

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO - NÍVEL MESTRADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA
ÊNFASE EM ODONTOPEDIATRIA

**EFEITOS NA ODONTOGÊNESE DEVIDO À INGESTÃO DE ETANOL
DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO – ESTUDO EM RATOS**

Letícia Westphalen Bento

Porto Alegre, janeiro de 2008.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO – NÍVEL MESTRADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA
ÊNFASE EM ODONTOPEDIATRIA

Linha de Pesquisa

Epidemiologia, Etiopatogenia e Repercussão das Doenças da Cavidade Bucal e Estruturas Anexas

**EFEITOS NA ODONTOGÊNESE DEVIDO À INGESTÃO DE ETANOL DURANTE A
GESTAÇÃO E LACTAÇÃO – ESTUDO EM RATOS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia em Clínica Odontológica com ênfase em Odontopediatria.

LETÍCIA WESTPHALEN BENTO

Orientador: Prof^a. Dr^a. Anna Christina Medeiros Fossati
Co-Orientador: Prof. Dr. Fernando Borba de Araujo

Porto Alegre, janeiro de 2008.

*“O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza
dos seus sonhos.”
(Eleanor Roosevelt)*

Dedico esse trabalho,

Àqueles que nunca mediram esforços para realizarem meus sonhos, que sempre estiveram ao meu lado, que são a inspiração para tudo que faço e razão da minha existência:

Minha mãe Regina, minha melhor amiga, meu porto seguro, obrigada por estar sempre comigo, pelo colo, pelo carinho e pelo amor incondicional...

Meu pai Alfredo, minha força, meu exemplo, obrigada pelo incentivo, pelo carinho e por sempre acreditar em mim...

Queridos pais, obrigada por encherem minha vida de alegria!

Amo muito vocês!

Agradecimentos

“Somos todos anjos de uma asa só e somente abraçados podemos voar.”

(Luciano de Crescenzo)

Agradeço pela ajuda na realização desse trabalho,

À minha irmã **Roberta**, minha benção, minha alegria, obrigada pelas risadas, pelos abraços apertados e beijos carinhosos. O teu amor é a energia para seguir em frente.

À minha querida **avó Marília**, por compreender minhas escolhas e por torcer sempre por mim.

Aos meus tios **Mariu Nilza** e **Betão**, pelo incentivo e pelo carinho sincero que têm por mim.

A toda **família Bento e Westphalen**: primos e tios que muito amo, que souberam entender o caminho que escolhi e estiveram sempre ao meu lado.

À **Eliane**, obrigada por fazer feliz àqueles que tanto amo e por me considerar família.

Às minhas queridas colegas de mestrado **Márcia Gomes, Sheila Sallé e Renata Franzon**, pelo carinho e pela grande amizade que construímos nesses anos. Nosso convívio foi maravilhoso! Obrigada por estarem ao meu lado, e por não sermos apenas colegas, mas grandes amigas...

À minha florzinha **Karina Podestá Rodrigues**, por ter se tornado a minha irmãzinha querida, por todas as alegrias e angústias que compartilhamos nesses dois anos de intensa amizade. Obrigada por poder sempre contar contigo.

Ao querido **Felipe Nör**, pelo carinho de sempre, pelas longas conversas, por me ajudar e me fazer companhia durante os experimentos. Obrigada pela amizade tão especial e por ser essa pessoa encantadora!

Aos queridos amigos **Gerson Acasigua, Rafael Lammers, Peter Slongo e Francisco Tatim Maia**, pela amizade e carinho durante o mestrado e pela ajuda indispensável com o manejo dos animais. Vocês foram fundamentais!

À minha nova amiga **Lúcia Rubin**, agradeço pela mão amiga que me estendeu o que, com certeza, foi essencial para a finalização de mais essa etapa.

À querida amiga **Ana Luisa de Carvalho**, obrigada por torcer por mim, pelo carinho, incentivo e amizade.

Aos que trabalham no **Laboratório de Biologia Bucal**, por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos colegas do curso de mestrado, em especial à **Juliana Travessas, Luciana Malheiros, Daniela Souza, Sabrina Moure, Elisabete Rojas e Fernanda Visioli** pela amizade e carinho.

Às **Turmas do Curso de Especialização em Odontopediatria** que acompanhei nessa jornada! Obrigada às colegas da minha **turma de 2002/2004** por sempre me incentivarem a fazer o curso de mestrado. Agradeço também às colegas da **turma de 2004/2006** que muito participaram das nossas angústias no início do mestrado. Sinto falta da alegria de vocês! E agradeço à **turma de 2007/2009** que trouxe muita alegria e coleguismo!

Às queridas novas mestrandas **Lisiane Bernardi, Evelin Rezende, Giovanna César e Débora Dalpian** pelo carinho, pela doçura e pela ajuda dispensada.

Às queridas internas **Indira Hadi, Liliana Agostini e Gabriela Monteiro** pelo carinho, pelo sorriso e por estarem sempre prontas a ajudar.

À querida amiga e colega **Carla Pitoni**, obrigada pela alegria contagiante e pela disponibilidade em ajudar! Obrigada pelos ensinamentos no curso de especialização, e também no mestrado, obrigada por me ensinar bioestatística e por aceitar o convite para fazer parte da minha banca!

À querida colega **Lizandra Ferrari** pela amizade instantânea. É muito bom conviver contigo! Obrigada pela disposição em contribuir com nossa disciplina.

À Prof^a. **Juliana Sarmiento Barata**, pelo incentivo e amizade. És um exemplo profissional! Obrigada por tudo!

À Prof^a. **Ana Elisa Bressani**, pela amizade, pela alegria e pelos ensinamentos durante o curso.

À Prof^a. **Viviane Araujo**, pela amizade e simpatia dispensadas e ajuda nos casos de ortodontia!

Ao querido Prof^o. **Ângelo Manfro**, pela ajuda nos casos de endodontia desde o curso de especialização. Tua alegre presença é fundamental nas nossas tardes de sexta-feira.

Ao Prof^o. **Jorge Michel**, pela torcida e excelente convívio!

Ao Prof^o **Adriano Bozza**, que desde o curso de especialização me orientou nos casos de ortodontia. Foram 4 anos de intenso trabalho, nos quais muito aprendi. Obrigada pela dedicação e pelo interesse em ensinar!

À querida amiga **Letícia Mattuella**, pela amizade, incentivo e pelas doces palavras que sempre me auxiliaram a seguir em frente! Obrigada pelo carinho!

Aos colegas e amigos **Adriela Mariath e Luciano Casagrande**, obrigada pelo incentivo e pelos bons momentos compartilhados.

Às funcionárias da Odontopediatria **Julcelaine e Ana Cláudia** pelo carinho, pela ajuda constante e por estarem sempre disponíveis!

À querida **Dona Neusa**, que tanto nos auxilia no ambulatório. Obrigada por estar sempre pronta a nos ajudar.

À querida **ATO 2008/1**, minha primeira turma como professora. Obrigada pela compreensão e por confiarem em mim.

Ao pessoal do Laboratório de Movimentação Celular do ICB-USP por me acolherem com tanto carinho no estágio que realizei e em especial à **Prof^a Marinilce Fagundes dos Santos** pelos ensinamentos, amizade e carinho com que me recebeu.

