAS DA EXPOSIÇÃO MATERNA AO ETANOL DURANTE A  
GESTAÇÃO E A LACTAÇÃO NA FORMAÇÃO E MINERALIZAÇÃO DENTÁRIA EM  
RATOS

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de cirurgião-dentista e aprovado em sua forma final pelo Departamento de Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 23 de outubro de 2015.

**Banca Examinadora:**

---

Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Ariane Zamoner Pacheco de Souza  
*Orientadora*  
*Universidade Federal de Santa Catarina*

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>.Juliet Kyoko Sugai  
*Membro*  
*Universidade Federal de Santa Catarina*

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fatima Regina Mena Barreto Silva  
*Membro*  
*Universidade Federal de Santa Catarina*

***Dedico este trabalho a todos  
que, assim como eu, amam e  
acreditam na pesquisa científica  
como uma forma de legado.***

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao grande arquiteto do Universo, Deus, por guiar-me todos os dias e fazer-se sentir em minhas preces.

Agradeço à minha mãe, queyytygggfrde9 sempre luta pela minha felicidade. Por ensinar-me a ser pura de coração, assim como ela, a procurar fazer o bem em qualquer circunstância e a amar a família acima de tudo.

Agradeço à minha exemplar irmã, por ensinar-me a ser forte e persistente, a não aceitar injustiças com a cabeça baixa e por compartilhar comigo todos os momentos, sejam bons ou ruins.

Agradeço ao meu estimado padrasto, que como já lhe disse uma vez, ao entrar em nossas vidas nos fez acreditar novamente no amor e no respeito.

Agradeço aos meus avós, Valdyr e Maria, tios, tias, primos, primas e cunhado pelo aconchego, confiança e pela alegria que sempre me trouxeram e trazem todos os dias. Dentre os primos não posso deixar de mencionar minha prima Glória e seu esposo Cláudio, que não só apoiam as minhas decisões, como também me mostram que são possíveis e não são difíceis, se você tentar.

Agradeço ao meu namorado, Luiz, por mostrar-me que o amor é muito mais do que dizer "Eu te amo", agradeço por me fazer muito feliz todos os dias e compartilhar todos os momentos, com dedicação, alegria, paciência e carinho.

Agradeço aos meus sogros, Pedro e Carmelita, e ao meu cunhado, Eduardo, por me acolherem como uma filha e irmã nessa família maravilhosa e exemplar, pelos almoços e conversas semanais, pelo carinho e por tudo que tenho vivido ao lado de vocês.

Agradeço a minha estimada orientadora, Doutora Ariane Zamoner Pacheco de Souza, por acreditar em mim quando nem mesmo eu acreditava, pelas longas conversas, pelos ensinamentos imensuráveis tanto no âmbito profissional quanto no pessoal. É um exemplo a ser seguido como professora, amiga, esposa e mãe.

Agradeço aos meus colegas do laboratório, especialmente, à Daiane Cattani, por todos os momentos de trabalho, risadas e de aprendizados que tivemos desde 2010 quando fomos primeiras alunas de mestrado e iniciação científica da professora Ariane, crescemos e aprendemos juntas por bastante tempo.

Agradeço a todos os colegas do Instituto Federal de Santa Catarina (IFSC), professora Tatiane, Matheus, Marcelo, Neri, por tornarem esse projeto possível e trabalharam por ele.

Agradeço à professora, Doutora Fátima Regina Mena Barreto Silva, por aceitar fazer parte dessa banca, pelos ensinamentos, por sempre me ajudar quando necessário, desde a iniciação científica e por compartilhar seu laboratório, equipamentos, materiais, dentre outros, por algum tempo.

Agradeço à professora, Doutora Juliet Kyoko Sugai, por aceitar participar dessa banca, pelos memoráveis ensinamentos proferidos e por mostrar que os obstáculos devem ser ultrapassados com esforço e dedicação.

Agradeço, por fim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho de conclusão de curso.

*"E aqueles que foram vistos dançando  
foram julgados insanos por aqueles  
que não podiam escutar a música."*

*Friedrich Nietzsche*





## RESUMO

O etanol é o principal responsável por teratogênias no mundo ocidental. O termo síndrome alcoólica fetal (SAF) foi alcunhado no início dos anos setenta para descrever um padrão observado em filhos de mães dependentes de álcool, porém alguns indivíduos apresentam apenas algumas características da síndrome. Todos os indivíduos expostos ao etanol pelo consumo materno durante a gravidez estão sujeitos a presença de defeitos congênitos, porquanto não se sabe a quantidade e o tempo de consumo que são necessários para que estes se manifestem. As anomalias craniofaciais e orodentais representam 80% dos defeitos observados nos indivíduos acometidos. Sabe-se que estes indivíduos estão sujeitos a alterações no desenvolvimento, e essas alterações estão presentes também na formação, maturação e manutenção da dentição. Entretanto, os mecanismos envolvidos nesses processos ainda não foram esclarecidos. Este projeto pretende contribuir para o entendimento destes. Para tal, utilizamos um modelo animal de exposição crônica ao etanol na gestação e lactação de ratos *Wistar*. Com 60 e 90 dias os animais expostos (grupo tratado) e não expostos (grupo controle) foram pesados e eutanasiados, os dentes incisivo superior e os dentes primeiro molar superior foram removidos e deles a polpa foi retirada. Foram realizadas medições nos tamanhos dos incisivos e nas massas dentárias dos dois grupos de dentes, além disso, as concentrações dos minerais cálcio e magnésio foram avaliadas nas estruturas mineralizadas tanto dos molares quanto dos incisivos, por meio de testes colorimétricos, e o influxo do íon cálcio na polpa dos incisivos também foram analisados. Como resultados, obtiveram-se uma diminuição na massa corporal dos animais do grupo tratado, bem como no tamanho e massa dos dentes. Houve aumento da concentração de cálcio nas estruturas mineralizadas e do influxo do íon na polpa dos animais expostos. A concentração de magnésio diminuiu no grupo tratado de 60 dias e aumentou no mesmo grupo de 90 dias. As análises estatísticas foram feitas pelo teste t "Student" e as diferenças encontradas consideradas significativas foram para "p" igual ou menor que 0,05.

**Palavras-chave:** Odontologia. Etanol. Mineralização dentária. Odontogênese. Síndrome Alcoólica Fetal. Efeitos Relacionados ao Álcool.

## ABSTRACT

Ethanol is the main responsible for teratogenicity in the occidental world. The term Fetal Alcohol Syndrome (FAS) was coined at the beginning of the 1970's to describe a pattern observed in children from alcohol dependent mothers, but some individuals present just some of the syndrome characteristics. Every individual exposed to motherly consumption of alcohol during pregnancy is subjected to congenital defects, as it is still not known the quantity and the consumption period needed for them to manifest themselves. Craniofacial and orodental anomalies represent 80% of the observable symptoms on affected individuals. It is known that those individuals are subjected to development alterations, which are also present in the formation, maturation and maintenance of the teeth. However, the mechanisms involved in those processes are still not elucidated. This project aims to contribute to better understand such processes. For which an animal model of chronic exposure to alcohol during gestation and lactation in Wistar rats was used. With 60 and 90 days of life, the exposed (treated group) and the not-exposed (control group) were weighted and euthanized and their maxillary incisors and maxillary first molars were extracted and their pulps separated. The teeth lengths and dental mass were measured, and also the concentration of calcium and magnesium minerals were evaluated through colorimetric analysis in the mineralized structure of both molars and incisors. Also the influx of calcium ions in the pulps of the incisors were analysed. As results, body mass was reduced in the treated group as well as the size and the mass of the teeth. Calcium concentration in the mineralized structures increased as did the ions influx in the pulp of exposed animals. Magnesium concentration decreased in the 60 days old treated group and increased in the 90 days old group. Statistical analysis were carried through Student's t-test and the differences found were considered significant for "p" equal or lower to 0.05.

## LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1: Constituição Histoquímica Dentária.....</i>	18
<i>Tabela 2: Efeito da exposição materna ao etanol na massa corporal da prole aos 60 e 90 dias de idade. ....</i>	41

## LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1: Dente Uniradicular Adulto</i> .....	17
<i>Figura 2: Estágios do desenvolvimento dental</i> .....	23
<i>Figura 3: Estágio de campânula do desenvolvimento dentário</i> .....	23
<i>Figura 4: Estágio de campânula do desenvolvimento dentário, apontando a localização do órgão do esmalte nessa fase e sua constituição.</i> .....	25
<i>Figura 5: Guia de lábio/filtro. Fonte: (AstleyandClarren [2000])</i> .....	34
<i>Figura 6: Alterações craniofaciais de criança afetada por SAF</i> .....	35
<i>Figura 7: Representação esquemática dos pontos anatômicos, bem como dos pontos anatômicos com retas para obtenção das medidas em milímetros.</i> .....	43

## LISTA DE GRÁFICOS

<i>Gráfico 1 e Gráfico 2:</i> Efeito da exposição materna ao etanol na massa corporal da prole aos 60 e 90 dias de idade. ....	41
<i>Gráfico 3 e Gráfico 4:</i> Massa em gramas dos dentes molares de ratos de 60 e 90 dias de idade, expostos ao etanol durante a gestação e lactação. ....	42
<i>Gráfico 5 e Gráfico 6:</i> Massa em gramas dos dentes incisivos de ratos de 60 e 90 dias de idade, expostos ao etanol durante a gestação e lactação. ....	42
<i>Gráfico 7 e Gráfico 8:</i> Efeito da exposição materna ao etanol no tamanho do dente incisivo central de ratos de 60 e 90 dias de idade. ....	44
<i>Gráfico 9 e Gráfico 10:</i> Efeito da exposição materna ao etanol durante a gestação e o aleitamento na concentração de cálcio nos dentes molares de ratos de 60 e 90 dias de idade. ....	44
<i>Gráfico 11 e Gráfico 12:</i> Efeito da exposição materna ao etanol durante a gestação e o aleitamento na concentração de cálcio nos dentes incisivos de ratos de 60 e 90 dias de idade. ....	45
<i>Gráfico 13 e Gráfico 14:</i> Efeito da exposição materna ao etanol durante a gestação e o aleitamento na concentração de magnésio nos dentes molares de ratos de 60 e 90 dias de idade. ....	46
<i>Gráfico 15 e Gráfico 16:</i> Efeito da exposição materna ao etanol durante a gestação e o aleitamento na concentração de magnésio nos dentes incisivos de ratos de 60 e 90 dias de idade. ....	46
<i>Gráfico 17 e Gráfico 18:</i> Efeito da exposição materna ao etanol durante a gestação e o aleitamento no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ na polpa dos dentes incisivos de ratos de 60 e 90 dias de idade. ....	47

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>16</b>
2.1	OBJETIVO GERAL	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>17</b>
3.1	CONSTITUIÇÃO DENTÁRIA HUMANA	17
3.1.1	<i>Esmalte</i>	19
3.1.2	<i>Dentina</i>	20
3.1.3	<i>Polpa</i>	21
3.2	FORMAÇÃO E MINERALIZAÇÃO DENTÁRIA HUMANA	22
3.2.1	<i>Odontogênese</i>	22
3.2.2	<i>Amelogênese</i>	24
3.2.3	<i>Dentinogênese</i>	27
3.3	FATORES QUE INTERFEREM NA FORMAÇÃO E MINERALIZAÇÃO DENTÁRIA	28
3.3.1	<i>Dietéticos</i>	29
3.3.2	<i>Hormonais</i>	30
3.3.3	<i>Genéticos</i>	31
3.4	EFEITOS DA EXPOSIÇÃO MATERNA AO ETANOL NA GESTAÇÃO E LACTAÇÃO	32
3.4.1	<i>Efeitos gerais relacionados ao álcool e síndrome alcoólica fetal</i>	32
3.4.2	<i>Efeitos craniofaciais, orais e dentários</i>	34
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>38</b>
4.1	ANIMAIS	38
4.2	EXPOSIÇÃO MATERNA AO ETANOL:	38
4.3	DOSAGEM DA CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO NAS ESTRUTURAS MINERALIZADAS	39
4.4	DOSAGEM DE MAGNÉSIO DAS ESTRUTURAS MINERALIZADAS	39
4.5	INFLUXO DE $^{45}\text{Ca}^{2+}$ NA POLPA DOS DENTES INCISIVOS SUPERIORES	40
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>41</b>
5.1	EFEITO DA EXPOSIÇÃO MATERNA AO ETANOL NA MASSA CORPORAL DA PROLE AOS 60 E 90 DIAS DE IDADE	41

5.2	CONSEQUÊNCIAS DA EXPOSIÇÃO MATERNA AO ETANOL DURANTE A GESTAÇÃO E O ALEITAMENTO NA MASSA EM GRAMAS (G) DOS DENTES INCISIVOS E MOLARES .....	42
5.3	CONSEQUÊNCIAS DA EXPOSIÇÃO MATERNA AO ETANOL NO CRESCIMENTO DOS DENTES INCISIVOS DA PROLE .....	43
5.4	CONSEQUÊNCIAS DA EXPOSIÇÃO MATERNA AO ETANOL NA CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO DAS ESTRUTURAS MINERALIZADAS DE INCISIVOS CENTRAIS E PRIMEIROS MOLARES SUPERIORES DE RATOS .....	44
5.5	CONSEQUÊNCIAS DA EXPOSIÇÃO MATERNA AO ETANOL NA CONCENTRAÇÃO DE MAGNÉSIO DAS ESTRUTURAS MINERALIZADAS DE INCISIVOS CENTRAIS E PRIMEIROS MOLARES SUPERIORES DE RATOS .....	45
5.6	EFEITOS DA EXPOSIÇÃO MATERNA AO ETANOL NO INFLUXO DE CÁLCIO NA POLPA DE DENTES INCISIVOS SUPERIORES DA PROLE .....	46
<b>6</b>	<b>DISCUSSAO .....</b>	<b>48</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSOES .....</b>	<b>53</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>54</b>





## 1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) divulgou em 12 de maio de 2014 o Relatório Global sobre Álcool e Saúde, que traz informações sobre o consumo de álcool no mundo e avalia os avanços realizados nas políticas do álcool desde a publicação das Estratégias Globais para Redução do Uso Nocivo do Álcool em 2010. O relatório aponta que, mesmo com a criação das estratégias para a redução do uso nocivo do álcool, 3,3 milhões de pessoas morreram em decorrência do consumo de álcool em 2012, ou seja, 6% de todas as mortes no mundo são atribuídas ao uso dessa droga <sup>[1]</sup>.

Em 2004 foi apontado pela Secretaria Nacional Antidrogas que o consumo de álcool inicia-se nos adolescentes por volta dos 12 anos de idade e o uso regular se estabelece por volta dos 14,8 anos. O documento esclarece que 48,3% dos adolescentes entre 12 e 17 anos, já beberam alguma vez na vida. Desses, 14,8% bebem regularmente <sup>[2]</sup>.

A prevalência do alcoolismo entre mulheres é significativamente menor que a encontrada entre os homens, girando em torno de 5,7%. Ainda assim, o consumo abusivo e/ou a dependência do álcool trazem, reconhecidamente, inúmeras repercussões negativas sobre a saúde física e psíquica e sobre a vida social da mulher <sup>[1]</sup>. Além disso, o etanol, sob a forma de bebidas (vinho, cerveja, uísque, gin, vodka, licor), é o vetor mais relevante de retardo mental nos filhos de mães alcoolistas e o principal responsável por teratogênias no mundo ocidental. Embora não se saiba exatamente qual a dose de álcool que poderia causar dano fetal, evidências recentes sugerem que mesmo uma dose por semana está associada com possibilidade significativa de dificuldades mentais <sup>[3]</sup>.