Às queridas amigas **Mara Rúbia, e Emília** por me receberem em suas casas com tanto carinho e por darem um apoio fundamental na minha estadia em São Paulo.

À querida amiga **Michelle Biz**, pela ajuda indispensável nas etapas desse trabalho. Por ser essa pessoa tão especial, que me acolheu com imenso carinho em sua casa em São Paulo! Mi, obrigada por tudo!

Aos **funcionários do CREAL – UFRGS**, especialmente a **Irene**, que teve importância fundamental nesse trabalho e sempre esteve disposta a me ajudar, à **Paula**, que me ajudou sempre que precisei, e à **Ângela** pela sua alegria constante! Obrigada **Dona Geni e Carmona** que com muito amor e dedicação mantém esse lugar especial para que possamos realizar nossos trabalhos.

À **Prof^a Heloisa da Silveira** pelas valiosas contribuições na defesa deste projeto.

À querida **Isabel da Silva Lauxen**, do laboratório de Patologia Bucal. Isa, obrigada pela disponibilidade em ajudar sempre que precisei, pelas dicas sobre inclusão, microtomia, imunoistoquímica. És uma pessoa encantadora! Obrigada por tudo!

Ao **Prof^o Manoel Sant'anna Filho** por disponibilizar o uso da Unidade de Morfometria e Histometria da patologia da FO-UFRGS para a captura das imagens e por aceitar o convite para a banca examinadora dessa dissertação.

À **Prof^a Dalva Padilha**, pela valiosa ajuda na metodologia e revisão desse trabalho.

À **prof^a Maria Antonieta Lopes de Souza** pelas importantes contribuições na defesa do projeto e por aceitar o convite para a banca examinadora dessa dissertação.

Ao **Prof^o Marcelo Cardoso** da ESEF – UFRGS pelos ensinamentos sobre o uso do SPSS.

À **Prof^a Dr^a Marilda da Cruz Fernandes** e ao seu aluno **Guilherme Vanik Pinto** do Laboratório de Pesquisa em Patologia da Faculdade de Ciências Médicas da FFFCMPA por me ajudarem, com tanto carinho, no uso do Image J.

À querida funcionária **Rosinha**, pelos cafezinhos, carinho e sorriso que tanto nos alegam durante o trabalho.

Ao **Toninho** do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS, pelas valiosas dicas sobre microtomia e inclusão e por disponibilizar o uso do micrótomo, com o qual preparei o material desta pesquisa.

Aos funcionários da portaria da faculdade em especial, ao **Sr. Pedro** e ao **Antônio**, pelo apoio nas inúmeras noites e finais de semana que trabalhei no laboratório.

Ao funcionário **Vladimir Arruda** pela disponibilidade em ajudar.

À **Faculdade de Odontologia da UFRGS** pela minha formação.

À comissão coordenadora, professores e funcionários do **Programa de Pós-graduação da FO-UFRGS**.

À **CAPES** pela bolsa de estudos durante o curso de mestrado.

À **PROPESQ** por ter apoiado meu projeto de pesquisa.

À **Deus e a meus anjos de guarda** que sempre estão olhando por mim e me guiam no caminho a seguir.

E aos que de alguma forma me auxiliaram na realização dessa dissertação.

À minha querida orientadora **Prof^a Anna**,
não há palavras para descrever minha gratidão. Desde o curso de especialização,
quando me apresentaste a Biologia Celular e por ela me apaixonei, não és para mim só
uma brilhante orientadora, mas um exemplo de pesquisadora, de professora e,
sobretudo, de ser humano.

A força que tens é infinita. Obrigada por acreditar que sou capaz!
És para mim uma grande amiga a quem tenho uma imensa admiração.


Ao meu querido co-orientador **Prof. Fernando**,
obrigada por acreditar em mim e por me proporcionar tantas oportunidades. Desde o
curso de graduação, muito admiro e respeito o profissional, o professor e a pessoa que
és. Nunca terei como agradecer os ensinamentos que me proporcionaste. Estar
trabalhando contigo, na nossa disciplina, que é meu segundo lar me enche de orgulho!

Muito obrigada!

Sumário

Lista de Abreviaturas.....	11
Resumo.....	12
Abstract.....	13
Introdução.....	14
1. Odontogênese.....	14
2. Teratologia do Álcool.....	17
2.1. Alterações Crânio- faciais.....	18
3. Matriz Extracelular e Membrana Basal.....	19
3.1. Laminina.....	21
4. Modelo Animal.....	23
4.1. O Dente no Rato.....	24
Objetivo.....	27
Artigos.....	28
Artigo 1: <i>“A ingestão de etanol durante a gestação provoca modificações morfológicas e diminuição da expressão da laminina nos germes dentários da prole - um estudo em ratos.”</i>	29
Artigo2: <i>“A ingestão de etanol durante a gestação e lactação pode causar alterações morfométricas nos dentes molares da prole- estudo em ratos.”</i>	55
Considerações Finais.....	69
Perspectivas.....	72
Considerações Éticas.....	73
Referências.....	74

Lista de Abreviaturas



µm	Micrometro
%	Porcento
ARBD	<i>Alcohol- Related Birth Defects</i>
ARND	<i>Alcohol- Related Neurodevelopmental Disorder</i>
CREAL	Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório
DAB	Diaminobenzidina
DMP	Proteína da Matriz Dentinária
DSPP	Sialofosfoproteína Dentinária
EDTA	Etileno Diamino Tetra-acético
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGF-R	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EHS	<i>Englebreth – Holm - Swarm</i>
erbB-2	<i>Epidermal Growth Factor Receptor type 2</i>
FAE	<i>Fetal Alcohol Effects</i>
FAS	<i>Fetal Alcohol Syndrome</i>
FASD	<i>Fetal Alcohol Spectrum Disorders</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
Fig.	Figura
FO-UFRGS	Faculdade de Odontologia da UFRGS
GC	Grupo Controle
GT	Grupo Teste
h	Hora
H/E	Hematoxilina e Eosina
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
Hh	<i>Hedgehog</i>
ICBS	Instituto de Ciências Básicas da Saúde
IGg	Imunoglobulina g
LN	Laminina
MB	Membrana Basal
MD	Mésio – Distal
MEC	Matriz extracelular
min	Minutos
ml	Mililitro
mm	Milímetro
ON	<i>Over Night</i>
Pb	<i>Phosphate Buffer</i>
PN	Pós – Natal
Shh	<i>Sonic Hedgehog</i>
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TA	Temperatura Ambiente
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor β</i>
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
VIU	Vida intra Uterina
VL	Vestíbulo-Lingual