O termo síndrome alcoólica fetal (SAF) foi alcunhado no início dos anos 1970 para descrever um padrão observado em filhos de mães dependentes de álcool. A SAF pertence a um conjunto de síndromes caracterizadas pela presença de defeitos congênitos ocasionados pelo consumo materno de álcool em grandes quantidades durante a gravidez <sup>[4]</sup>. Os índices de incidência mundial encontram-se entre 0,5 e 3 casos de SAF para cada 1.000 nascidos vivos em várias populações. Esses índices estão acima da soma de outros distúrbios de desenvolvimento, como a síndrome de Down e a espinha bífida <sup>[3]</sup>.

Mais tarde, surgiu a designação Efeitos Relacionados ao Álcool, já que muitos indivíduos não apresentam todas as características necessárias para serem considerados portadores da SAF, porém, possuem malformações e ou desordens associadas ao consumo materno do álcool [5].

Hermann salienta que " havendo exposição pré-natal ao álcool, e com base nos estudos realizados até o momento, a SAF e suas variações clínicas, como as desordens do espectro alcoólico fetal (DEAF) e, outras, anteriormente denominadas efeito alcoólico fetal, podem apresentar: dismorfismo facial, com variações de traços raciais na face; deficiência no crescimento pré ou pós-natal, no peso e/ou na altura, no 10º percentil ou menos, referido em qualquer idade e ajustado para sexo, idade gestacional e etnia; e anormalidades no sistema nervoso central [3]. "

Segundo Sant´ana [6]

As anomalias crâniofaciais e orodentais representam 80% dos defeitos observados nos indivíduos com a SAF (*Streissguth et al. 63, 1991*) [7]. As características craniofaciais da síndrome mais conhecidas e comumente observadas são: hipoplasia de filtro labial (filtro indistinguível ou pequeno sulco vertical), lábio superior estreito, fissura palpebral curta, retrognatismo na infância e relativo prognatismo na adolescência, porção média da face pequena e achatada, hipoplasia maxilar, nariz pequeno e arrebitado e orelhas malformadas. Ocasionalmente, pode se observar fenda labial e fenda palatina (*Clarren & Smith, 1978*) [8]. *Church et al.(1997)* [9] e *Jackson & Hussain (1990)* [10] relataram a presença de dentes pequenos, hipoplasia do esmalte e retardo na erupção da dentição permanente.

Os mecanismos pelos quais o álcool atua sobre células e tecidos não estão totalmente esclarecidos. Esses mecanismos podem ser devidos a vários processos, incluindo interações na membrana celular entre as células em desenvolvimento, bem como em processos celulares e metabólicos (síntese de macromoléculas, secreção proteica, metabolismo do cálcio, transporte de aminoácidos através da placenta, entre outros) e nos fatores de crescimento, necessários para o crescimento normal [6].

Por razões éticas, não é possível a realização de estudos experimentais sobre a ação do álcool nas mulheres grávidas. Assim, vários modelos animais são escolhidos para o estudo do seu efeito teratogênico [11]. Estudos anteriores afirmam que o desenvolvimento dentário dos ratos ocorre de maneira semelhante ao do ser

humano quanto aos tipos celulares e mecanismos de formação, demonstrando as relevâncias dos estudos realizados em modelos animais <sup>[12,13]</sup>.

O rato tem uma dentição simples; os molares na parte de trás da boca são separados dos incisivos na frente por um intervalo sem dentes, ou diastema. Embora os seres humanos tenham tipos de dentes extras, como caninos e pré-molares, estes são formados e modelados por processos semelhantes aos do desenvolvimento dentário dos ratos, porém com níveis adicionais de complexidade. A outra diferença principal entre a dentição de rato e os seres humanos é que os ratos só tem uma dentição, a decídua. O rato pode ser considerado, portanto, um modelo simplificado da condição humana <sup>[14]</sup>.

Com as devidas proporções, o parâmetro de consumo excessivo de bebida alcoólica para humanos pode ser utilizado para ratos, uma vez que ambos dispõem dos mesmos mecanismos microssomais de biotransformação do etanol <sup>[15,16,17,18]</sup>.

Considerando o que foi exposto, este estudo pretende investigar as consequências da exposição materna ao etanol sobre a formação e mineralização dentária da prole.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

- Estudar os efeitos da exposição materna ao etanol na formação e na mineralização dentária de ratos adultos.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Verificar o efeito da exposição ao etanol na massa corporal de ratos expostos durante a gestação e o aleitamento;
- Estudar o efeito da exposição materna ao etanol na massa dos dentes incisivo central superior e primeiro molar inferior da prole.
- Verificar as consequências da exposição materna ao etanol durante a gestação e o aleitamento no tamanho do dente incisivo central superior de ratos da prole.
- Estudar o efeito da exposição materna ao etanol na concentração de cálcio das estruturas dentárias mineralizadas do primeiro molar inferior e incisivo central superior de ratos.
- Estudar o efeito da exposição materna ao etanol na concentração de magnésio das estruturas dentárias mineralizadas do primeiro molar inferior e incisivo central superior de ratos.
- Mensurar o influxo de cálcio pulpar em incisivos centrais de ratos expostos ao etanol durante a gestação e aleitamento.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Constituição Dentária Humana

O dente adulto, completamente desenvolvido, apresenta-se anatomicamente em duas partes distintas: a coroa, externamente visível, e a raiz, implantada na cavidade alveolar <sup>[19]</sup>.

Considera-se o dente como um órgão (pois na sua constituição participam tecidos diferentes) que contém tecidos duros e reconhecem-se três estruturas mineralizadas que envolvem a polpa dental (tecido celularizado, composto, principalmente, por fibras colágenas): o esmalte, a dentina e o cimento. Dos tecidos citados, dois são periféricos, o esmalte (na coroa) e o cimento (na raiz) e apenas a polpa contém vasos e nervos <sup>[20, 21]</sup>.

O dente prende-se ao osso alveolar através do ligamento periodontal e o ligamento tem suas fibras inseridas na raiz do dente pelo cimento. O cimento pode ser celular ou acelular e além de inserir essas fibras ligamentares, ainda participa ativamente dos processos de erupção, movimentos fisiológicos e ortodônticos e tem a função de reparar danos causados à raiz radicular <sup>[22]</sup>.

A gengiva protege e sustenta o dente <sup>[19]</sup>.

Pode-se observar a estrutura dentária na figura abaixo (*Figura 1*).

*Figura 1: Dente Uniradicular Adulto*



*Adaptado de: [23]*

A constituição histológica e química dentária pode ser observada, na tabela abaixo (*Tabela 1*):

Tabela 1: Constituição Histoquímica Dentária

<b>Tecido</b>	<b>Minerais</b>	<b>Orgânicos</b>
<p><b>Esmalte</b></p> <p>96% minerais 0,5% orgânicos 3,5% água</p>	<p>36% Ca<sup>++</sup>; 18% Po<sub>4</sub><sup>----</sup>; 3% CO<sub>3</sub><sup>-</sup>; 0,5% Mg<sup>++</sup>; 0,01% F<sup>-</sup>; Outros.</p>	<p>0,3% proteínas; 0,1% citrato; 0,05% triglicerídeos; 0,01% colesterol; 0,01% fosfolipídeos; Outros.</p>
<p><b>Dentina</b></p> <p>65% minerais 21,5% orgânicos 13,5% água</p>	<p>26% Ca<sup>++</sup>; 13% Po<sub>4</sub><sup>----</sup>; 3% CO<sub>3</sub><sup>-</sup>; 0,8% Mg<sup>++</sup>; 0,02% F<sup>-</sup>; Outros.</p>	<p>20% proteínas; 1% citrato; 0,4% triglicerídeos; 0,01% colesterol; 0,01% fosfolipídeos; Outros.</p>
<p><b>Cemento</b></p> <p>45% minerais 35% orgânicos 20% água</p>	<p>16% Ca<sup>++</sup>; 8% Po<sub>4</sub><sup>----</sup>; 6% CO<sub>3</sub><sup>-</sup>; 0,5% Mg<sup>++</sup>; 0,05% F<sup>-</sup>; Outros.</p>	<p>32% proteínas; 1,5% citrato; 0,8% triglicerídeos; 0,6% colesterol; 0,01% fosfolipídeos Outros.</p>
<p><b>Polpa</b></p> <p>1% minerais 9% orgânicos 90% água</p>	<p>Ca<sup>++</sup>; Cl<sup>-</sup> HPO<sub>4</sub><sup>-</sup>; CO<sub>3</sub><sup>-</sup>; Mg<sup>++</sup>; Outros.</p>	<p>Concentrações elevadas de proteínas; triglicerídeos; colesterol; glicose; Outros.</p>

Adaptada de: [19]

Essa tabela traduz a constituição média, podendo haver, embora mínimas, algumas diferenças. É sabido, também, que fatores fisiológicos, químicos e mecânicos alteram essa constituição ao longo da vida do indivíduo <sup>[19]</sup>.

A maior parte dos minerais dentários é fixa e se encontra na forma de cristais de hidroxiapatita (Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>) e o restante encontra-se no estado amorfo,

sendo lábil, ao redor desses cristalitos, tanto os minerais fixos quanto os lábeis são permeados por uma matriz protéica. Sugere-se que as trocas minerais acontecem mais na fração lábil amorfa do dente. Ainda o radical hidroxila pode ser substituído pelo  $F^-$ , formando a fluorapatita (menos solúvel que a hidroxi), e o  $Ca^{++}$  por  $Mg^{++}$ ,  $Na^+$  ou  $K^+$  [19].

Os estratos dentários são permeáveis, tendo a polpa maior permeabilidade que a dentina e esta maior que o esmalte [24]. Essa permeabilidade é de imensa importância clínica odontológica, pois pode agregar fatores indesejáveis na dentição, como, por exemplo, o aparecimento de manchas nos dentes devido à utilização da tetraciclina em crianças e na gestação. Cabe ao odontólogo orientar e controlar o processo, principalmente na formação e desenvolvimento dos dentes [19].

### 3.1.1 **Esmalte**

O esmalte representa o tecido mais duro do organismo. Sua fração mineral (96%) é constituída de fosfato de cálcio arranjado em cristalitos de hidroxiapatita, os quais se juntam formando os cristais e estes os primas de esmalte durante o período de desenvolvimento dessa estrutura [24]. É avascular, branco, cinza azulado ou amarelo devido à dentina subjacente. Tem espessura máxima de 2 a 3 mm. Participa ativamente nas trocas químicas com a saliva, porquanto sua permeabilidade, apesar de escassa, permite essas permutas ao introduzir ou retirar íons e água causando mudanças, boas ou não, na estrutura desse tecido [25].

Essa permeabilidade permite que, após a erupção dentária, ácidos (tanto de processos cariosos quanto erosivos) difundam-se para dentro do esmalte, reagindo com a hidroxiapatita e dissolvendo-a. Em contrapartida, esse processo desmineralizante pode ser revertido pela própria saliva que fornece cálcio e fosfato para que ocorra a remineralização e pelo uso de algumas soluções remineralizantes, como o flúor [24].

Segundo *Guedes, 1997* [17,18, 26], após a erupção dentária na cavidade oral, o esmalte continua incorporando em sua estrutura minerais (incluindo flúor) através da saliva, alimentação e líquidos. Estes minerais e o esmalte estão em equilíbrio o tempo todo, resultando em desmineralização e remineralização constante da camada externa do esmalte. Dentes recém erupcionados podem incorporar íons inorgânicos na superfície do esmalte, numa velocidade dez vezes maior que a dos

dentes presentes na cavidade bucal há mais tempo. Visto que a permeabilidade do esmalte diminui com a idade, pois, ao longo do tempo, há a obliteração das vias por onde passam os solutos e solventes pela deposição de sais de fosfato de cálcio. Então, embora o esmalte seja constituído principalmente por hidroxiapatita, sua integridade físico-química depende das concentrações dos íons presentes na fase líquida que o rodeia <sup>[24]</sup>.

Alterações no esmalte, sabendo-se que é um tecido cristalino e que deixa refratar a luz, causam uma perda dos cristais e clinicamente deixam o esmalte mais opaco, mais branco em geral, esse branco pode incorporar pigmentos deixando essa estrutura de outra cor <sup>[27]</sup>.

A prática clínica diária de odontologia envolve a prevenção da desmineralização do esmalte, a promoção da remineralização e a restauração do esmalte cavitado ou com falhas. Por isso o diagnóstico e o tratamento correto das deformações, desmineralizações e malformações de desenvolvimento de esmalte são tão importantes, e para que estes sejam satisfatórios, torna-se necessário entender a etiologia do problema <sup>[28]</sup>.

### 3.1.2 **Dentina**

A dentina é um tecido conjuntivo menos calcificado que o esmalte e com mais matéria orgânica (*tabela 1*), seu principal constituinte mineralizado é, também, a hidroxiapatita e o orgânico, que forma a matriz é o colágeno. Possui milhares de canalículos por milímetro quadrado. Inicia-se na junção amelo-dentinária e continua até a polpa <sup>[19]</sup>. A densidade canalicular varia de 40 mil a 70 mil canalículos por milímetro quadrado, dependendo da distância que se encontra em relação à polpa. As paredes dos canalículos são delimitadas por uma dentina pericanalicular, hipermineralizada até a parte mais próxima a polpa. A dentina entre os canalículos é chamada de dentina intercanalicular, a qual é rica em matriz orgânica e menos calcificada do que a dentina pericanalicular <sup>[29]</sup>.

Os canalículos dentinários são permeáveis e convergem para a polpa, devido a diminuição da área do limite amelo-dentário em relação à polpa a superfície da área da junção dentina-esmalte é maior. Isto resulta em uma concentração de substâncias que penetram muito mais em área próxima à polpa, do que na área da junção amelo-dentinária <sup>[29]</sup>.



O sal fosfato de cálcio da saliva pode passivamente precipitar-se nos canalículos dentinários. A saturação depende de muitas variáveis tais como o fluxo salivar, pH, e concentração [19, 24].

Observa-se, também, que quando os canalículos dentinários são expostos a irritantes, eles se apresentam freqüentemente obliterados e, ainda há um progressivo crescimento da dentina pericanalicular. Esta mineralização requer participação ativa dos odontoblastos e ou processos que modificam as concentrações de cálcio ou fosfato no fluido dentinário, ou de outros fatores que interferem na mineralização. Os odontoblastos além de participarem da mineralização, quando há uma irritação dentinária, também podem secretar colágeno muito rapidamente por um pequeno período de tempo, o que causa a oclusão parcial ou total dos canalículos [24].

### 3.1.3 **Polpa**

A polpa dentária é um tecido conjuntivo frouxo, envolvido pela dentina, exceto no forame apical, onde a mesma se comunica com o periodonto. Sua porção periférica é caracterizada pela sua participação na formação dentinária durante a vida do dente, além de manter a integridade da dentina. Em certos aspectos a polpa difere, estrutural e fisiologicamente, de outros tecidos conjuntivos. Desta maneira, ela dever ser considerada um tipo especial de tecido conjuntivo frouxo [30].