Resumo

O consumo de etanol durante a gestação pode ocasionar anormalidades crânio-faciais, entre elas, alterações dentárias. Portanto, o objetivo desse trabalho foi verificar os efeitos do consumo de etanol durante a gestação e lactação na odontogênese através de um modelo animal. Ratas Wistar foram divididas em dois grupos: Grupo Teste (GT), cujas ratas ingeriram Etanol a 25% *ad libitum* e Grupo Controle (GC), cujas ratas ingeriram água *ad libitum*. Após 6 semanas, as ratas foram acasaladas com machos não-tratados. A partir dessa etapa, dois estudos foram conduzidos. No primeiro, realizou-se a análise da morfologia e da expressão da Laminina dos germes dentários dos filhotes do GT e do GC. Verificou-se, por meio de análise observacional, no GT, alterações epiteliais nos estágios de lamina e broto, mas não nos de casquete e campânula precoce. Em campânula tardia, observou-se atraso no desenvolvimento e diminuição dos germes. Quanto à expressão da Laminina, realizou-se a técnica imunoistoquímica enzimática nos animais de 19 dias de vida intra-uterina e recém-nascidos e, por meio de análise quantitativa, observou-se uma menor área imunomarcada nos animais do GT. O segundo trabalho objetivou verificar diferenças morfométricas entre os molares dos filhotes do GT e do GC. Para isso, foram aferidos os diâmetros mésio-distal (MD) e vestibulo-lingual (VL) de cada dente molar do GT e GC no 40º dia pós-natal. As médias dos diâmetros do GT foram menores que as do GC. O mesmo ocorreu quando se considerou a soma dos diâmetros por hemiarco. Estas diferenças foram estatisticamente significativas, com exceção do diâmetro MD e VL do primeiro molar inferior e MD do primeiro molar superior e da soma do diâmetro VL dos molares inferiores. Em vista dos resultados obtidos, concluiu-se que a ingestão de etanol durante a gestação e lactação em ratos pode causar alterações morfológicas durante o desenvolvimento dentário. Sugere-se que a diminuição na expressão da Laminina possa estar envolvida nos mecanismos dessas alterações. Além disso, verificou-se que tais anormalidades podem permanecer na vida adulta do animal, na forma de alterações morfométricas dos dentes molares.

Palavras Chave: Etanol, Gestação, Lactação, Laminina, Odontogênese, Rato

Abstract

Ethanol intake during gestation can provoke cranial-facial malformations, and dental anomalies are among them. Hence, the purpose of this study was to verify the effects of ethanol intake during pregnancy and lactation on odontogenesis using an animal model. Wistar female rats were divided in two groups: Test Group (TG), whose animals consume a 25% ethanol solution *ad libitum* and Control Group (CG), whose animals consume water *ad libitum*. After 6 weeks, the females were mated with non-treated males. Since this stage, two studies were conducted. The first one analyzed the tooth germs morphology and Laminin (Laminina) expression of TG and CG offspring. The TG showed, through a qualitative analysis, epithelial alterations in dental lamina and bud stage but not in cap and early bell stage. During late bell stage, a development delay and a reduced tooth germ size were observed. As regards the Laminina expression, the enzymatic immunohistochemistry technique was performed on 19 days gestation animals and newborns and a smaller immunostained area on TG animals was observed by a quantitative analysis. The purpose of the second study was to verify morphometric differences between molar teeth of TG and CG offspring. The mesio-distal (MD) and buccal-lingual (BL) diameters of all pup's molar teeth were measured on the 40^o day of life. The TG molars diameters means were smaller than the CG means, and the same was found when the 3 molars diameters were added. These differences were statistically significant except for the MD and VL inferior's first molar diameter, the MD superior first molar diameter and the VL diameter when the 3 inferiors molars were considered together. Considering the results, it was concluded that ethanol ingestion in rats during gestation and lactation can cause dental morphologic alterations during dental development. The decrease of Laminina expression can be involved in the alterations mechanisms. Furthermore, it was verified that these abnormalities can continue at animal's adult life as morphometric alteration of molars tooth.

Keywords: Ethanol, Gestation, Lactation, Laminin, Odontogenesis, Rat

Introdução

“Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada, apenas dê o primeiro passo”
(Martin Luther King Jr.)

A abordagem e terapêutica da odontopediatria contemporânea estão baseadas em uma visão integral da criança. Através dessa conduta, o profissional busca um conhecimento amplo sobre o contexto em que vive o paciente, no intuito de que os melhores resultados possam ser alcançados e o bem estar da criança assegurado (KLATCHOIAN, 2002).

Com a evolução dos conhecimentos científicos a respeito dos eventos celulares e moleculares implicados nos processos biológicos e patológicos, passou a existir uma maior preocupação com aqueles envolvidos nos tratamentos odontológicos, nas patologias associadas, bem como durante o desenvolvimento normal do indivíduo (HU e SIMMER, 2007).

Uma das peculiaridades do paciente infantil refere-se ao fato de estar em franco desenvolvimento. Por esta razão, além de outros aspectos, o odontopediatra dispensa especial atenção à formação dentária. Existe a constante preocupação com os fatores biológicos relacionados à este processo, com as possíveis interferências que possa sofrer e com as anormalidades que possam surgir em decorrência desses fatores (DE COSTER *et al.*, 2007; MURASHIMA-SUGINAMI *et al.*, 2007).

1. Odontogênese

A formação dentária se inicia nas primeiras semanas de vida intra-uterina (VIU). É um processo complexo, em que ocorrem inúmeras interações celulares. Estas fazem com que células de diferentes origens possam migrar e se diferenciar formando um órgão dental completo e funcional. Portanto, algum desequilíbrio na embriogênese poderá acarretar, além de outras malformações congênitas, modificações no órgão dental (THESLEFF *et al.*, 1995; MOORE e PERSAUD, 2000).

O desenvolvimento dos dentes decíduos e permanentes ocorre a partir do ectoderma que recobre o primeiro arco branquial. Este sistema de arcos branquiais

surge durante a embriogênese por volta da 4ª semana de VIU e dará origem às várias estruturas da face. Em torno da 6ª semana de VIU, observa-se uma placa espessada de epitélio indiferenciado revestindo a cavidade bucal primitiva. Esta camada recobre os futuros rebordos maxilar e mandibular constituindo a banda epitelial primária. Posteriormente, a banda epitelial primária se divide em lâmina vestibular e lâmina dentária (Fig.1A), sendo que esta se aprofunda no ectomesênquima circundante e dá origem aos futuros germes dentários. Já as células da lâmina vestibular aumentam de tamanho e número sendo que as mais centrais entram em apoptose formando o vestíbulo (KATCHBURIAN e ARANA, 1999; BERKOVITZ, 2004; FOSSATI e RUSCHEL, 2005).

A próxima fase do desenvolvimento dentário é a fase de botão ou broto. (Fig.1B) Esta se caracteriza por uma condensação epitelial esférica pouco diferenciada circundada por células ectomesenquimais e uma membrana basal (MB) que separa os dois tecidos. A partir desse momento, inúmeras divisões celulares ocorrem, principalmente, nos bordos inferiores do botão epitelial e em toda a sua periferia, conferindo à estrutura uma forma semelhante a um capuz recebendo o nome de fase em capuz ou casquete (KATCHBURIAN e ARANA, 1999; BERKOVITZ, 2004; FOSSATI e RUSCHEL, 2005). (Fig.1C)

Nesta fase, a porção derivada do epitélio bucal é chamada órgão do esmalte ou órgão dentário. As células de origem ectomesenquimática que se concentram na porção central do casquete epitelial passam a constituir a papila dentária. Em torno do germe dentário (germe dentário), envolvendo o órgão do esmalte e papila, situa-se outra condensação de células ectomesenquimáticas que constituem o folículo dentário. Estas estruturas caracterizam o germe dentário. Entretanto, alguns autores (KATCHBURIAN e ARANA, 1999) não consideram o folículo como parte dele. O órgão do esmalte dará origem ao esmalte dentário, a papila à dentina e à polpa e o folículo ao cimento, ligamento periodontal e osso alveolar de inserção (KATCHBURIAN e ARANA, 1999; BERKOVITZ, 2004; FOSSATI e RUSCHEL, 2005).