Caracteriza-se por apresentar uma população variada de células, unidas por substância intercelular amorfa, constituídas principalmente de glicosaminoglicanas, ácido hialurônico, sulfato de condroitina, glicoproteínas e água. A substância intercelular fibrosa é principalmente de natureza colágena do tipo I e III. Apresenta também um amplo suprimento vascular e nervoso [30]. Devido a esse suprimento quando há uma agressão mais profunda no dente, a polpa torna-se extremamente dolorosa, se inflama e se congestiona pela compressão das terminações nervosas (nervo pulpar) a que fica sujeita no pequeno espaço destinado a ela [29].

As células que revestem a superfície da cavidade da polpa são os odontoblastos, que, durante os anos depositam a dentina, contudo essa dentina avança cada vez mais sobre a cavidade da polpa, tornado-a menor. Com o passar do tempo a dentina pode parar de crescer e a cavidade da polpa permanecer essencialmente de tamanho constante ou pode se reduzir [31]. Por isso não é

incomum encontrarem-se dentes mais velhos com a polpa muito reduzida ou mesmo inexistente [29].

Mesmo quando a dentina cessa seu crescimento, os odontoblastos ainda são viáveis e mandam seus prolongamentos para dentro dos túbulos dentinários, esses prolongamentos penetram por todo o trajeto através dos canálculos e são importantes para a proteção da polpa e para o metabolismo do cálcio, fosfato e outros minerais [32].

Conforme dito anteriormente, diante de um agente irritante os odontoblastos podem produzir dentina. Ou seja, os odontoblastos podem produzi-lá tanto frente a agressão, como a cárie, quanto pelo envelhecimento natural [17, 18].

## **3.2 Formação e Mineralização Dentária Humana**

### **3.2.1 Odontogênese**

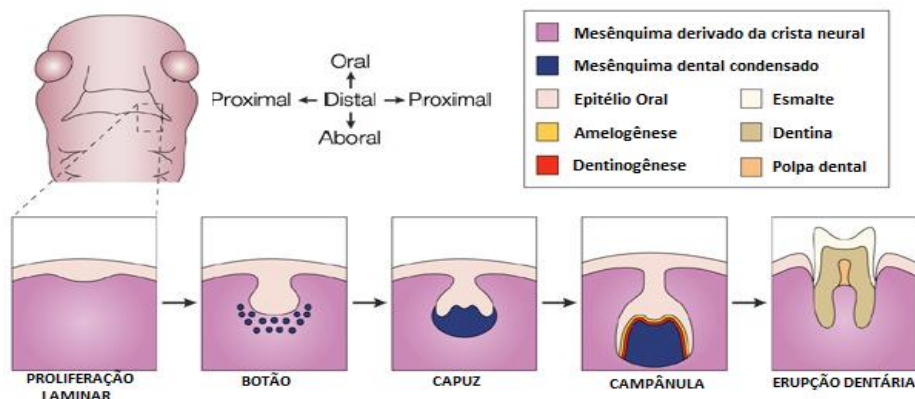
No 45<sup>o</sup> dia de vida intrauterina inicia-se a formação dentária, ou odontogênese [19]. É um processo contínuo que envolve as seguintes fases: fase de botão; fase de capuz; fase de campânula; mineralização [28]. Essas fases podem ser observadas na *Figura 2*.

No início, a partir do epitélio que recobre os rebordos maxilares começa a diferenciação dos dentes. Ocorre uma proliferação epitelial e uma invaginação do tecido formando uma lâmina dentária. No lado vestibular dessa lâmina, com o prosseguimento proliferativo, surgem os botões dentários [33], um para cada dente [19]. Esses botões sofrem uma nova invaginação formando-se um capuz ou taça que mantém mesênquima no seu interior (papila dentária). Na região de encontro do mesênquima com o epitélio começam a se formar duas lâminas histodiferenciadas, dando ao órgão dental, uma forma de campânula ou sino, nessa fase já se estabelece a divisão de onde irá ocorrer a formação do esmalte e a da dentina, porém não há nenhuma estrutura mineralizada ainda [33].

A seguir, o órgão dental se desprende, quase que totalmente da lâmina dentária [19], e passa a chamar-se germe dentário [33]. Este inicia o processo de erupção dentária e formará todo o dente. É constituído pelo órgão do esmalte, papila dentária e saco dentário, como pode ser observado na *Figura 3*. Seu mesênquima ou papila dentária dará origem à dentina e à polpa, o órgão do esmalte (epitélio, ectoderme) dará origem ao esmalte e à estrutura que dará origem a raiz (bainha

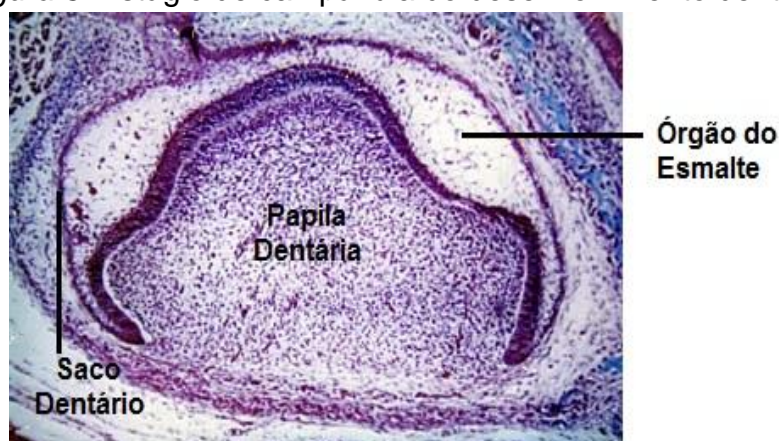
epitelial de Hertwig) e o saco dentário dará origem ao cimento e ao periodonto <sup>[19,33]</sup>. A formação dos últimos germes dentários só estará completa no 12<sup>o</sup> mês de vida <sup>[34]</sup>.

*Figura 2: Estágios do desenvolvimento dental*



*Fonte: [14]*

*Figura 3: Estágio de campânula do desenvolvimento dentário*



*Fonte: [35]*

Sabe-se que os eventos celulares das fases de desenvolvimento do germe dentário (botão, capuz, e campânula) são determinados por informações genéticas, e esta é expressa através de interações celulares <sup>[14]</sup>. Mais de 200 genes foram identificados no desenvolvimento do dente em mamíferos <sup>[36, 37]</sup>. As alterações morfológicas do germe dentário e a formação dos tecidos dentários são guiadas por moléculas mensageiras através de diversas vias de sinalização <sup>[14]</sup>.

Embora esses mecanismos moleculares relacionados ao desenvolvimento normal dos dentes, em humanos, não sejam ainda completamente conhecidos, estudos em outros vertebrados têm mostrado várias moléculas envolvidas na interação epitélio mesênquima <sup>[37]</sup>. Três mecanismos têm sido propostos para a

transmissão indutiva dos sinais na interação dos tecidos durante a organogênese: fatores difusíveis, contato célula-célula, e interação mediada pela matriz extracelular [37, 38].

Dentre essas moléculas podemos citar os fatores de crescimento (EGF, BMPs, FGF, PDGF e HGF), que ao se ligarem à célula receptora específica de membrana desencadeiam determinadas respostas celulares [6]. Exercem seus efeitos biológicos, principalmente, por mecanismos parácrinos (agem sobre células adjacentes) e autócrinos (agem sobre a célula produtora) [39]. Participam ativamente em diversas fases da odontogênese, amelogênese (formação do esmalte), dentinogênese (formação da dentina), tendo assim, uma fundamental importância na formação e mineralização dentária [24].

Uma das suas funções durante a odontogênese é a indução autócrina das células ectomesenquimais da papila dental a se diferenciarem em odontoblastos. Depois por estimulação parácrina, induzem a diferenciação das células epiteliais da parte interna do órgão do esmalte em ameloblastos [34]. Ou seja, o epitélio do órgão do esmalte passa a liberar o EGF para o ectomesênquima, induzindo a diferenciação das células em odontoblastos. Os odontoblastos produzem uma primeira camada de matriz e dentina e após essa produção, há a indução dos ameloblastos, que passam a produzir a matriz do esmalte [6].

A formação do esmalte e da dentina é um processo rítmico, aparecendo no esmalte as linhas de Retzius que marcam as etapas de crescimento do esmalte; e na dentina as estrias de Owen que indicam as etapas de crescimento da dentina [19].

Schour & Massler (1971) [28, 40] postulam que o dente é mais que um órgão mastigatório, suas propriedades peculiares são um valioso indicador biológico que reflete e registra, durante o seu desenvolvimento, as condições metabólicas do animal. Estes registros, diferentes daqueles em ossos não são transitórios, mas sim permanentemente gravados na estrutura do esmalte e dentina, onde não ocorre reabsorção [28], ou seja, qualquer distúrbio na amelogênese e na dentinogênese pode levar a defeitos permanentes no esmalte e na dentina, respectivamente.

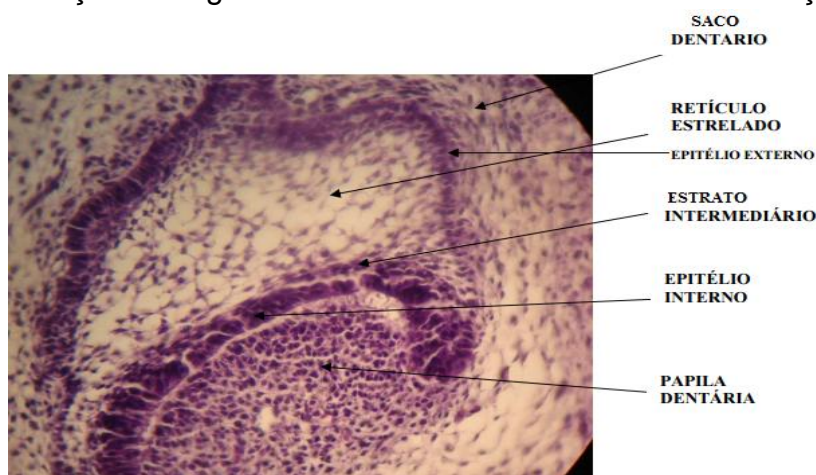
### 3.2.2 **Amelogênese**

É o processo de formação do esmalte. Esse processo é um processo bastante específico. Diferentemente de outros tecidos, o esmalte é de origem

ectodérmica, não se forma em área de alta vascularização e sua matriz orgânica não é o colágeno [32].

Como dito anteriormente, o órgão do esmalte é a estrutura formadora desse tecido. É constituído pelo epitélio externo, epitélio interno, estrato intermediário e retículo estrelado [6], explanados na figura abaixo (*figura 4.*)

*Figura 4:* Estágio de campânula do desenvolvimento dentário, apontando a localização do órgão do esmalte nessa fase e sua constituição.



Fonte: [35]

A nutrição desse órgão ocorre por osmose, inicialmente, a partir da papila dentária (parte do germe formadora da dentina e polpa). Quando a primeira camada de esmalte se forma sobre a primeira camada de dentina a nutrição se modifica e passa a ser feita através do saco dentário (parte do germe formador do cimento e periodonto) [19, 27].

O epitélio externo do órgão do esmalte é formado por uma única camada de células cúbicas. Quando a primeira camada de esmalte se forma sobre a primeira camada de dentina esse epitélio torna-se sinuoso a fim de aumentar a superfície de nutrição que nesse momento é feita a partir do saco dentário [19, 27].

O epitélio interno do órgão do esmalte é formado por uma única camada de células altas, chamadas ameloblastos. Os ameloblastos são as principais células envolvidas na formação do esmalte, secretam a matriz protéica do esmalte, e são células metabolicamente muito ativas e assim, muito sensíveis às alterações metabólicas, que ficam registradas no esmalte, por exemplo: febres altas. Sabe-se, também, que substâncias com afinidade por cálcio (como o antibiótico tetraciclina) são incorporadas ao esmalte e à dentina em formação [27].

O estrato intermediário é um conjunto de células que podem substituir os ameloblastos que venham a se degenerar durante o processo de formação do esmalte e ainda são as células que produzem as fosfatases alcalinas, enzimas possibilitam a calcificação do esmalte <sup>[19]</sup>.

O retículo estrelado além de ligar os epitélios interno e externo do órgão do esmalte ainda secreta um líquido gelatinoso com proteoglicanas que protege o dente em formação <sup>[19]</sup>.

São considerados quatro estágios no desenvolvimento do esmalte <sup>[24]</sup>. Os ameloblastos se modificam continuamente, essas modificações indicam a função que a célula está exercendo em um dado momento <sup>[27]</sup>.

O primeiro é o estágio secretório, se inicia no momento em que há a deposição da primeira matriz de esmalte pelos ameloblastos, que logo se mineraliza em 30%, sobre a camada de dentina pré-formada <sup>[27]</sup>. Após, há a continuação da formação dessa matriz proteica, pouco mineralizada <sup>[27, 41]</sup>. Essa matriz é constituída fundamentalmente por amelogenina, enamelinina e seus produtos de degradação, dentre outras proteínas <sup>[24]</sup>. Nesse estágio são formados pequenos cristais de esmalte, que originam os cilindros ou prismas de esmalte <sup>[41]</sup>. Para organizar a localização dos cristais no prisma existe um prolongamento no ameloblasto, chamado processo de Tomes <sup>[27, 41]</sup>. Nessa fase, componentes mineirais estranhos podem ser adquiridos <sup>[24]</sup>.

O estágio de transição é o segundo, nele os ameloblastos se achatam e começam a formar proteinases, que degradam a amelogenina. À medida que a matriz se aproxima do limite final do esmalte a secreção dela torna-se mais lenta e há por esses dois processos uma perda aparente de material orgânico. Essa matriz começa a ser substituída por água e sais minerais, nessa fase há o crescimento dos cristais de esmalte nas camadas mais profundas do esmalte, e tanto magnésio quanto flúor podem ser incorporados <sup>[24]</sup>.

O terceiro estágio é o de amadurecimento do esmalte, no qual os ameloblastos novamente se modificam e ocorre uma intensa captação de minerais e precipitação das apatitas <sup>[27]</sup>. Para essas precipitações ocorrerem sugere-se que exista um controle da morfologia dos ameloblastos por alterações no pH, ou seja, quando o pH é de 7,2 os minerais (formadores das apatitas) captados do líquido extracelular que chegaram até a matriz do esmalte, se precipitam, não havendo a

entrada de novo líquido com minerais, quando ocorre essa precipitação, prótons são liberados acidificando o meio, em meio ácido a precipitação cessa, nesse momento os ameloblastos se modificam liberando a passagem para novos líquidos com sais minerais advindos do líquido extracelular, até que o pH atinja 6,8, com esse pH, as substâncias tampões do organismo entrariam em ação até o pH atingir 7,2, novamente, o ameloblasto se modificaria outra vez, cessando a entrada de sais e permitindo a precipitação dos cristais de hidroxiapatita. Esse mecanismo ocorreria ao longo de muitos anos, aproximadamente 3 vezes ao dia, até a completa formação do esmalte, ou seja com 96% de minerais. Nessa fase há a completa degradação e remoção da matriz proteica. Os processos de Tomes desaparecem [27, 41].

Entretanto, apesar de haver a degradação da matriz protéica, duas proteínas sintetizadas pelos ameloblastos são produzidas nesse estágio, a amelotina e apina. Ainda não se tem certeza das suas reais funções, mas sabe-se que as duas novas substâncias são codificadas por dois diferentes genes que, de acordo com a sua localização genômica e estrutural, fazem parte de um mesmo grupo de proteínas que secretam e estabilizam íons de  $\text{Ca}^+$  e  $\text{PO}_4^-$  no corpo e/ou guiam a deposição de  $\text{CaPO}_4$  em matrizes extracelulares receptoras [42].