A seguir, na fase de campânula precoce (Fig.1D), se inicia a morfodiferenciação do germe dentário. Neste momento, pode-se observar: o epitélio externo, que se localiza na porção periférica do órgão do esmalte próximo ao folículo; o epitélio interno, que está limitando a concavidade epitelial junto à papila dentária; e

as células mais centrais, que estão mais afastadas uma das outras e que aos poucos vão perdendo a característica de um maciço celular. Neste período, os espaços entre as células centrais do órgão epitelial são preenchidos, principalmente por glicosaminoglicanas. Estas atraem moléculas de água fazendo com que as células apresentem-se distantes umas das outras, mas ligadas por desmossomos, adquirindo um aspecto estrelado. Por esta razão, esta porção do germe dentário é chamada de retículo estrelado. A função específica desta estrutura está ligada com a proteção dos tecidos dentais subjacentes. O nó de esmalte, que é um importante centro sinalizador e indicativo das futuras cúspides, também pode estar evidente. Além disso, é possível visualizar o estrato intermediário que consiste em duas ou três camadas de células achatadas que estão localizadas adjacentes ao epitélio interno. Tem sido sugerido que estas células estão ligadas à formação de proteínas e ao transporte de materiais para as células do epitélio interno, além de ser fonte de fosfatase alcalina (BERKOVITZ, 2004).

Na fase de campânula tardia/modelado da coroa (Fig.1E), ocorre a histodiferenciação das células do epitélio interno em ameloblastos e das células da papila próximas a MB em odontoblastos. (Fig.1F) Esta histodiferenciação também ocorre por interações recíprocas entre epitélio e mesênquima que interagem através de um sistema de sinalização com efetores e receptores. As células do epitélio interno do órgão do esmalte em desenvolvimento, em forma de pré-ameloblastos, induzem as células periféricas da papila dental, que se localizam junto a MB, a se tornarem colunares e se diferenciaram em pré-odontoblastos. Nesta fase, os pré-odontoblastos completam sua diferenciação, iniciam a secreção de pré-dentina que posteriormente se mineraliza, e a dentina mineralizada parece induzir os pré-ameloblastos a se tornarem uma célula adulta capaz de secretar matriz de esmalte. Este processo inicia-se no topo das futuras cúspides ou bordos incisais (THESLEFF e VAAHTOKARI, 1992; KATCHBURIAN e ARANA, 1999; PETERS e BALLING, 1999; TEN CATE, 2001; BERKOVITZ, 2004; FOSSATI e RUSCHEL, 2005; ZHANG *et al.*, 2005). (Fig.1G)

2. Teratologia do Álcool

Teratologia, palavra originada do termo grego *terato* (monstro), é o estudo do desenvolvimento anormal e defeitos congênitos. Dessa forma, é considerado um teratógeno qualquer agente exógeno que cause um desenvolvimento anormal. Os efeitos dos agentes teratogênicos podem ser de ordem física, funcional ou comportamental. Diferentes órgãos possuem períodos críticos distintos para a ação dos teratógenos. Entretanto, o período compreendido entre o 15^o e o 60^o dia de gestação é crítico para muitos órgãos nos seres humanos. O coração se forma principalmente durante a 3^a e 4^a semana, enquanto o cérebro e o sistema esquelético estão suscetíveis a partir do início da 3^a semana de VIU até o final da gravidez e também além dela (GILBERT, 2000).

O álcool e seus metabólitos são os agentes teratogênicos mais comuns, entretanto, os mecanismos que causam suas alterações não estão completamente esclarecidos. Sabe-se que o etanol tem um peso molecular baixo e uma alta solubilidade nos lipídios. Dessa forma, a passagem pela placenta é livre proporcionando uma rápida disponibilidade ao embrião a níveis similares aos da mãe (MANN *et al.*, 1975; CHERNOFF, 1977). Porém, a exposição fetal é maior, devido ao metabolismo e eliminação serem mais lentos. Isto faz com que o líquido amniótico permaneça impregnado de álcool não modificado e de seus metabólitos como o acetaldeído (CHAUDHURI, 2000; FREIRE *et al.*, 2005).

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. Além disso, inibe a síntese de ácido retinóico, que é uma substância reguladora do desenvolvimento embrionário. O etanol e o acetaldeído têm efeitos diretos sobre vários fatores de crescimento celular, inibindo a proliferação de certos tecidos (CHAUDHURI, 2000; RILEY *et al.*, 2001). O etanol mostrou possuir uma ação tóxica direta nas células da camada epiblastica do embrião em desenvolvimento, sendo possível a ocorrência de várias anormalidades (CHAUDHURI, 2000).

O consumo de álcool durante a gravidez pode ocasionar no feto efeitos físicos, mentais e comportamentais definidos sob o termo “espectro de desordens do álcool fetal” (FASD). Estas alterações estão divididas em categorias, como: síndrome do álcool fetal (FAS), efeitos do álcool fetal (FAE), anomalias de nascimento

relacionadas com álcool (ARBD) e desordens do neuro-desenvolvimento relacionadas com álcool (ARND). Alguns estudos apontam que a FASD atinja cerca de 1% dos nascidos vivos (SAMPSON *et al.*, 1997; SANT'ANNA e TOSELLO, 2006; Fetal Alcohol Spectrum Disorders Center for Excellence Web site; MANNING e EUGENE HOYME, 2007). Já a incidência da forma completa da síndrome (FAS) é estimada em aproximadamente 2,8-4,6 a cada 1000 nascimentos nos Estados Unidos. Esta prevalência sobe para 9,1 a cada 1000 se forem considerados os casos de crianças com transtornos do desenvolvimento neurológico relacionados com o álcool, que não caracterizam a síndrome (SAMPSON *et al.*, 1997). No Brasil, existem poucos dados sobre a incidência de efeitos teratogênicos do álcool (BAU e DOTTO, 2002; FREIRE *et al.*, 2005). Estima-se a incidência de alcoolismo materno em 6/1000 gestantes e a incidência da FAS em 1/1000 recém-nascidos. No entanto, calcula-se que um quarto das gestantes faça uso esporádico de bebida alcoólica (GRINFELD *et al.*, 1999; FREIRE *et al.*, 2005).

2.1 Alterações Crânio-dento-faciais

As alterações crânio-faciais ocasionadas pela ingestão de álcool durante a gravidez são bastante comuns e importantes para o diagnóstico da FASD. Até o momento, estão descritas: microcefalia, testa longa e estreita, hipotelorismo, hipoplasia maxilar e mandibular, fissuras palpebrais estreitas, *filtrum* indistinguível, vermelhão do lábio superior estreito e alongado, nariz em sela, aplasia da úvula e desordens temporo-mandibulares. Em relação às alterações dentais, já foram relatadas: maloclusões, assimetrias, dentes pequenos, hipoplasia de esmalte, apinhamentos, mordida cruzada, transpasse horizontal aumentado, atraso no desenvolvimento e nas trocas dentárias, dentes ausentes ou mal posicionados (CLARREN e SMITH, 1978; STREISSGUTH *et al.*, 1980; SULIK *et al.*, 1981; HADI *et al.*, 1987; JACKSON e HUSSAIN, 1990; KIESER, 1992; CHURCH *et al.*, 1997; CHAUDHURI, 2000; CUDD, 2005; SULIK, 2005).