O quarto e último estágio é o do esmalte já maduro. Nesse estágio os cristais são grandes, uniformes e regularizados dentro do tecido. No final do estágio de maturação, as células perdem sua polaridade se transformando em epitélio reduzido do órgão do esmalte, que é perdido quando o dente erupciona [19].

O entendimento da atividade celular ao nível bioquímico não contribui apenas para a compreensão da formação das estruturas dentárias, mas também pode trazer novas perspectivas para a regeneração tecidual e para a prevenção e diagnóstico de distúrbios, como a má formação dentária e outras doenças [42].

### 3.2.3 **Dentinogênese**

É o processo de formação e mineralização da dentina [33]. Assim como no esmalte esse processo é rítmico e se faz segmento por segmento, o que marca as etapas de formação e crescimento da dentina [19].

Durante o desenvolvimento dentário, interações indutivas epiteliais e mesênquimais levam as células pulpares do ectomesênquima a se diferenciarem em

odontoblastos (células semelhantes aos osteoblastos) que respondem pela produção de dentina<sup>[24]</sup>.

A dentina é uma matriz orgânica formada majoritariamente por colágeno tipo I, III, esse colágeno permanece mesmo após a mineralização. Sempre terá uma matriz orgânica junto aos odontoblastos.

Essas células surgem entre 17 a 18 semanas de vida intra-uterina e encontram-se presentes até o fim da vida do indivíduo, exceto se forem mortas antes por bactérias, agressões químicas ou, indiretamente, de alguma outra forma<sup>[25]</sup>. Os odontoblastos são produtores de proteínas e glicosaminoglicanas (substância fundamental), que formam a matriz onde deverá ocorrer a mineralização<sup>[19]</sup>.

Cada vez mais o conceito de que a dentina é o produto maduro da diferenciação e manutenção celular da polpa está sendo difundido<sup>[24]</sup>. Sabe-se que as duas estruturas são derivadas da papila dental do órgão do esmalte e também são da mesma origem embriológica derivadas do mesênquima<sup>[30]</sup>.

A primeira camada de dentina secretada pelos odontoblastos é uma matriz orgânica não mineralizada, chamada pré dentina<sup>[19, 30]</sup>. Depois que várias camadas de pré-dentina foram depositadas, começa a mineralização das camadas mais próximas a junção dentina-esmalte. Forma-se então uma faixa de matriz dentinária e os odontoblastos elaboram fosfatase alcalina, dando ao meio condições ótimas de pH para que se processe a mineralização da matriz. Nesse ínterim, íons minerais transportados pelos capilares sangüíneos da papila depositam-se na matriz orgânica como sais, sob a forma de cristais de hidroxiapatita, sobre as superfícies das fibrilas colágenas e na substância fundamental. Posteriormente os cristais são depositados dentro das próprias fibrilas. Embora haja crescimento dos cristais enquanto a dentina amadurece, o tamanho final dos cristais permanece muito pequeno<sup>[25]</sup>.

### **3.3 Fatores que Interferem na Formação e Mineralização Dentária**

Existem muitos fatores que podem estar associados a não formação ou a má formação do elemento dental, dentre eles podemos citar a genética, expressão de mudanças evolutivas na dentição, condições sistêmicas, como raquitismo, sífilis, severos distúrbios intra-uterinos, inflamações localizadas ou infecções, displasia congênita e fatores ambientais, como irradiações, uso abusivo de álcool e drogas<sup>[43]</sup>.



Os distúrbios da odontogênese, ocorridos desde o período intrauterino até a infância, podem se apresentar de diversas formas, de acordo com a fase em que se processam. O correto diagnóstico destas anormalidades se reveste de grande importância para garantir o êxito de tratamentos endodônticos, ortodônticos, oclusais, cirúrgicos, estéticos, dentre outros <sup>[44]</sup>.

### 3.3.1 *Dietéticos*

Por um lado, a nutrição relaciona-se com os dentes de modo sistêmico, isto é, agindo na sua formação e crescimento e determinando, posteriormente, que tipo de resposta eles terão, se mais ou menos resistentes, à ação da placa bacteriana. Por outro lado, o alimento relaciona-se com os dentes de modo tópico, isto é, pelo seu contato com os dentes, influenciando, de acordo com sua composição química e característica física, a formação e o metabolismo da placa bacteriana <sup>[20, 21]</sup>.

Os nutrientes são responsáveis pela síntese de novos compostos vitais para a estruturação das funções celulares. Dessa forma, a nutrição influencia também a formação do órgão dental. Os principais nutrientes envolvidos com a odontogênese são o cálcio, fosfato, as vitaminas A, C, D e o balanço protéico-energético. A vitamina A é responsável pela manutenção da integridade dos tecidos de origem ectodérmica. A vitamina D participa da homeostase do cálcio e do fósforo, interferindo dessa forma na calcificação dentária. A vitamina C é essencial para a função e manutenção da substância intercelular e do colágeno. O fósforo dá maior solidez à estrutura dentária e os lipídios e carboidratos garantem a energia necessária para o processo de odontogênese. A restrição desses componentes pode levar a hipoplasias dentárias, além de distúrbios sistêmicos. Adequações na dieta da gestante e durante o primeiro ano de vida da criança são necessárias para prevenir tais defeitos <sup>[45]</sup>.

Uma diminuição dos mineirais essenciais para a formação dos cristais de hidroxiapatita, como cálcio ou fósforo poderia causar hipocalcificação nos tecidos dentários. A carência de magnésio acarreta a atrofia dos odontoblastos e falhas na formação da dentina. O flúor previne a formação da cárie, sem ele haveria uma propensão maior à doença <sup>[19]</sup>. A ausência de alguns minerais afeta a interação celular e dificulta a formação dos tecidos <sup>[27]</sup>.

Os aminoácidos que formam as proteínas do esmalte são oriundos da dieta ou de outros tecidos, se houver a falta deles, também podem ocorrer falhas na comunicação celular em diversas fases da odontogênese. A deficiência de proteinases pode levar a não degradação da matriz orgânica na fase de maturação do esmalte <sup>[27]</sup>.

A avitaminose A causa a atrofia dos ameloblastos provocando deformações dentárias. A avitaminose B<sub>6</sub> pode determinar matrizes escassas de esmalte e de dentina. Na C os odontoblastos são substituídos por fibroblastos, formando uma matriz dentinária escassa e deficiente. Com a falta da vitamina D aparece o raquitismo dental, em contrapartida o seu excesso provoca uma resposta cálcio traumática, que consiste na hipercalcificação em algumas partes da dentina e não calcificação em outras <sup>[19]</sup>.

### 3.3.2 **Hormonais**

Alguns fatores metabólicos participam da fisiologia do dente e dentre eles podemos citar o papel dos hormônios. Os fatores endócrinos interferem na taxa de desenvolvimento e na velocidade de erupção dentária, atuando sobre todas as estruturas do dente como fazem em outras células ou tecidos do organismo <sup>[21]</sup>.

O paratormônio regula o metabolismo do cálcio agindo de modo sinérgico com a vitamina D e tem alta importância no processo de calcificação dos dentes. No hipoparatiroidismo ocorre uma hipocalcificação das matrizes dentárias determinando o raquitismo dental, isto é, a pré-dentina fica alargada e cheia de inclusões vasculares, o que acarreta uma calcificação defeituosa. No hiperparatiroidismo há uma diminuição da taxa de cálcio nas matrizes dentárias, determinando um efeito cálcio traumático na dentina, produzindo áreas de dentina calcificada e áreas não calcificadas <sup>[19]</sup>. Porém, o efeito do paratormônio (PTH) nos dentes ainda é contraditório. Quando ocorrem alterações nas concentrações deste hormônio no organismo não se observam alterações histológicas significativas na estrutura dentária dura, mesmo na extirpação das glândulas paratireóides, mas há possibilidade de mudança no conteúdo e distribuição dos seus elementos químicos <sup>[21]</sup>. O esmalte após certo tempo pode apresentar desorganizações na sua matriz e nos ameloblastos, mostrando-se com áreas opacas. Na dentina observam-se manifestações as respostas cálcio traumáticas, ditas anteriormente <sup>[21]</sup>. Tanto em

animais como em humanos observa-se que a administração de PTH reverte parcialmente o quadro cálcio traumático criado com a sua escassez, chegando-se a conclusão que o efeito deste hormônio está sobre a matriz orgânica da dentina e do esmalte e não sobre o fornecimento de íons <sup>[21]</sup>.

Outro hormônio que participa da formação dos dentes é o tireoidiano. Em humanos sua menor secreção (hipotireoidismo) apresenta retardo no crescimento do esqueleto e o arco dentário é reduzido. A erupção é nitidamente retardada e a troca dos dentes decíduos pelos permanentes também é tardia <sup>[21]</sup>. Além disso, os dentes são mal formados, mal calcificados, feios e muito sujeitos a cárie dental. O contrário acontece no hipertireoidismo, no qual os dentes são bonitos, bem formados e pouco sujeitos a cárie <sup>[19]</sup>.

O hormônio de crescimento também interfere como o tireoidiano, na erupção dos dentes e na troca dos decíduos pelos permanentes. Mais ainda, seu desregular pode causar, má oclusões, pois afeta o desenvolvimento da mandíbula e da maxila<sup>[21]</sup>. Em ratos a hipofisectomia motiva a atrofia do órgão do esmalte e o degenera, podendo este faltar completamente. A dentina é produzida em quantidade excessiva, invadindo a câmara pulpar, embora sua estrutura se conserve normal. Na hipoatividade da hipófise ocorre o nanismo dental <sup>[19]</sup>. Na hiperatividade da hipófise, depois da puberdade, determina-se o prognatismo da mandíbula, a qual é um dos poucos ossos capazes de crescer após a puberdade. Há crescimento excessivo do processo alveolar, aumento do tamanho do arco dental e erupção rápida dos dentes<sup>[21]</sup>, e quando essa função é alterada durante a formação do dente causa o gigantismo dental <sup>[19]</sup>.

### 3.3.3 **Genéticos**

Os dentes são estruturas homólogas que permitem a localização e quantificação dos efeitos de mutações genéticas específicas. No entanto, é possível também determinar a fase da odontogênese afetada por essa condição. Esse aspecto faz do desenvolvimento do dente um importante sistema para entendermos um intrincado mecanismo molecular que regula o desenvolvimento, abastecendo uma ligação entre o desenvolvimento e a genética evolucionária <sup>[36]</sup>.

Conforme supracitado, mais de 200 genes foram identificados no desenvolvimento do dente em mamíferos <sup>[36]</sup>.

A posição dos dentes, as harmonizações entre os arcos da maxila e da mandíbula com o crânio devem estar idealizadas geneticamente, mas fatores ambientais como hábitos, posição e mudança do padrão de crescimento modificam essa relação que, geneticamente, poderia estar bem estabelecida <sup>[43]</sup>.

A odontogênese pode, além de ter interferência de fatores genéticos, sofrer interferentes ambientais, como por exemplo, o consumo abusivo de álcool <sup>[43]</sup>.

### **3.4 Efeitos da exposição materna ao etanol na gestação e lactação**

#### **3.4.1 *Efeitos Gerais Relacionados ao Álcool e Síndrome Alcoólica Fetal***

A ingestão de álcool durante a gestação e lactação está associada a um amplo espectro de modificações na formação e desenvolvimento do indivíduo.

Algumas das principais alterações em crianças submetidas ao etanol durante a gestação incluem <sup>[9]</sup>.

- Disfunção neurológica;
- Retardo mental;
- Microcefalia;
- Retardo do crescimento pré e pós-natal;
- Alterações craniofaciais e orodentárias;
- Problemas cardíacos;
- Problemas de memória;
- Dificuldades de linguagem e fala;
- Falta de atenção;
- Tempo ação reação diminuídos;
- Defeitos de visão;
- Dificuldade motora fina;
- Perda auditiva, dentre outras.

O álcool ingerido pela gestante atravessa a barreira placentária, o que faz com que o feto esteja exposto às mesmas concentrações do sangue materno. Porém, a exposição fetal é maior, devido ao metabolismo e eliminação serem mais lentos, fazendo com que o líquido amniótico permaneça impregnado de álcool não modificado (etanol) e acetaldeído (metabólito do etanol). O etanol induz a formação de radicais livres de oxigênio que são capazes de danificar proteínas e lipídeos

celulares, aumentando a apoptose e prejudicando a organogênese. Também inibe a síntese de ácido retinóico, substância reguladora do desenvolvimento embrionário. Tanto o etanol, quanto o acetaldeído, têm efeitos diretos sobre vários fatores de crescimento celular, inibindo a proliferação de certos tecidos <sup>[46]</sup>.

Rawat (1976) <sup>[47]</sup> demonstrou que o álcool atua inibindo a síntese protéica e também verificou os efeitos do álcool ingerido durante a gestação na atividade e nos níveis de ATP no coração, cérebro e fígado. Em seus resultados observou uma redução da atividade da enzima ATP sintetase, quando comparado com os animais controles <sup>[28, 47]</sup>.

Diversos experimentos com modelos animais comprovaram alterações neurológicas da prole como consequência do consumo de etanol pela mãe durante a gestação <sup>[28]</sup>.

As alterações neurológicas são de especial preocupação, pois podem limitar o indivíduo em sua vida adulta. Clarren e Smith <sup>[8]</sup> afirmam que o córtex cerebral é especialmente sensível à exposição ao álcool durante a gestação. Um experimento realizado por Zhou *et. al.* <sup>[48, 6]</sup>, demonstrou que os cérebros de ratos tratados com etanol apresentaram menor quantidade de neurônios, com atraso na migração e menor diferenciação dessas células, causando uma diminuição na quantidade de serotonina <sup>[6, 48]</sup>.

Crianças expostas ao álcool no período pré- natal mostram resultados piores nas escalas de desenvolvimento neuropsicomotor no primeiro ano de vida <sup>[48]</sup>.

Uma gama de estudos avaliaram alterações nos filhotes de mães alcoolistas na massa corporal, tamanho, morfologia, metabolismo, desenvolvimento, dentre outras. Em um deles sugere-se que a velocidade de crescimento está diminuída até os três anos de vida nos expostos <sup>[19]</sup>.

Ludena *et. al.* <sup>[19]</sup> analisou que ratos tratados com álcool durante a gestação e a lactação tiveram redução de massa e de tamanho e atraso na maturidade óssea.

Outros estudos concluíram redução da massa da mãe rata tratada com álcool e do filhote e redução no comprimento e na largura do crânio (palato e maxila) e da mandíbula nos filhotes com 100 dias de vida <sup>[17, 24]</sup>. Estes resultados foram devidos a um desequilíbrio hormonal e/ou nutricional, juntamente com uma alteração na síntese protéica dos osteoblastos e/ou na proliferação celular do prosencéfalo.

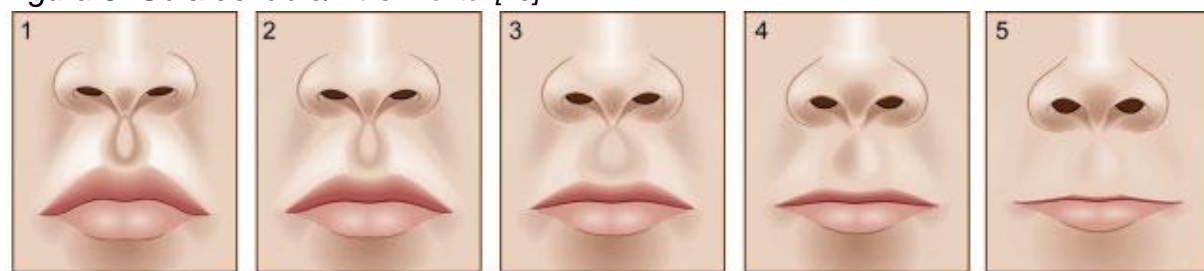
Filhos de mães que usaram álcool durante a gravidez nascem com peso (massa corporal), comprimento encefálico menor [26]. Além disto, foi observado também uma diminuição no ganho de peso materno durante a gestação e no peso dos filhotes ao nascimento [19].

Uma pesquisa longitudinal que acompanhou 500 crianças filhas de mães etilistas do nascimento até os 14 anos de idade constatou que os efeitos teratogênicos do álcool refletem-se no peso, comprimento e perímetro cefálico destas crianças e que os dados antropométricos podem ser sinalizadores dos efeitos neuro comportamentais relacionados à exposição pré-natal ao etanol [50].

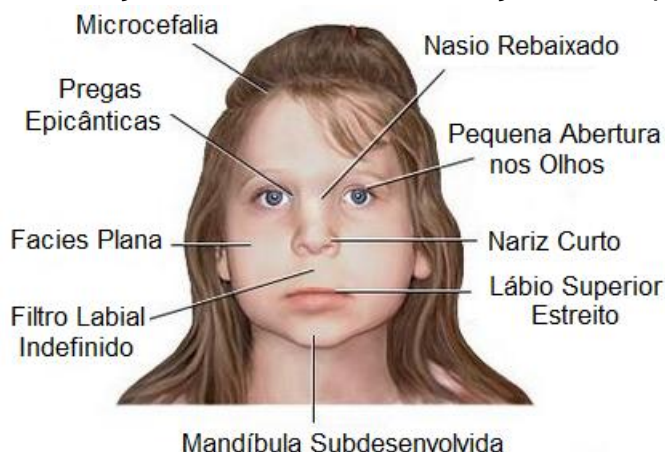
### 3.4.2 **Efeitos Craniofaciais, Oraís e Dentários**

Conforme dito anteriormente, cerca de 80% das alterações observadas em indivíduos expostos ao álcool são craniofaciais ou orodentárias [7]. Dentre as quais, uma das mais notórias é o estreitamento do lábio superior e a hipoplasia do filtro labial, referentes aos graus 4 e 5 no guia de lábio/filtro [49], apresentado na *Figura 5*. Outras alterações craniofaciais notórias são: fissura palpebral curta, porção média da face pequena e plana, hipoplasia maxilar, nariz pequeno e arrebicado, má formação das orelhas e retrognatismo na infância com evolução para pequeno prognatismo na adolescência [11]. A *Figura 6* ilustra alguma dessas alterações.

*Figura 5:* Guia de lábio/filtro. Fonte: [49]



*Figura 6: Alterações craniofaciais de criança afetada por SAF*



Fonte: [49]

Um estudo revelou, através de análises cefalométricas, radiografias periapicais e exames clínicos das cavidades orais de pacientes que apresentaram a SAF, base do crânio extremamente inclinada, desenvolvimento incompleto da região média da face com deficiência no conteúdo ósseo (particularmente a maxila, espinha, osso e abertura nasais) e incisivos superiores inclinados para compensar a retrusão maxilar [37].

Outro evidenciou, em 22 pacientes acometidos pela síndrome, anomalias dentofaciais e também na articulação têmpora mandibular (ATM). Desse total, 12 deles apresentaram fenda palatina, sendo que 4 pacientes tinham fenda palatina associada com fenda labial. Já outros 15, mostraram alterações dentais, tais como, mordida cruzada, mordida aberta, agenesia dental, dentes girovertidos, diastema, hipoplasia, hipodontia do esmalte, anadontia e retardo na erupção da dentição permanente. Já a disfunção da ATM foi significativa em 4 pacientes [28].

Sabe-se que muitas das estruturas afetadas pela síndrome (ossos faciais e cartilagens, desenvolvimento dos maxilares, desenvolvimento dentário, sistema cardíaco, dentre outros) envolvem em sua formação células e tecidos da crista neural, dando origem à hipótese de que o álcool deve alterá-las, gerando anomalias [43, 6]. Tem se observado que o álcool possui um efeito citotóxico direto sobre as células de origem ectodérmica e mesodérmica [43]. Sendo a primeira origina o esmalte dentário e a segunda a dentina, a polpa e o cimento [19].

Sant'ana estudou a atuação do etanol sobre o fator de crescimento epidérmico (EGF) em molares de ratos. O EGF é quem estimula o desenvolvimento maxilofacial e a síntese de DNA, também afeta outras funções celulares tais como a

síntese de macromoléculas, remodelação óssea e diferenciação de células epiteliais e mesênquimais derivadas do germe dental. Por isso, foi sugerida a hipótese deste fator de crescimento poder estar relacionado ao atraso de crescimento maxilofacial, hipodontia, anomalias de esmalte e retardo na erupção dos dentes de humanos e ratos, características da SAF. [6, 28]. Outro estudo analisando o efeito do álcool sobre o fator de crescimento epidermal (EGF) na odontogênese de camundongos, descreveu que a imunexpressão desse fator, observada na cúspide média do 1º molar inferior era forte e homogênea no grupo controle, porém fraca e heterogênea no tratado. Também verificaram que os germes dentários dos animais tratados eram morfométricamente menores [43].

A ingestão de uma solução de etanol a 20% antes e durante a gestação causou um atraso na diferenciação celular do germe dental e na calcificação da matriz de dentina e esmalte em molares de ratos [37]. Retardamento da erupção dentária foi mostrado em filhotes de macacos, cujas mães foram expostas a droga. [28]. Na odontogênese sob efeito de álcool, aparecem alterações celulares na camada basal do epitélio do germe dental, na fase de botão, e no epitélio interno do órgão do esmalte [7]. O germe dentário em fase de botão apresentou a camada basal constituída por células em diferentes alturas, sugerindo a presença de mais de uma camada de células nesta região. Esta alteração também foi encontrada nas células dos epitélios do órgão dentário em fase de capuz, sendo mais pronunciada no epitélio interno [28] como a diminuição no tamanho do germe dentário [13]. Guerrero (1990) [52] verificou que a ingestão de álcool antes e durante a gestação, causava redução na proliferação celular do germe dentário em fase de botão e retardo na calcificação da matriz dentinária.

Análises clínicas em crianças com SAF mostraram dentes menores e um esmalte mais fraco [49]. Atraso na calcificação e erupção dentária em camundongos foram relatados na prole exposta ao etanol no útero [49]. Constantemente estudos tem demonstrado alterações significativas no tamanho e morfologia do germe dentário, Römert & Matthiessen (1988) [53], observaram alterações na ultraestrutura dos ameloblastos no estágio secretor dos germes dentários de fetos de mini porcos. Estas alterações refletiram uma função secretora anormal dos ameloblastos.



Outros estudos, em ratos, demonstraram o retardo na erupção e no crescimento pós-eruptivo dos dentes incisivos. O retardo na erupção dentária também foi observado no 1o molar inferior de camundongos<sup>[13]</sup>.

Alterações também foram registradas na expressão de algumas glicoproteínas<sup>[43]</sup>. Tem sido proposto que essas glicoproteínas desempenhem um papel fundamental durante o desenvolvimento dentário, principalmente no padrão morfológico e na secreção da matriz. O desenvolvimento dentário envolve diferentes tipos de silalizações e ligações O glicosídicas que estão relacionadas à regulação celular e interações celulares. Um estudo de 2005 sugere que o consumo de etanol da gravidez altera o padrão de silalização durante a morfogênese dentária de ratos. Isso levaria a mudanças no tamanho dental, na diferenciação celular e causaria mineralização e erupção retardada<sup>[51]</sup>.

Muitas características físicas da síndrome tornam-se menos proeminentes na maturidade óssea, porém, algumas persistem (anomalias oculares, fissuras palpebrais curtas, anormalidades no filtro labial, dentre outras) acarretando dificuldades para os que são acometidos<sup>[43]</sup>.

Considerando-se a relevância do tema para a odontologia, este estudo propõe-se a investigar os efeitos da exposição materna ao etanol durante a gestação e lactação na formação e mineralização dentária em ratos. Os resultados deste estudo poderão auxiliar no melhor entendimento das consequências do uso abusivo do etanol pelas mães para a prole.

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 Animais**

Ratas linhagem Wistar fêmeas prenhas foram obtidas do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas e submetidos a um ciclo claro/escuro (12/12 horas), em sala climatizada com temperatura controlada, ração e água à vontade. Todos os animais foram monitorados e mantidos conforme as recomendações do Conselho de Medicina Veterinária (CMV) e Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), protocolo CEUA/UFSC#PP00854. Os animais foram randomizados em dois grupos: controle e tratado. O grupo controle recebeu água e ração ad libitum durante todo o período do experimento. Já o grupo tratado recebeu etanol diluído na água de beber e ração ad libitum durante todo o experimento. As fêmeas grávidas foram colocadas em caixas individuais. O dia do parto foi designado como dia 1 da lactação, e o dia 21, o dia final da lactação. Durante o período de amamentação, os filhotes tiveram livre acesso ao leite materno.

### **4.2 Exposição materna ao etanol:**

O etanol foi administrado na água de bebera partir do 5º dia de gestação. O álcool introduzido durante a gestação e a amamentação, começou com uma dose baixa diluído em água e ao longo dos dias a concentração do álcool foi aumentada. A dose começou com 2,5% de etanol (v/v), ad libitum, durante dois dias, 5% de etanol durante quatro dias, 10% durante quatro dias, 15% de etanol durante seis dias e posteriormente as ratas passaram a receber 20% de etanol até os filhotes completarem 21 dias de idade, para assim caracterizar um modelo de exposição crônica durante a gestação e o aleitamento. Durante a gestação e lactação, as ratas permaneceram em caixas separadas individualmente e receberam ração ad libitum e etanol no grupo tratado ou água no grupo controle como única fonte de líquido. A prole, portanto, também foi exposta ao etanol durante esse período.

A prole foi utilizada quando completou 60 ou 90 dias de idade, não fazendo distinção entre os sexos. No dia do experimento os animais foram pesados e eutanasiados com mistura de cetamina (90 mg/kg) e xilasina (15mg/Kg), via intraperitoneal seguida de decapitação. Posteriormente, houve a dissecação do dente

incisivo central superior e do primeiro molar superior, extraíndo a polpa dos dentes e revezando a dissecação entre lado esquerdo e lado direito. A polpa foi rapidamente imersa em tampão HBSS.

Após a dissecação dos dentes, foram realizadas as radiografias dos tecidos em aparelho de raios-X de feixe cônico, colocando o tecido de um tratado e o mesmo tecido de um controle em um filme oclusal. As medidas de tamanho foram realizadas com um paquímetro digital e analisadas por odontólogos e técnicos, todos especialistas em radiologia, do Instituto Federal de Santa Catarina (IFSC).

Após, as massas dos dentes foram determinadas e, então, os mesmos foram desmineralizados em HCl 50% por dois dias, antes de se realizarem as determinações bioquímicas das concentrações de  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Mg}^{++}$ .

#### **4.3 Dosagem da Concentração de Cálcio nas Estruturas Mineralizadas**

Após desmineralizados em HCl 50% por dois dias, as amostras foram centrifugadas por 16 minutos em 12.000 rotações por minuto, o sobrenadante de cada amostra foi utilizado para determinação da concentração de cálcio na estrutura dentária. O método baseia-se na reação entre cálcio presente na amostra que reage com a o-cresolftaleína complexona em meio alcalino, formando um complexo de cor violeta que é quantificado fotometricamente em 570 nm. A hidroxiquinoleína presente no meio reacional evita a interferência do magnésio.

#### **4.4 Dosagem de Magnésio das Estruturas Mineralizadas**

Após desmineralizados em HCl 50% por dois dias, as amostras foram centrifugadas por 16 minutos em 12.000 rotações por minuto, o sobrenadante de cada amostra foi utilizado para determinação da concentração de magnésio nas estruturas dentárias. O método baseia-se na reação dos íons magnésio reagem, em pH alcalino, com o magon sulfonado (azul) formando um complexo colorido (rosa). A absorvância do complexo medida em 505 nm é diretamente proporcional à concentração de magnésio na amostra analisada. A coloração final é uma mistura das cores azul e rosa.

#### 4.5 Influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ na Polpa dos dentes incisivos superiores

O influxo de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  foi determinado na polpa dos dentes incisivos de ratos de 60 e 90 dias de idade expostos ou não ao etanol na gestação e lactação. As polpas foram pré-incubadas por 15 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ , em solução salina balanceada de Hanks (HBSS =  $\text{CaCl}_2$  1,29 mM,  $\text{NaCl}$  136,9 mM,  $\text{KCl}$  5,36 mM,  $\text{MgSO}_4$  0,65 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . Após, o meio foi trocado por HBSS fresco com  $0,1 \mu\text{Ci/mL } ^{45}\text{Ca}^{2+}$  e o tecido incubado durante 5, 15, 30 ou 60 minutos. Posteriormente, o  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  extracelular foi totalmente lavado com uma solução de cloreto de lantânio ( $\text{NaCl}$  127,5 mM,  $\text{KCl}$  4,6 mM,  $\text{MgSO}_4$  1,2 mM, HEPES 10 mM, Glicose 11 mM,  $\text{LaCl}_3$  10 mM, pH 7) interrompendo o fluxo de cálcio na preparação. Após 10 min, a solução de cloreto de lantânio foi removida e 300  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaOH}$  0,5 M foram adicionados a cada amostra e determinada a concentração de proteínas em cada amostra. Alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  deste homogeneizado foram colocadas em líquido de cintilação para a determinação da radioatividade, que foi realizada em espectrômetro de cintilação líquida (Modelo LS 6500, Multi-Purpose Scintillation Counter-Beckman Coulter, Boston, USA). Os resultados foram expressos como  $\text{pmol } ^{45}\text{Ca}^{2+}/\mu\text{g}$  de proteína (ZAMONER et al., 2007).

#### 4.6 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M., conforme número de amostras. As comparações estatísticas foram realizadas através do teste "t" Student com correção de Welch, pelo programa INSTAT versão 3.02, e confirmadas pelo programa GraphPadPrism<sup>TM</sup> 5.0. As diferenças encontradas são consideradas estatisticamente significativas para um "p" igual ou menor que 0,05.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Efeito da Exposição Materna ao Etanol na Massa Corporal da Prole aos 60 e 90 Dias de Idade

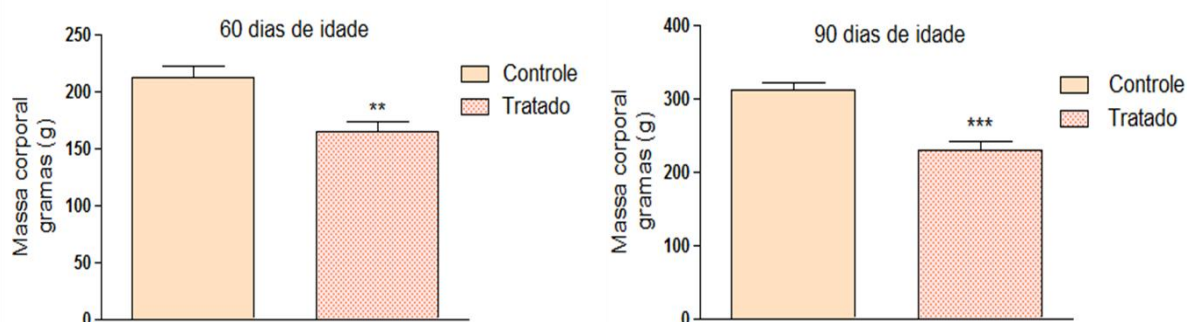
Quando completaram 60 dias de idade os animais controles e expostos ao etanol durante a gestação e lactação foram pesados em uma balança eletrônica de precisão e suas massas corpóreas em gramas (g) foram devidamente anotadas (N=12 em cada grupo). O mesmo procedimento foi realizado com os animais de 90 dias de idade (N=8 em cada grupo). Os resultados mostraram que a exposição materna ao etanol induziu uma diminuição na massa corporal da prole em ambas as idades estudadas, conforme demonstrado na *Tabela 2* e nos *Gráficos 1*.