Spohr *et al.* (2007) acompanharam 37 pacientes com FASD durante 20 anos e verificaram que, apesar de algumas alterações inicialmente observadas na infância terem se atenuado ou desaparecido, outras persistiram. Este fato mostra que, dependendo do órgão ou tecido atingido, as seqüelas ocasionadas pela ingestão de etanol durante a gravidez são permanentes.

Apesar de alterações no desenvolvimento dentário devido à ingestão de etanol já terem sido descritas, os mecanismos pelas quais elas ocorrem ainda não estão esclarecidos (CLARREN e SMITH, 1978; CAMPOS e DURANZA, 1988; KIESER, 1992; CHURCH *et al.*, 1997; JIMENEZ-FARFAN *et al.*, 2005a; JIMENEZ-FARFAN *et al.*, 2005b; SANT'ANNA e TOSELLO, 2005; SANT'ANNA *et al.*, 2005; SULIK, 2005; SANT'ANNA e TOSELLO, 2006).

Por essa razão, Sant'anna *et al.* (2005), realizaram um estudo experimental em ratos observando a dentinogênese e amelogênese dos primeiros molares inferiores. Os autores investigaram o efeito da ingestão alcoólica durante a gestação na expressão do *epidermal growth factor* (EGF), fator de crescimento fundamental na citodiferenciação de ameloblastos e odontoblastos. Através de imunoistoquímica, os autores verificaram a expressão do EGF nos germes dentários de ratos recém-nascidos (RN), de 4 e 9 dias. Nos recém-nascidos cujas mães ingeriram álcool, a imunorreatividade para EGF no epitélio interno do órgão do esmalte e ameloblastos pré-secretóres foi fraca quando comparada ao controle. Nos ratos do GT de 4 dias, a imunorreatividade dos ameloblastos secretóres e odontoblastos foi moderada. Nos filhotes de 9 dias a marcação dos ameloblastos foi fraca. Os autores sugeriram que o alcoolismo materno interferiu na expressão do EGF durante a dentinogênese, amelogênese, secreção e maturação da dentina e do esmalte.

No mesmo ano, Jimenez-farfan *et al.* (2005) avaliaram a expressão de receptores para o EGF, EGF-R e erbB-2, em germes dentários de camundongos provenientes de fêmeas que ingeriram álcool durante a gestação em diferentes concentrações: 5%, 10%, 15%, 20% e 25%. Os grupos de 15%, 20% e 25% apresentaram nos estágios de campânula precoce e tardia: atraso na diferenciação celular, degenerações nos tecidos epiteliais, tamanho reduzido e aumento da imunorreatividade aos receptores do EGF. Segundo os autores, este aumento deveu-se a um prejuízo na internalização/degradação dos receptores ligados ao EGF.

3. Matriz extracelular e Membrana Basal

A matriz extracelular (MEC) regula o desenvolvimento e a função de todas as células de organismos eucariotos. Ela não só promove a sua sustentação, como interage com elas via receptores da superfície celular. Seus componentes incluem

ligantes que ativam vias de sinalização intracelular, que regulam a sobrevivência, proliferação, diferenciação e apoptose, além de interagirem com fatores de crescimento, agentes quimiotrópicos e outros fatores solúveis (KREIS e VALE, 1999). A composição da MEC, organização e relação com a superfície celular são de grande importância para o desenvolvimento, metabolismo, destino e forma das células (WEBB *et al.*, 1998). Ela é composta principalmente por fibras colágenas, elásticas e reticulares, mergulhadas em uma substância fundamental, composta, em grande parte, por complexos de glicosaminoglicanas, proteoglicanas, glicoproteínas e fatores de crescimento (HARALSON e HASSELL, 1995; GARDNER e HIATT, 1997; ALBERTS *et al.*, 1999). Nenhum fator que influencie a biologia das células, o realiza sem afetar a biosíntese da MEC, assim como, mudanças na MEC afetam a resposta da célula a outros reguladores da sua biologia (HARALSON e HASSELL, 1995; JIMENEZ-FARFAN *et al.*, 2005a).

A interação da matriz com os fatores de crescimento regula indiretamente o comportamento celular com inúmeras conseqüências biológicas. Estas interações podem ocorrer por meio de ligação MEC/fator de crescimento através das cadeias laterais das glicosaminoglicanas, ou no centro protéico de moléculas específicas da matriz. Estes mecanismos afetam a concentração local e a atividade biológica destes fatores podendo caracterizar uma reserva local de fator de crescimento que persistirá após a sua produção ter terminado (ADAMS e WATT, 1993). Além disso, os fatores de crescimento podem ter efeitos na produção de proteínas da MEC e de seus receptores (NATHAN e SPORN, 1991).

Segundo Fossati (2000), a matriz está presente nos embriões desde o princípio, apesar da sua composição e da relação entre as células diferirem entre os tecidos e de acordo com estágios do desenvolvimento observado. A gênese dentária é um processo que se desenvolve a partir de interações entre o epitélio e o mesênquima, na qual a MEC desempenha função importante. Estas interações iniciam-se por sinalizações do ectoderma, que em seguida são substituídas por sinais ectomesenquimais. Sinais moleculares complexos mediam a comunicação durante o desenvolvimento dentário. Muitos deles pertencem à família do *transforming growth factor* β (TGF- β), *fibroblast growth factor* (FGF) e às famílias *Hedgehog* e *Wnt* além de outros genes, fatores de crescimento e fatores de transcrição (THESLEFF *et al.*, 1989;

RUCH *et al.*, 1995; THESLEFF *et al.*, 1995; THESLEFF *et al.*, 1996; KATCHBURIAN e ARANA, 1999; PETERS e BALLING, 1999; DASSULE *et al.*, 2000; TEN CATE, 2001; GRITLI-LINDE *et al.*, 2002; THESLEFF, 2003; COBOURNE *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2005).

Na odontogênese, a importância da MEC na indução entre o epitélio e o mesênquima está, principalmente, ligada à presença da membrana basal (MB). A MB é uma camada fina, especializada, com funções biológicas e mecânicas importantes no controle do comportamento celular e que está presente na maioria dos tecidos. É uma estrutura que separa o epitélio do mesênquima e circunda muitos tipos celulares, tais como: muscular, adiposo, endotelial e nervoso. Na organogênese, a MB dá apoio às células e fornece sinais para proliferação, migração e diferenciação. Ela é constituída de laminina, colágeno tipo IV, perlecan, nidogênio/entactina e outras moléculas, mas sua composição estrutural difere entre os tecidos, estágios de desenvolvimento e na presença de algumas doenças (ADAMS e WATT, 1993; TIMPL, 1996; ALBERTS *et al.*, 1999; FUKUMOTO *et al.*, 2006). No germe dentário, a MB é espessada e localizada na interface entre as células do epitélio interno do órgão do esmalte e as células ectomesenquimáticas da papila dentária. Além dos componentes anteriormente citados, a MB dental apresenta heparan sulfato, fibronectina e colágeno III (THESLEFF *et al.*, 1981). Já foi demonstrado que uma MB específica é necessária para a diferenciação final dos odontoblastos e que o seu desaparecimento desencadeia a diferenciação final dos ameloblastos (RUCH *et al.*, 1995; YOSHIBA *et al.*, 1998; JIMENEZ-FARFAN *et al.*, 2005b; SANT'ANNA *et al.*, 2005).