*Tabela 2:* Efeito da exposição materna ao etanol na massa corporal da prole aos 60 e 90 dias de idade.

Grupo	Idade			
	60 dias		90 dias	
	Média (g)	EPM	Média (g)	EPM
Controle	212,18	± 34,60	310,37	± 30,54
Tratado	164,00	± 9,51**	229,50	± 34,14***

Os resultados foram expressos como a média  $\pm$ E.P.M. Análise estatística: teste *t* de Student com correção de Welch. Significativo em relação ao grupo controle: \*\* $p < 0,001$  (N=12);  $p^{***} = 0,0001$  (N=8).

*Gráfico 1* e *Gráfico 2:* Efeito da exposição materna ao etanol na massa corporal da prole aos 60 e 90 dias de idade.



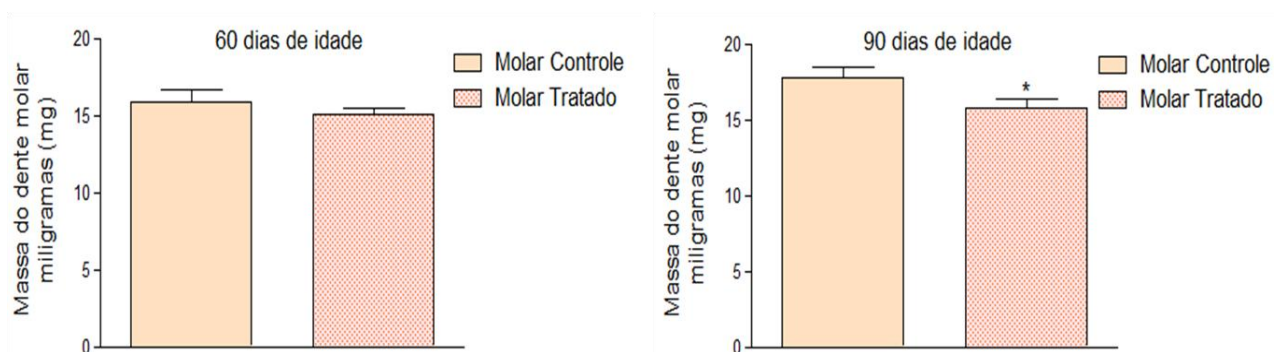
Os resultados foram expressos como a média  $\pm$ E.P.M. Análise estatística:

teste *t* de Student com correção de Welch. Significativo em relação ao grupo controle: \*\* $p < 0,001$  (N=12);  $p^{***} = 0,0001$  (N=8).

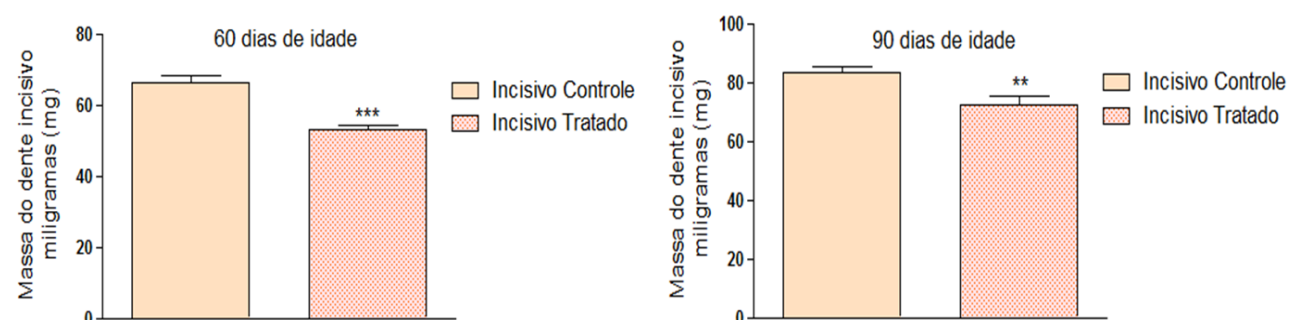
## 5.2 Consequências da Exposição Materna ao Etanol Durante a Gestação e o Aleitamento na Massa em gramas (g) dos Dentes Incisivos e Molares

Conforme descrito na metodologia, após a dissecação dos dentes incisivos superiores e primeiros molares superiores, suas respectivas polpas foram retiradas, os dentes, sem as polpas, foram radiografados e pesados em balança eletrônica de precisão. As massas dos dentes em gramas (g) foram devidamente anotadas. Esses procedimentos foram realizados tanto nos animais de 60 dias (n=24, 12 controles e 12 tratados), quanto nos de 90 dias de idade (n=24, 16 controles e 8 tratados). Os resultados evidenciaram que a exposição materna ao etanol acarretou uma diminuição na massa dos dentes incisivos superiores tanto em animais de 60 quando de 90 dias de idade; entretanto, observou-se diminuição significativa na massa dos dentes molares apenas em ratos tratados de 90 dias de idade. Os resultados obtidos estão apresentados nos *Gráficos 3, 4, 5 e 6*.

*Gráfico 3 e Gráfico 4:* Massa em gramas dos dentes molares de ratos de 60 e 90 dias de idade, expostos ao etanol durante a gestação e lactação.



*Gráfico 5 e Gráfico 6:* Massa em gramas dos dentes incisivos de ratos de 60 e 90 dias de idade, expostos ao etanol durante a gestação e lactação.

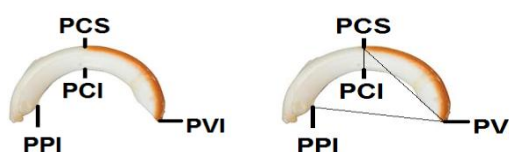


Os resultados foram expressos como a média  $\pm$ E.P.M. Análise estatística: teste t de Student com correção de Welch. Significativo nos incisivos em relação ao grupo controle de 60 dias e 90 dias: \*\*\* $p < 0,0001$  (N=12);  $p^{**} = 0,001$  (N=8), respectivamente, e nos molares em relação ao grupo controle de 90 dias:  $p^{*} = 0,05$

### 5.3 Consequências da Exposição Materna ao Etanol no Crescimento dos Dentes Incisivos da Prole

Para determinar os efeitos da exposição materna ao etanol no crescimento e formação dentária, foram realizadas medidas das imagens radiográficas do dente incisivo central de animais controles e tratados. Inicialmente estabeleceram-se quatro pontos anatômicos a partir dos quais as medidas seriam realizadas: ponto vestibular do incisivo (PVI), ponto palatal do incisivo (PPI), ponto de curvatura inferior (PCI) e ponto de curvatura superior (PCS). Entre os pontos PVI-PPI, PVI-PCS e PCS-PCI foram traçadas linhas retas, a distância entre estes pontos foi medida com paquímetro digital e os resultados foram expressos em milímetros (mm). A *Figura 7* apresenta a representação esquemática dos pontos anatômicos com retas para obtenção das medidas dos dentes incisivos centrais.

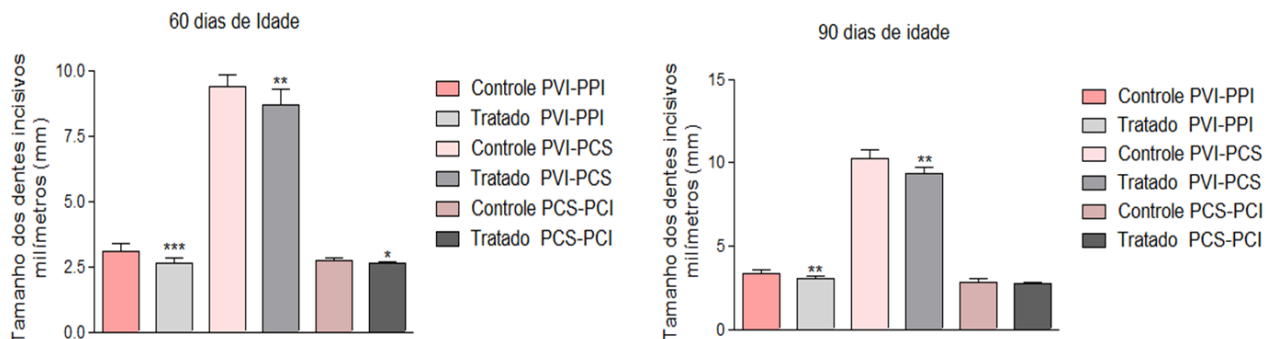
*Figura 7:* Representação esquemática dos pontos anatômicos, bem como dos pontos anatômicos com retas para obtenção das medidas em milímetros.



Fonte: do Autor.

As medidas do dente incisivo central foram realizadas em dentes extraídos de animais de 60 e 90 dias de idade, controles e expostos ao etanol durante a gestação e o aleitamento. Os resultados demonstraram diminuição no tamanho do incisivo central tanto de ratos de 60 quanto de 90 dias de idade expostos ao etanol durante a gestação e lactação. Observou-se diminuição da distância PVI-PPI e PVI-PCS em ambas as idades. Entretanto, apenas nos animais de 60 dias de idade houve diminuição da distância PCS-PCI (*Gráficos 7 e 8*).

Gráfico 7 e Gráfico 8: Efeito da exposição materna ao etanol no tamanho do dente incisivo central de ratos de 60 e 90 dias de idade.



Os resultados foram expressos como a média  $\pm$ E.P.M. Análise estatística: teste t de Student com correção de Welch. Significativo em relação ao grupo controle: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  (N=12 para animais de 60 dias de idade e N=8 para animais de 90 dias de idade).

#### 5.4 Consequências da Exposição Materna ao Etanol na Concentração de Cálcio das Estruturas Mineralizadas de Incisivos Centrais e Primeiros Molares Superiores de Ratos

Sendo o cálcio um dos minerais mais importantes da constituição óssea e dentária, foi determinada a concentração deste íon contida em esmalte e dentina de dentes incisivos e molares de ratos de 60 e 90 dias de idade expostos ou não ao etanol durante a gestação e o aleitamento. Os resultados mostraram que a exposição materna ao etanol acarreta em aumento nas concentrações de cálcio nos dentes incisivos de ratos de 60 e 90 dias de idade em relação ao grupo controle. Entretanto, observa-se acúmulo de cálcio nos dentes molares de animais expostos ao etanol apenas em ratos de 90 dias de idade (Gráficos 9, 10, 11 e 12).

Gráfico 9 e Gráfico 10: Efeito da exposição materna ao etanol durante a gestação e o aleitamento na concentração de cálcio nos dentes molares de ratos de 60 e 90 dias de idade.



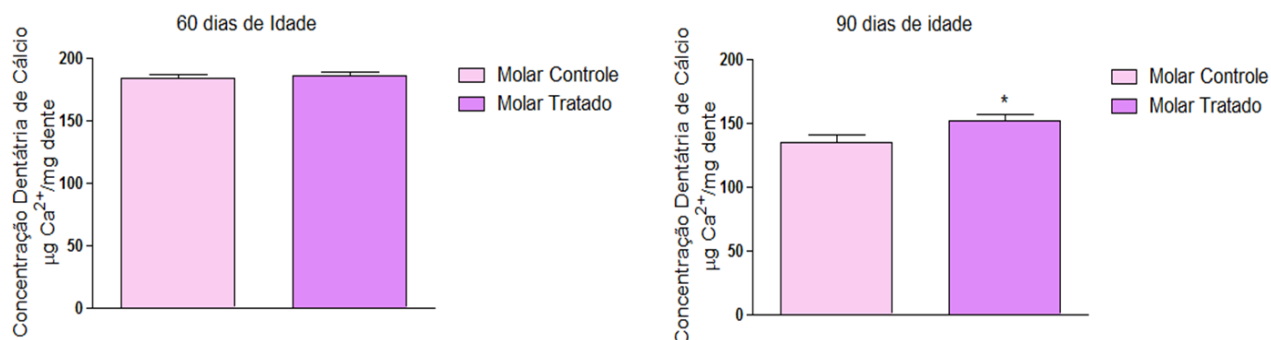
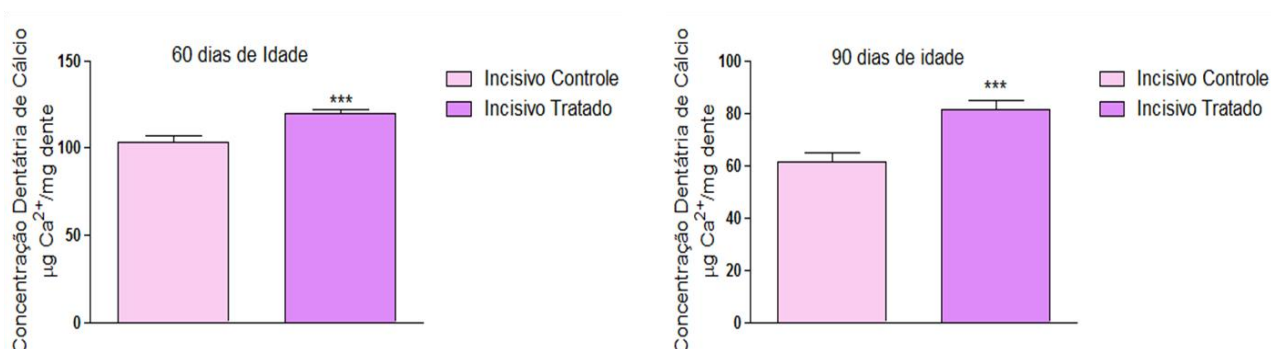


Gráfico 11 e Gráfico 12: Efeito da exposição materna ao etanol durante a gestação e o aleitamento na concentração de cálcio nos dentes incisivos de ratos de 60 e 90 dias de idade.



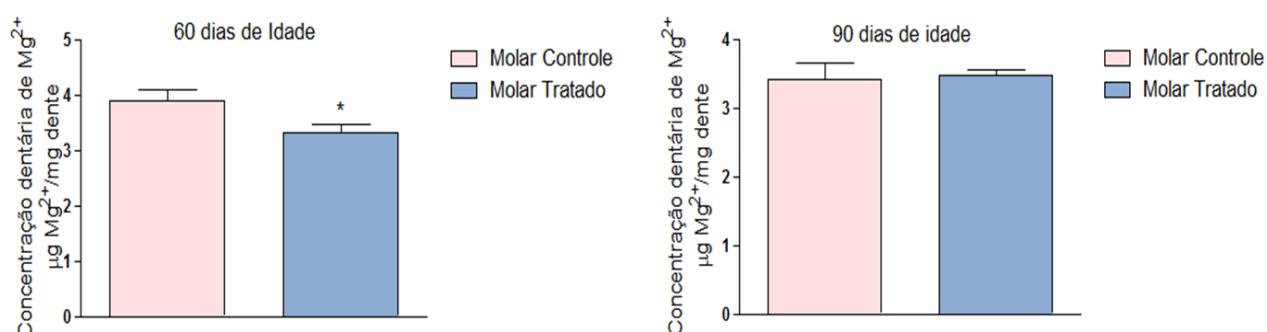
Os resultados foram expressos em µg Ca<sup>2+</sup>/ mg dente como a média ± E.P.M. Análise estatística: teste t de Student com correção de Welch. Significativo em relação ao grupo controle: \*p<0,05; \*\*\*p<0,0001 (N=12 para animais de 60 dias de idade e N=8 para animais de 90 dias de idade).

## 5.5 Consequências da Exposição Materna ao Etanol na Concentração de Magnésio das Estruturas Mineralizadas de Incisivos Centrais e Primeiros Molares Superiores de Ratos

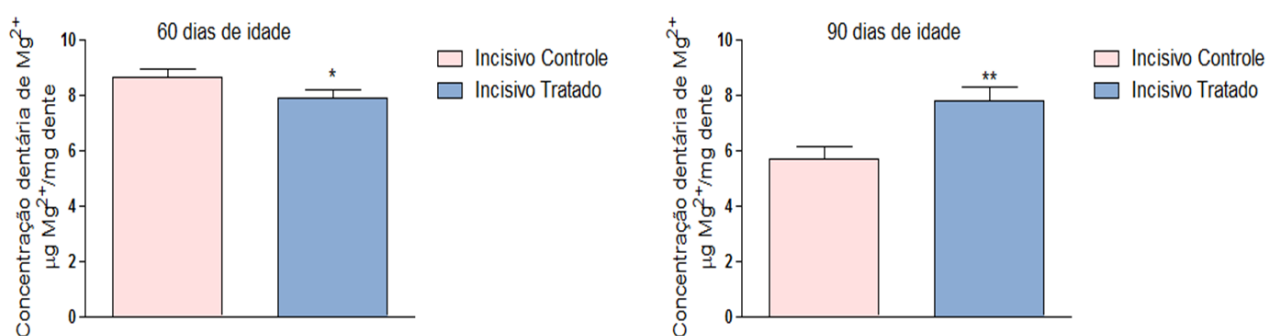
Sabe-se que o magnésio é um adjuvante importante do cálcio na mineralização óssea e dentária e que esse mineral pode ser incorporado pela apatita como substituto do cálcio, porém formando cristais de baixa cristalinidade. Um estudo sugere que algumas substâncias tendem a inibir a formação do esmalte e formar esses cristais de magnésio [24]. Para saber a influência da exposição materna ao etanol na incorporação de minerais e formação dentária de sua prole, aliado a dosagem de cálcio, dosou-se a concentração de magnésio nos dentes incisivos e molares.

Os resultados mostraram que a exposição materna ao etanol diminui a concentração de magnésio nos dentes incisivos e molares de ratos de 60 dias de idade. Em contrapartida, nos dentes incisivos da prole aos 90 dias de idade observa-se um aumento significativo deste mineral (*Gráficos 13, 14, 15 e 16*).

*Gráfico 13 e Gráfico 14*: Efeito da exposição materna ao etanol durante a gestação e o aleitamento na concentração de magnésio nos dentes molares de ratos de 60 e 90 dias de idade.



*Gráfico 15 e Gráfico 16*: Efeito da exposição materna ao etanol durante a gestação e o aleitamento na concentração de magnésio nos dentes incisivos de ratos de 60 e 90 dias de idade.



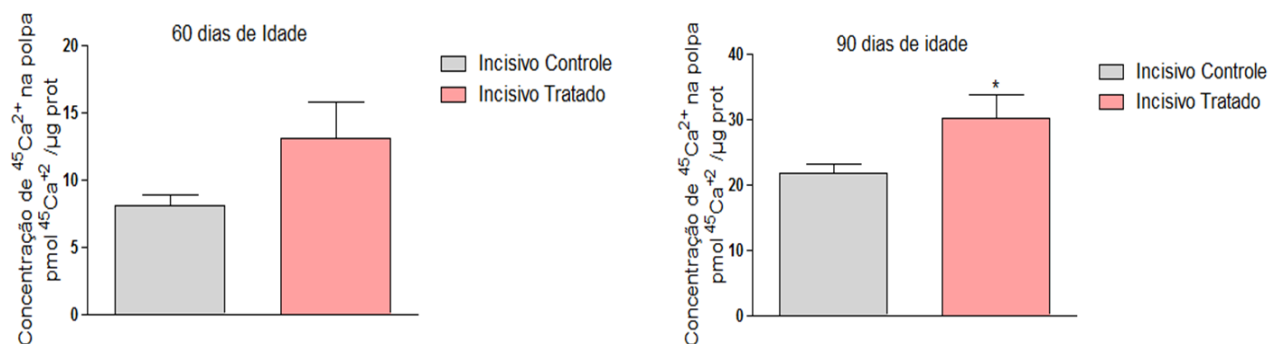
Os resultados foram expressos em  $\mu g Mg^{2+}/mg$  dente como a média  $\pm$  E.P.M. Análise estatística: teste t de Student com correção de Welch. Significativo em relação ao grupo controle: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  (N=12 para animais de 60 dias de idade e N=8 para animais de 90 dias de idade).

## 5.6 Efeitos da Exposição Materna ao Etanol no Influxo de Cálcio na Polpa de Dentes Incisivos Superiores da Prole

Considerando-se que a quantidade de minerais existentes na polpa é de apenas 1%, sendo o cálcio o principal, e que o aumento ou diminuição desses

minerais podem levar a disfunções pulpares comprometendo a efetividade de suas funções, foi determinado o efeito da exposição materna ao etanol no influxo de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  na polpa de dentes incisivos. Os resultados apresentados nos *Gráficos 17 e 18* demonstram que a exposição materna ao etanol induz aumento do influxo  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  na polpa de dentes incisivos de ratos de 90 dias de idade sem alterar este parâmetro em polpas de ratos de 60 dias de idade.

*Gráfico 17 e Gráfico 18*: Efeito da exposição materna ao etanol durante a gestação e o aleitamento no influxo de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  na polpa dos dentes incisivos de ratos de 60 e 90 dias de idade



Os resultados foram expressos em pmol  $^{45}\text{Ca}^{+2}$  /  $\mu\text{g}$  de proteína das polpas como a média  $\pm$  E.P.M. Análise estatística: teste t de Student com correção de Welch. Significativo em relação ao grupo controle de 90 dias: \* $p < 0,05$  (N= 8 em cada grupo, controle e tratado) e não significativo em animais de 60 dias de idade (N= 12 em cada grupo, controle e tratado).

## 6 DISCUSSAO

Conforme documentado neste trabalho, já está bem estabelecido que o álcool é uma droga considerada um fator de risco à saúde. Quando consumido em doses elevadas durante a gestação, pode causar malformações congênitas no feto, dentre as quais destacam-se defeitos craniofaciais e orodentais, decorrentes de interferências no desenvolvimento embrionário normal <sup>[55]</sup>. Durante o desenvolvimento pré-natal ocorre uma série de eventos ou processos fisiológicos (indução, proliferação, diferenciação, morfogênese e maturação), que levam à formação da maioria dos tecidos e órgãos do embrião, inclusive daqueles, que contribuem para o desenvolvimento dos dentes <sup>[54]</sup>.

Estudos indicam que o álcool afeta drasticamente as células da crista neural, os mecanismos pelos quais o álcool afeta essas células são: a formação de radicais livres deficiência de ácido retinoico, expressão gênica alterada, modificação nas atividades dos fatores de crescimento <sup>[44]</sup>. Diversos outros mecanismos influenciam simultaneamente diferentes vias bioquímicas para produzir danos ao feto e que estes dependem de diversas variáveis, incluindo tempo, frequência e quantidade de bebida ingerida durante a gravidez, estado de saúde e hábitos da mãe e constituição genética <sup>[28]</sup>.

Uma pesquisa longitudinal que acompanhou 500 crianças do nascimento até os 14 anos e constatou que os efeitos teratogênicos do álcool refletem na diminuição da massa corporal, corroborando os achados do presente estudo, que demonstrou diminuição da massa corporal dos animais expostos ao etanol <sup>[50]</sup>.

O presente estudo demonstrou que a exposição ao etanol diminuiu a massa dos dentes molares e dos dentes incisivos dos ratos de 60 e 90 dias de idade. Além disso, observou-se que a exposição ao etanol ocasionou a diminuição do tamanho do dente incisivo através dos parâmetros anatômicos avaliados. Corroborando estes dados, estudo anterior demonstrou diminuição de cerca de 10% no tamanho dos dentes molares na prole de ratasmães alcoolistas. Bianchi (2007) <sup>[43]</sup> sugere que essa diminuição de tamanho do dente seja consequência de um atraso nas fases iniciais do desenvolvimento e que pode ser compensado com o decorrer do crescimento. Neste contexto, Jimenez (2005) <sup>[51]</sup> demonstrou diminuição de 8% no tamanho do germe dental de fetos de ratos expostos ao etanol. Os autores sugerem

que tal processo ocorre devido a alterações na expressão de receptores para EGF e EGF receptor. Corroborando esta hipótese, inúmeros trabalhos descrevem um retardo na erupção e desenvolvimento dentário em indivíduos acometidos pela SAF [7, 40, 43, 44], enquanto outros descrevem alterações nas concentrações de EGF [10, 40].

Westphalen [56] demonstrou diminuição no tamanho dos molares de ratos de 40 dias de idade expostos ao etanol durante a gestação e lactação. Além disso, observou-se diminuição na expressão da laminina em fetos de 19 dias. A laminina é uma glicoproteína fundamental para o desenvolvimento embrionário, diferenciação, migração e adesão celular, aludindo às alterações morfométricas dos molares à redução da expressão da laminina durante o período fetal. A autora propõe que as alterações morfométricas podem permanecer na vida adulta do animal. Essa hipótese é corroborada pelo presente estudo onde demonstramos que a diminuição no tamanho dos dentes permanece até a vida adulta do animal aos 60 e 90 dias de idade. Alterações na expressão de glicoproteínas também foram registradas por Jimenez em 2005 [51]. Já se sabe que as glicoproteínas desempenham um papel fundamental durante o desenvolvimento dentário, principalmente no padrão morfológico e na secreção da matriz.

Os trabalhos supracitados demonstram que a formação dos tecidos dentários é guiada através das diversas vias de sinalização por moléculas mensageiras, (5) não obstante ratificam a proposta de SEXÉN ainda em 1976 [38], quando citou que três mecanismos têm sido propostos para a transmissão indutiva dos sinais na interação dos tecidos durante a organogênese: fatores difusíveis, contato célula-célula, e interação mediada pela matriz extracelular.

Consoante ao elucidado, variações em qualquer um dos mecanismos acarretam diferentes consequências na formação e mineralização dentária. Na presente pesquisa observamos aumento da concentração de cálcio nas estruturas mineralizadas dos dentes incisivos e molares de animais expostos aos efeitos gestacionais e lactacionais do etanol. Além disso, observou-se aumento do influxo do íon cálcio na polpa dos dentes incisivos dos mesmos animais utilizados para a dosagem de cálcio das estruturas mineralizadas. A maioria dos estudos sugere que o álcool causa hipoplasia no esmalte dentário e retardo na calcificação da matriz dentinária, e alguns sugerem diminuição dos minerais formadores dos cristais de hidroxiapatita por comprovada diminuição da microdureza. Considerando-se que a

exposição materna ao etanol acarreta em diminuição do EGF e do receptor para EGF nos diversos estágios da amelogênese e dentinogênese, que isto altera a matriz protéica precursora da mineralização e também a mineralização do esmalte e da dentina, sugerimos que essa redução do EGF e seu receptor e/ou de outras glicoproteínas está alterando algum mecanismo que regula a entrada de minerais e/ou a precipitação dos mesmos em cristais de hidroxiapatita nos dentes dos ratos expostos ao etanol durante a gestação e lactação.

Porquanto, ao contrário do que poderia se pensar tendo um aumento do cálcio, principal mineral formador da hidroxiapatita, que nos animais expostos os dentes estariam melhores formados e mais resistentes, essa hipótese vai de encontro aos outros trabalhos que mostram hipoplasias, dentes mais leves e com microdureza reduzida. Talvez os minerais estejam entrando em maior quantidade, porém não formando o principal componente dos dentes: a hidroxiapatita. Não se pode afirmar, então que a hipoplasia e a redução da microdureza sejam por uma menor quantidade de minerais nas estruturas dentárias <sup>[38]</sup>.

Na amelogênese a entrada de minerais se dá na fase de maturação do esmalte, na qual os ameloblastos mudam de conformação com a entrada de minerais, ficando aparentemente lisos, e também mudam para uma conformação que não permite mais a entrada de minerais, quando há precipitação dos minerais que já entraram na matriz, em cristais de hidroxiapatita. Em um estudo feito por Katchburian & Arana <sup>[57]</sup>, considerando que os germes já estivessem na fase de maturação, o EGF e seu receptor estavam bem marcados nos animais cujas mães não foram expostas ao etanol, e pouco marcadas nos animais cujas mães ficaram expostas, sugerindo que o fator de crescimento estaria relacionado com a mudança de conformação ameloblástica. Entretanto, se sabe que esse mecanismo parece ser regulado por alterações no pH. Sendo assim, havendo um distúrbio, seja pelo EGF ou pela não alteração de pH, que não permita a mudança da forma celular do ameloblasto para que os minerais se precipitem, entrariam mais minerais do que se precipitariam, aumentando a quantidade de cálcio e minerais na matriz do esmalte e ainda deixando o esmalte mais fraco pela não formação dos cristais.

Pode-se pensar também em um mecanismo compensatório, caso realmente haja atraso na formação e mineralização dentária da prole pelo uso do álcool na gestação, já que alguns autores sugerem que algumas das consequências são

revertidas com o passar dos anos. Para compensar o atraso na formação e mineralização haveria maior entrada dos íons nas matrizes do esmalte e dentina em um menor período, porém não haveria a precipitação dos íons em cristais.

Em nosso estudo também verificamos o aumento do influxo de cálcio na polpa e esse aumento pode estar relacionado com esse mecanismo compensatório, pois, mesmo após a finalização do processo de formação do dente, a dentina continua a ser produzida pelos odontoblastos que são células pulpares. A polpa, no afã de compensar uma mineralização deficiente, estaria absorvendo mais cálcio e formando mais dentina.

Além de alterações nas concentrações do íon cálcio, o efeito da exposição materna ao etanol nas concentrações do íon magnésio também pode ser explicado pela compensação de uma formação e mineralização dentárias deficientes. Nos animais de 60 dias de idade expostos ao etanol as concentrações do íon magnésio nos dentes estão diminuídas, enquanto estão aumentadas nos dentes dos animais de 90 dias de idade. Segundo um estudo, algumas substâncias inibem a formação de hidroxiapatita e acabam formando cristais mais frágeis com a substituição do cálcio pelo magnésio <sup>[24]</sup>. O álcool pode ter inibido a formação da hidroxiapatita pelos mecanismos já mencionados e com o passar do tempo na tentativa de reverter as consequências causadas pelo álcool acaba aumentando a formação desses cristais mais frágeis.