3.1 Laminina

A Laminina, principal componente da MB, é uma glicoproteína estrutural que foi inicialmente identificada como produto do sarcoma de camundongo Englebreth-Holm-Swarm (EHS) que produz grande quantidade da proteína (TIMPL *et al.*, 1979). Entretanto, evidências indicam que a Laminina proveniente do sarcoma EHS representa um membro de uma família de proteínas contendo, no mínimo, 15 isoformas (HARALSON e HASSELL, 1995; YUASA *et al.*, 2004).

As Lamininas são heterotrímeros constituídos pela associação de três diferentes cadeias α , β e γ . As cinco cadeias α existentes são codificadas pelos genes LAMA1, LAMA2, LAMA3, LAMA4, LAMA5. As quatro cadeias β e três cadeias γ são

codificadas pelos genes LAMB1, LAMB2, LAMB3, LAMB4 e LAMC1, LAMC2, LAMC3, respectivamente. Apesar da existência de várias cadeias, a maioria das Lamininas é encontrada como uma combinação de $\beta 1\gamma 1$ ou $\beta 2\gamma 1$ com uma das cinco cadeias α , com exceção da Laminina 5 que consiste de $\alpha 3\beta 3\gamma 2$ (TIMPL, 1996; SALMIVIRTA *et al.*, 1997).

Uma variedade de atividades biológicas tem sido atribuída às Lamininas, tais como: promoção de adesão celular, crescimento do axônio, regulação da forma, diferenciação, proliferação e estabelecimento da polaridade de uma variedade de tipos celulares (HARALSON e HASSELL, 1995; LI *et al.*, 2003).

Salmivirta *et al.* (1997) utilizando imunistoquímica e hibridização *in situ*, estudaram a distribuição das cadeias $\alpha 1-5$ da Laminina no desenvolvimento dentário de camundongos. Os resultados demonstraram que cada uma das cinco cadeias α tem um padrão de distribuição único durante o desenvolvimento dentário e que rápidas mudanças no padrão de expressão ocorrem durante os diferentes estágios do desenvolvimento. Além disso, os autores verificaram que tanto o epitélio quanto o mesênquima dental produzem cadeias de Laminina. O mRNA das cadeias $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 4$ estavam expressos no mesênquima dental enquanto as cadeias $\alpha 3$ e $\alpha 5$ foram encontradas no epitélio. O mRNA da cadeia $\alpha 5$ estava largamente expresso no epitélio dental, e a proteína correspondente estava igualmente distribuída ao longo da MB dentária durante todo desenvolvimento embrionário. Com base nesses resultados, os autores sugerem que a cadeia $\alpha 5$ seja a principal cadeia α da Laminina da MB dentária. Isto foi confirmado por Fukumoto *et al.* (2006), quando trabalharam com camundongos mutantes para os genes codificadores dessa proteína e verificaram que eles desenvolveram dentes pequenos e com cúspides alteradas.

Segundo Garbarsch *et al.* (1994) e Della-coletta *et al.* (1997), a Laminina é um componente constante da MB do germe dental em desenvolvimento. O alinhamento das células mesenquimais ao longo da MB e sua diferenciação podem estar associados com a interação de receptores celulares com macromoléculas da MB. No epitélio interno, a degradação da MB pode ser o fator desencadeador da diferenciação destas células em ameloblastos. Isto sugere que receptores específicos das células epiteliais indiferenciadas interagem com componentes da MB degradada, promovendo a diferenciação. Além disso, com o início da secreção da matriz orgânica da dentina pelos odontoblastos, a MB desaparece, o que coincide com a diferenciação dos

ameloblastos. Ryan *et al.* (1999) demonstraram a influência da Laminina 5 na diferenciação dos ameloblastos. Camundongos mutantes do gene LAMA 3 apresentaram alterações em dentes incisivos similares à hipoplasia de esmalte. Anormalidades foram observadas durante a diferenciação e secreção do esmalte e na formação do epitélio reduzido.

Yuasa *et al.* (2004) avaliaram a função da Laminina $\alpha 2$ no desenvolvimento dentário através de camundongos mutantes para esta proteína. Os animais mutantes (-/-), quando comparados aos heterozigotos (+/-) e aos animais normais (*wild-type*), apresentaram a superfície do esmalte fina e irregular, além de túbulos dentinários amplos devido à redução da sialofosfoproteína dentinária (DSPP) e da proteína da matriz dentinária (DMP). Anormalidades no esmalte foram observadas na sua superfície, resultando em incisivos esbranquiçados. Esta característica pode ser um indicativo de hipoplasia/hipocalcificação de esmalte, aspecto descrito em pacientes com FAS (JACKSON e HUSSAIN, 1990).

Liesi (1997) verificou o efeito do etanol na interação das células neuronais com a Laminina em um estudo *in vitro*. Os resultados mostraram que os neurônios tratados com etanol degradaram seu substrato de Laminina, ligaram-se excessivamente aos peptídeos neuroativos derivados da cadeia $\beta 2$ e os liberaram em seu meio de cultura. Estes resultados indicam que o etanol afeta a expressão de Laminina nos neurônios de ratos e pode aumentar sua atividade proteolítica.

Özer *et al.* (2000), ao avaliarem os efeitos da exposição pré-natal ao álcool na migração neuronal, neurogênese e mielinização, sugeriram que moléculas de adesão ou da MEC, tais como a Laminina, deveriam ser investigadas.

4. Modelo Animal

O estudo da odontogênese tem sido baseado principalmente em estudos realizados em modelos animais e, entre eles, os roedores são os mais utilizados para esse fim. Os estudos do desenvolvimento dentário em humanos são dificultados ou mesmo inviabilizados devido às questões éticas envolvidas na obtenção da amostra.

Por serem observacionais e retrospectivos, os estudos em humanos sobre a teratologia do álcool possuem algumas limitações. Existe a dificuldade de relacionar os achados clínicos com a exposição pré-natal ao etanol devido aos seguintes aspectos:

falta de informações completas a respeito do consumo de álcool durante o período gestacional, uso concomitante de drogas lícitas e/ou ilícitas, variabilidades da dieta, variáveis genéticas e dificuldade de obter uma amostra significativa de casos (CLARREN e SMITH, 1978; STREISSGUTH *et al.*, 1980; CHURCH *et al.*, 1997; CUDD, 2005; SANT'ANNA e TOSELLO, 2006; Fetal Alcohol Spectrum Disorders Center for Excellence Web site).

Os experimentos que utilizam modelos animais possuem a vantagem de controlarem estas variáveis. Um dos animais mais largamente utilizados para o estudo da FAS tem sido o rato.

4.1 O Dente no Rato

O dente no rato é mais do que um órgão mastigatório. Devido a suas peculiaridades, é um importante indicador biológico que reflete e marca, durante seu desenvolvimento, o *status* metabólico do animal. Estas marcas, diferente das similares no osso, não são transitórias, ficam permanentemente registradas no esmalte e na dentina (SCHOUR e MASSLER, 1942).

Os molares do rato assemelham-se aos dentes dos seres humanos e estão completamente formados nos primeiros 125 dias de vida. A proliferação e a histodiferenciação dos tecidos dentais são extremamente similares e, assim como em seres humanos, a atividade celular inicia na ponta das cúspides e progride em um padrão regular. Uma importante diferença nos roedores são as áreas livres de esmalte, imediatamente acima das cúspides. Estas áreas são originadas ainda na vida pré-natal e se estendem por atrição funcional. Outra peculiaridade refere-se ao fato de que, nos roedores, antes da amelogênese, o órgão do esmalte se torna vascularizado imediatamente acima dos centros de crescimento aposicionais das futuras cúspides (SCHOUR e MASSLER, 1942).

O primeiro molar, o maior dos três dentes, inicia sua formação no 13^o dia de VIU com a aparição da lamina dentária. Aos 15, 17 e 19 dias de VIU, se estabelece, respectivamente, a fase de botão, casquete e campânula. O início da deposição de dentina ocorre no 21^o dia de VIU ou o dia pós-natal (PN) e a de esmalte, no 2^o dia PN. A coroa termina seu desenvolvimento no 11^o dia PN (SCHOUR e MASSLER, 1942; LUUKKO, 1998; WEBB *et al.*, 1998). (Fig.1)

O segundo molar inicia sua formação no 14^o dia de VIU com a aparição da lâmina dentária. A histodiferenciação dos ameloblastos ocorre no 20^o dia de VIU e o início da deposição de dentina, no 1^o dia PN. A coroa termina seu desenvolvimento 13 dias após o nascimento (SCHOUR e MASSLER, 1942).

O terceiro molar inicia sua formação no 2^o dia PN com a aparição da lamina dentária e entre o 8^o e 9^o dia PN inicia a histodiferenciação dos ameloblastos. A deposição de dentina ocorre no 13^o dia PN e a coroa termina seu desenvolvimento no 21^o dia PN. Aos 40 dias PN todos os molares estão em oclusão (SCHOUR e MASSLER, 1942; SOUZA, 1981).

Deste modo, considerando a importância da laminina no desenvolvimento dentário e de que não existem estudos experimentais que relacionem alterações de tamanho dentário com contato pré-natal com o etanol, desenvolveu-se este estudo que avaliou, por meio de um modelo animal, os efeitos da ingestão de etanol durante a gestação e lactação na odontogênese.

Tabela 1: Fases do desenvolvimento dos dentes molares de rato

Idade do Feto	1^o molar	2^o molar	3^o molar
Lâmina Dentária	13 ^o dia de VIU	14 ^o dia de VIU	2 ^o dia Pós-Natal
Fase de Botão	15 ^o dia de VIU	-	-
Fase de Capuz	17 ^o dia de VIU	-	-
Fase de Campânula	19 ^o dia de VIU	-	-
Início da Deposição de Dentina	21 ^o dia de VIU / 1 ^o dia Pós-Natal	1 ^o – 2 ^o dia Pós- Natal	13 ^o dia Pós-Natal
Início da Deposição de Esmalte	2 ^o dia Pós-Natal	3 ^o dia Pós-Natal	14 ^o dia Pós-Natal
Coroa Completa	11 ^o dia Pós-Natal	13 ^o dia Pós-Natal	21 ^o dia Pós-Natal

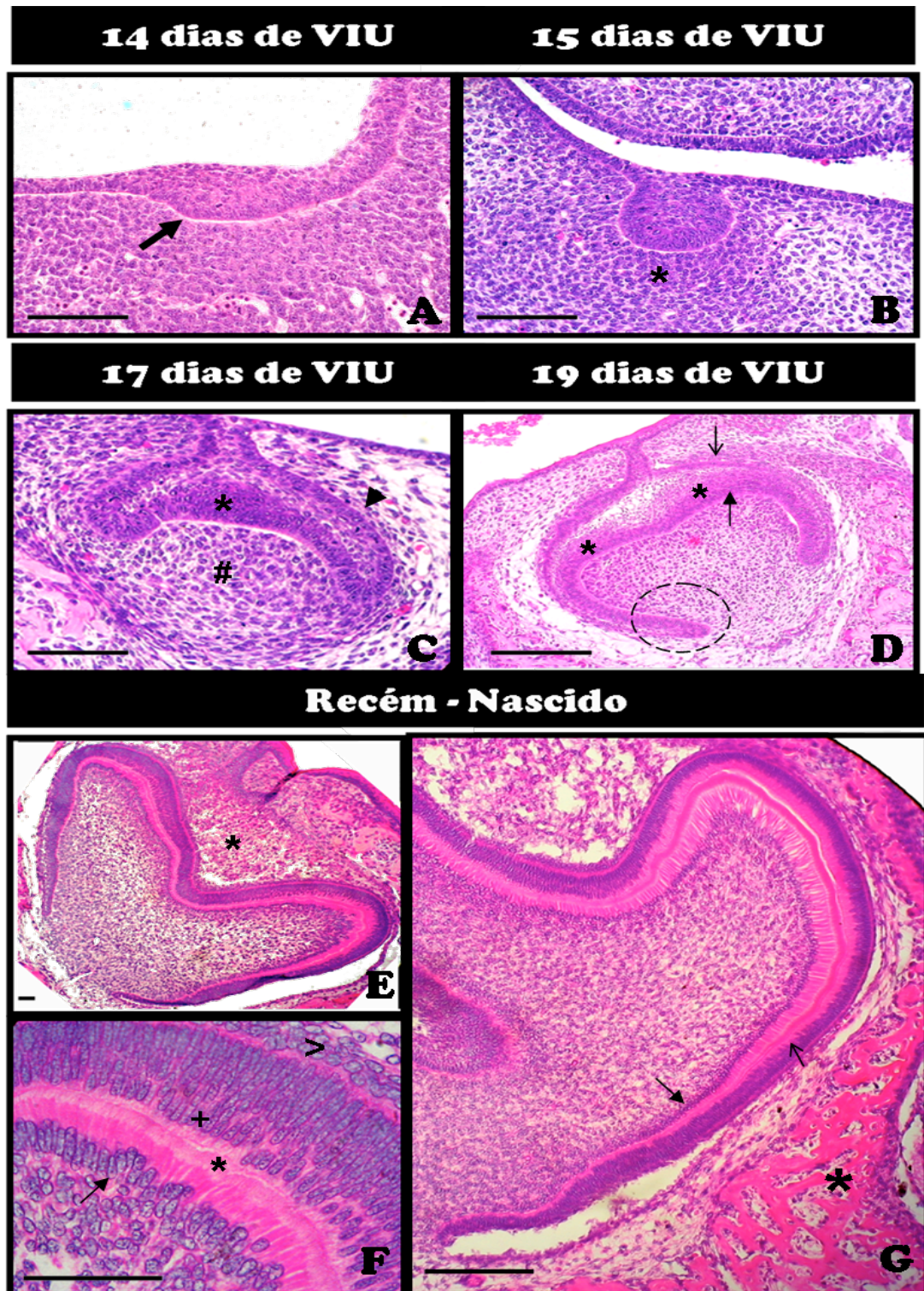


Fig. 1: Etapas iniciais do desenvolvimento do 1º molar do rato. Coloração por H/E. **A:** Estágio de lâmina dentária (400x). Seta (→): membrana basal. **B:** Estágio de Botão (400x) Asterisco (*): condensação ectodérmica. **C:** Estágio de Capuz (400x). Asterisco (*): nó-de-esmalte, triângulo (Δ): folículo dentário, suspenso (#): papila dentária. **D:** Estágio de Campânula Precoce (200x). Asterisco (*): nó-de-esmalte, flecha (→): epitélio externo, seta (→): epitélio interno, (círculo pontilhado): alça cervical. **E:** Estágio de Campânula Tardia/Modelado da Coroa (100x). Asterisco (*): retículo estrelado. **F:** Ponta da cúspide (1000x). Seta (→): odontoblastos, asterisco (*): dentina, cruz (+): ameloblastos, maior que(>): estrato intermediário. **G:** Alça cervical, terço médio e ponta de cúspide (200x). Seta (→): pré-odontoblastos, flecha (→): pré-ameloblastos, asterisco (*): cripta óssea. Barras de A, B, C, D, E e G: 100 µm, em F: 50 µm

Objetivo

“Se o homem não sabe a que porto se dirige, nenhum vento lhe será favorável.”