Sabe-se que a matriz orgânica precursora do esmalte e a da dentina é fundamental no processo de formação e mineralização dentária e qualquer distúrbio na produção dessa matriz pode afetar drasticamente esses processos. Diversos autores já descreveram que o álcool não só inibe a síntese de proteínas como também afeta a ação das proteinases essenciais para as fases de transição e maturação do esmalte <sup>[13, 28, 43]</sup>. Uma matriz proteica mal formada pode acarretar em mineralização deficiente, na qual podem existir algumas áreas hipomineralizadas e outras hipermineralizadas <sup>[19]</sup>. Pode ser também que a matriz mal formada e não degradada altere o influxo de cálcio tanto nas estruturas mineralizadas quanto na polpa. Além de acarretar diminuição no tamanho e massa dos dentes.

Uma grave consequência do uso abusivo de álcool é a deficiência nutricional, que traz consequências desastrosas na formação e mineralização do esmalte e nossos resultados podem estar relacionados a algumas dessas deficiências. Além

disso, o alcoolismo similarmente altera o metabolismo endócrino e a regulação dos hormônios é igualmente importante.

Uma distinta hipótese para o aumento da concentração de cálcio nas estruturas mineralizadas, pode estar relacionada ao mecanismo de defesa da própria polpa que diante de um agente irritante produz dentina podendo até mesmo obliterar a cavidade pulpar. Como os animais foram expostos ao álcool na lactação e este altera a constituição do leite materno, pode estar sendo um agente irritante para os dentes e induzindo a formação de mais dentina.

Em conjunto, os resultados obtidos no presente estudo reforçam o efeito teratogênico do etanol, demonstrando que a exposição materna a esta substância psicoativa induz alterações na formação dentária que permanecem até a vida adulta. Novos experimentos são necessários para melhor entender os mecanismos envolvidos nestes processos. Entretanto, salienta-se a relevância do tema para a área da Odontologia.



## 7 CONCLUSOES

A exposição ao etanol durante a gestação e a lactação afeta o desenvolvimento e a mineralização dentária. No presente estudo observou-se que a exposição materna ao etanol acarreta em:

- Diminuição da massa corporal;
- Diminuição da massa dentária;
- Diminuição do tamanho dos dentes, a partir de parâmetros anatômicos pré estabelecidos;
- Aumento da concentração de íons cálcio nas estruturas dentárias mineralizadas;
- Diminuição da concentração de íons magnésio nas estruturas mineralizadas dos animais de 60 dias e aumento nos de 90 dias de idade;
- Aumento do influxo do íon cálcio na polpa dentária de ratos de 90 dias de idade.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Global status report on alcohol and health. World Health Organization (OMS). Alcohol and Public Health, cap. 1, p.2 - 3, 2014.
- 2- I Levantamento Nacional sobre os padrões de consumo de álcool na população brasileira / Elaboração, redação e organização: Ronaldo Laranjeir.[et al.] ; Revisão técnica científica: Paulina do Carmo Arruda Vieira Duarte. Brasília : Secretaria Nacional Antidrogas, 2007.
- 3- GRINFELD, H. Efeitos do álcool na gestante, no feto e no recém-nascido. Cap. 1, p. 19-29 - São Paulo:Sociedade de Pediatria de São Paulo, 2010.
- 4- Álcool e Drogas sem Distorção ([www.einstein.br/alcooledrogas](http://www.einstein.br/alcooledrogas))/NEAD - Núcleo Einstein de Álcool e Drogas do Hospital Israelita Albert Einstein, 2009.
- 5- FREIRE, T. M; MACHADO J.C; MELO E.V; MELO D.G. [Effects of alcohol consumption during pregnancy]. Rev Bras Ginecol Obstet. 2005;27(7):376-81.
- 6- SANT'ANA, L. B. Efeitos da ingestão do álcool durante a gestação na imunoexpressão do EGF na amelogênese e dentinogênese do 1º molar inferior de ratos. Piracicaba,SP : [s.n.], 2004.
- 7- STREISSGUTH A.P. *et al.* Fetal alcohol syndrome in adolescents and adults, 1991. In: SANT'ANA, L.B. Efeitos da ingestão do álcool durante a gestação na imunoexpressão do EGF na amelogênese e dentinogênese do 1º molar inferior de ratos. Piracicaba,SP : [s.n.], 2004, p. 4.
- 8- CLAREN S.K; SMITH, D.S. The fetal alcohol syndrome, 1978. In: SANT'ANA, L.B. Efeitos da ingestão do álcool durante a gestação na imunoexpressão do EGF na amelogênese e dentinogênese do 1º molar inferior de ratos. Piracicaba, SP : [s.n.], 2004, p. 4.
- 9- CHURCH M.W. *et al.* Hearing, language, speech, vestibular, and dentofacial disorders in fetal alcohol syndrome,1997. In: SANT'ANA, L.B. Efeitos da ingestão do álcool durante a gestação na imunoexpressão do EGF na amelogênese e dentinogênese do 1º molar inferior de ratos. Piracicaba, SP : [s.n.], 2004, p. 4.

- 10- JACKSON I.T; HUSSAIN K. Craniofacial and oral manifestations of fetal alcohol syndrome, 1990. In: SANT'ANA, L.B. Efeitos da ingestão do álcool durante a gestação na imunoexpressão do EGF na amelogênese e dentinogênese do 1<sup>o</sup> molar inferior de ratos. Piracicaba,SP : [s.n.], 2004, p. 4.
- 11- HORY, ANA PAULA DI FIORI. Efeitos da ingestão materna de álcool antes e durante a gestação, sobre a amelogênese e dentinogênese de dentes incisivos inferiores de ratos Wistar. Bauru, SP: 2007.
- 12- ITTHAGARUM A; NAIR RG; EPSTEIN JB; KING NM. Fetal alcohol syndrome: case report and review of the literature. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2007 Mar;103(3):e20-5. Epub 2006 Dec 22. Review. PMID: 17188912 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- 13- SANT'ANA, L. B.; TOSELLO DO. Fetal alcohol syndrome and developing craniofacial and dental structures--a review. Orthod Craniofac Res. 2006 Nov;9(4):172-85. Review. PMID: 17101024 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- 14- TUCKER, A; SHARPE, P. The cutting-edge of mammalian development; how the embryo makes teeth. Nature Reviews Genetics, 2004 July, 5: 499-508. doi:10.1038/nrg1380
- 15- CARTHY MM, SMITH SM. Increased cell death and reduced neural crest cell numbers in ethanol-exposed embryos: partial basis for the fetal alcohol syndrome phenotype. Alcohol Clin Exp Res, 1995
- 16- LODI KB. Repercussões minerais ósseas no alcoolismo crônico associado à deficiência hormonal em ratos [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2010.
- 17- NAIDOO S. *et al.* Fetal alcohol syndrome: a dental and skeletal age analysis of patients and controls. Eur J Orthod. 2006 Jun;28(3):247-53. Epub 2006 Apr 27. PMID: 16644851 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- 18- NAIDOO S. *et al.* Fetal alcohol syndrome: anthropometric and oral health status. J Contemp Dent Pract. 2005 Nov 15;6(4):101-15. MID: 16299612 [PubMed - indexed for MEDLINE]

- 19- ARANHA, Flávio Leite. Bioquímica odontológica. São Paulo: Sarvier, 3<sup>a</sup>ed, 2009.
- 20- DEPAOLA, D.P.; FAINE, M.P.; PALMER, C.A. Nutrition in relation to dental medicine. In: SHILS, M.E.; OLSON, J.A.; SHIKE, M.; ROSS, A.C. Modern nutrition in health and disease. 9<sup>th</sup>ed. Baltimore: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, 1998. p. 1099-1124.
- 21- CASTRO, A.G.P.; AMANCIO, O.M.S. Nutrição e fisiologia dos dentes. Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr. = J. Brazilian Food Nutr., São Paulo, SP. v.19/20, p.87-104, 2000.
- 22- PORTAL EDUCAÇÃO. Cimento racicular- características clínicas e histológicas do periodonto. Fev, 2013. Disponível em: [www.portaldaeducacao.com.br/artigo](http://www.portaldaeducacao.com.br/artigo). Acesso em 23/05/2015.
- 23- NEURENBERG, FFF. Anatomia dentária. Maio, 2009. Disponível em: <http://odontoneurose.blogspot.com.br/>. Acesso em: 23/05/2015.
- 24- NICOLAU, J. Fundamentos de bioquímica oral. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- 25- ODONTOPÉDIA. Enciclopédia livre de odontologia. Disponível em: <http://odontopedia.info/index.php/Odontoblasto>. Acesso em: 30/08/2015.
- 26- GUEDES-PINTO, A.C. Hábitos alimentares e a cárie dentária. In: Odontopediatria. 6.ed. São Paulo: Santos Editora, 1997. p.451-473.
- 27- GERLACH, R.F. Amelogênese e esmalte dentário. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, SP: 2007. Disponível em: <http://podaefor.p.usp.br>. Acesso em: 10/07/2015.
- 28- SANT'ANA, L. B. Efeitos do álcool etílico sobre a amelogênese de molares inferiores de ratos, durante o período gestacional. Piracicaba, SP : [s.n.], 2001.

- 29- PÉCORA, J.D; SPANÓ, J.C. Complexo dentina polpa. Department of Restorative Dentistry. São Paulo, 2004. Disponível em: <http://www.forp.usp.br>. Acesso em: 20/10/2015.
- 30- BATH-BALOG, M; FEHRENBACH, M. Anatomia, Histologia e Embriologia dos Dentes e das Estruturas Orofaciais. 3ª Edição. Elsevier Editora Ltda, pp.190. Rio de Janeiro, 2012.
- 31- GUYTON,A.C.; HALL,J.E. Fisiologia Humana e Mecanismos das Doenças. 6ª. ed. Ed.Guanabara Koogan, Rio de Janeiro,1998.
- 32- PARADA, C.F. Bioquímica bucal (ênfase em cárie e cariologia). 1ª ed. Editora MNP, São Paulo, 2000.
- 33- NANCI, Antonio. Histologia Oral Ten Cate. 7ª ed. Elsevier, Rio de Janeiro, 2008.
- 34- DE SOUSA, F.B. Embriologia odontológica aplicada. João Pessoa - PB, set. 1999.
- 35- GOULART, F.A. *et.al.* Atlas digital de histologia básica. Universidade Estadual de Londrina. 1ª Ed. Londrina-PR, 2014.
- 36- JERNVALL, J.; THESLEFF, I. Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. *Mech. Dev.*, Helsinki, Finland, v. 92, p. 19-29, sep. 2000. In: DA SILVA, E. L. Genetic model of tooth development. *Biosci. J.*, Uberlândia, v. 24, n. 2, p. 113-124 , Apr./June. 2008.
- 37- DA SILVA, E. L. Genetic model of tooth development. *Biosci. J.*, Uberlândia, v. 24, n. 2, p. 113-124 , Apr./June. 2008.
- 38- SEXEN, L.O.; et al. Inductive tissue interactions. In: *The cell surface in animal embryogenesis and development*. Amsterdam: ed. G. Poste and G. L.

- nicholson, cap. 7, p. 331-407, 1976. In: DA SILVA, E. L. Genetic model of tooth development. Biosci. J., Uberlândia, v. 24, n. 2, p. 113-124, Apr./June. 2008.
- 39- LEHNINGER, A.L; NELSON, D.L; & COX, M.M. Princípios de Bioquímica. 2ª ed., Editora Sarvier, São Paulo, 1995.
- 40- SCHOUR, I; MASSLER M. The teeth. In Farris EJ, Griffth JQJR. Rat in laboratory investigation. 2.ed. New York: Hafner Publishing; 1971. p.105- In: SANT'ANA, L.B. Efeitos da ingestão do álcool durante a gestação na imunoexpressão do EGF na amelogênese e dentinogênese do 1º molar inferior de ratos. Piracicaba,SP : [s.n.], 2004, p. 4.
- 41- SIMMER, J.P. *et.al.* Dental Enamel Formation and Its Impact on Clinical Dentistry. Journal of Dental Education, Volume 65, No. 9. Texas, E.U.A, 2001.
- 42- NISHIO, C. Formação do esmalte dentário, novas descobertas, novos horizontes. Rev. Dent. Press Ortodon. Ortop. Facial, vol.13, nº4. Maringá, July/Aug, 2008. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-54192008000400002>
- 43- BIANCHI, F.J. Influência de fatores ambientais e genéticos relacionados com a agenesia dental e microdontia. Piracicaba, SP : [s.n.], 2007.
- 44- AMORIM, F.C.A. *et. al.* Anomalias dentárias: distúrbios da odontogênese. Revista de Trabalhos Acadêmicos ISSN 2179-1584, Volume 3, Número 5. Niterói, RJ, 2012.
- 45- MENOLI, A.P.V. *et. al.* Nutrition and tooth development. Ci. Biol. Saúde, Ponta Grossa, 9 (2): 33-40, jun. 2003.
- 46- CHEN S.; SULIK KK. Free radicals and ethanol-induced cytotoxicity in neural crest cells. Alcohol Clin Exp Res 1996; 20:1071–76.

- 47- RAWAT, A.K. Effect of maternal ethanol consumption on fetal and neonatal rat hepatic protein synthesis. *Biochem J*, London, v.160, n.3, p.653-661, Dec. 1976. In: SANT'ANA, L. B. Efeitos do álcool etílico sobre a amelogênese de molares inferiores de ratos, durante o período gestacional. Piracicaba,SP : [s.n.], 2001.
- 48- ZHOU, F.C. *et al.* Prenatal alcohol exposure retards the migration and development of serotonin neurons in fetal C57BL mice. *Brain Res Dev Brain Res.* 2001; 126(2): 147-55. In: SANT'ANA, L. B. Efeitos da ingestão do álcool durante a gestação na imunoexpressão do EGF na amelogênese e dentinogênese do 1º molar inferior de ratos. Piracicaba,SP : [s.n.], 2004.
- 49- CLARREN, S.K. *et al.* Diagnosing the full spectrum of fetal alcohol-exposed individuals: Introducing the 4-digit diagnostic code. *Alcohol* 35:400–410. 2000.
- 50- DAVIS W.L.; CRAWFORD L.A. *etal.* Ethanol induces the generation of reactive free radicals by neural crest cells in vitro. *J Craniofac Genet Dev Biol* 1990; 10:277–93. PubMed,CAS,Web of Science® Times Cited: 7
- 51- FARFÁN, J.D. *et al.* Alteration of the Silalization Pattern of the Murine Tooth Germ After Ethanol Exposure. *Clinical and Molecular Teratology.* Wiley Lise, 980 – 988, 2005.
- 52- GUERRERO, J.C.H. Morphologic effects of maternal alcohol intake on skull, mandible and tooth of the offspring in mice. *Jpn J Oral Biol*, Tokyo, v.32, p.460-469, 1990.
- 53- ROMERT P, MATTHIESEN ME. Changes of secretory ameloblasts in mini-pig fetuses exposed to ethanol in vivo. *J Den Res* 1988; 67:1402–4.
- 54- TENCATE, A.R. *Histologia bucal: desenvolvimento, estrutura e função.* 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.
- 55- SLAVKIN, H.C. Meeting the challenges of craniofacial-oral-dental birth defects. National Institute of Dental Research.
- 56- WESTPHALEN, L.B. Efeitos na odontogênese devida à ingestão de etanol durante a gestação e lactação : estudo em ratos. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2008.

57- Katchburian E, Arana V. ***Histologia e embriologia oral***. São Paulo: Panamericana, 1999.