(Lucius Annaeus Sêneca)

Objetivo Geral:

Avaliar, em ratos, os efeitos na odontogênese devido à ingestão de etanol a 25% durante a gestação e lactação.


Objetivos Específicos:

➤ Verificar a existência ou não de diferenças morfológicas nos germes dentários dos primeiros molares inferiores, nos estágios de lâmina dentária (F14), broto (F15) casquete (F17), campânula precoce (F19) e campânula tardia/modelado de coroa (recém-nascidos) entre animais cujas mães ingeriram etanol ou água durante a gestação.

➤ Verificar a existência ou não de diferença na expressão da proteína da MEC - Laminina - nos germes dentários dos primeiros molares inferiores, nos estágios de campânula precoce (F19) e campânula tardia / modelado de coroa (recém-nascidos) entre animais cujas mães ingeriram etanol ou água durante a gestação.

➤ Verificar a existência ou não de diferença no tamanho dentário dos primeiros, segundos e terceiros molares inferiores e superiores entre animais de 40 dias de vida PN cujas mães ingeriram etanol ou água durante a gestação e lactação.

Artigos



*“Então, eu olvidando, um pouco, o mundo,
Da natureza a voz, somente, ouvindo,
Ao Divo Criador – alcei minh'alma!”*

(Evaristo Nunes Pires)



Referências nos padrões da revista Archives of Oral Biology

A INGESTÃO DE ETANOL DURANTE A GESTAÇÃO PROVOCA MODIFICAÇÕES MORFOLÓGICAS E DIMINUIÇÃO DA EXPRESSÃO DA LAMININA NOS GERMES DENTÁRIOS DA PROLE - UM ESTUDO EM RATOS.

Letícia Westphalen Bento

Fernando Borba de Araujo

Anna Christina Medeiros Fossati

Resumo:

Objetivo: Avaliar os aspectos morfológicos e a expressão da laminina em germes dentários de ratos provenientes de fêmeas que ingeriram etanol durante a gestação. **Método:** Foram utilizadas ratas Wistar divididas em dois grupos: Grupo Teste (GT), que ingeriu Etanol a 25% *ad libitum* antes e durante a gestação e Grupo Controle (GC), que ingeriu água *ad libitum*. Foram utilizadas 3 fêmeas do GT e 2 do GC para análise dos seguintes estágios: lâmina dentária, broto, casquete e campânula tardia e 2 ratas do GT e 2 do GC para campânula inicial. Na análise morfológica, cortes dos germes dentários dos primeiros molares inferiores foram corados pela técnica da hematoxilina e Eosina (H/E) e Tricrômico de Masson e observados em microscópio de luz. Para a análise da expressão da Laminina, foi realizada a técnica imunoistoquímica enzimática nos animais de 19 dias vida intra-uterina (VIU) e recém-nascidos (RN). As imagens foram capturadas e a porcentagem de área marcada foi estabelecida utilizando o software Image J 1.38x. **Resultados:** Verificaram-se, no GT, alterações morfológicas epiteliais e atraso no desenvolvimento nos estágios de lamina e broto, mas não em casquete e campânula precoce. Em campânula tardia, observou-se aparente atraso na histodiferenciação e, conseqüentemente, na secreção de tecidos dentários. Quanto à Laminina, observou-se uma menor área marcada nos animais do GT. **Conclusão:** A ingestão de etanol a 25% *ad libitum* durante a gestação, em ratos,

pode alterar morfológicamente os germes dentários da prole e sugere-se que a diminuição na expressão da Laminina possa estar envolvida nestas alterações.

Palavras-chave: Etanol, Odontogênese, Germe Dentário, Laminina, Rato

Introdução:

O consumo de álcool durante a gravidez pode ocasionar no feto efeitos físicos, mentais e comportamentais definidos sob o termo “espectro de desordens do álcool fetal” (FASD). As alterações crânio-faciais, descritas na literatura, ocasionadas por essa condição são: microcefalia, testa longa e estreita, hipotelorismo, hipoplasia maxilar e mandibular, fissuras palpebrais estreitas, *filtrum* labial indistinguível, vermelhão do lábio superior estreito e alongado, nariz em sela, aplasia da úvula e desordens têmporo - mandibulares. Em relação às alterações dentais, foram relatadas, em alguns estudos observacionais em humanos: más oclusões, assimetrias, dentes pequenos, hipoplasia de esmalte, apinhamentos, mordida cruzada, transpasse horizontal aumentado, atraso nas trocas dentárias, dentes ausentes ou mal posicionados (1-10).

Por serem observacionais e retrospectivos, os estudos em humanos sobre a teratologia do álcool possuem algumas limitações. Existe a dificuldade de relacionar os achados clínicos com a exposição pré-natal ao etanol devido à falta de informações completas a respeito do consumo de álcool durante o período gestacional, ao uso concomitante de drogas lícitas e/ou ilícitas, às variabilidades da dieta, às variáveis genéticas e à dificuldade de se obter uma amostra significativa de casos (2, 5, 6, 9, 11, 12).

Em vista disso, modelos animais têm sido utilizados no estudo da teratologia do álcool devido à vantagem de controlarem essas variáveis e da possibilidade de realizar estudos experimentais (6). O modelo animal mais utilizado tem sido o rato (2, 7, 9, 11, 13-17). Os molares do rato iniciam o seu desenvolvimento a partir do 13º dia de vida intra-uterina (VIU) com o aparecimento da lâmina dentária do primeiro molar que termina a formação de sua coroa no 11º dia PN. Alguns estudos em animais já foram realizados no intuito de elucidar os efeitos da ingestão de álcool pré-natal na odontogênese e os resultados mostraram alterações morfológicas e moleculares

(14,18-20). Entretanto, os mecanismos pelos quais o etanol atua nestes processos ainda não foram completamente esclarecidos.

Özer *et al* (2000) (21) ao avaliarem os efeitos da exposição pré-natal ao álcool na migração neuronal, neurogênese e mielinização, sugeriram que outras moléculas de adesão ou da matriz extracelular (MEC), tais como a Laminina deveriam ser investigadas.

A Laminina encontra-se presente, basicamente, na membrana basal (MB), que é uma fina camada de MEC que separa o epitélio do mesênquima dando suporte às células, determinando sua polaridade, fornecendo sinais para proliferação, migração, diferenciação, atuando como um filtro seletivo, sendo importante para o desenvolvimento (22-28). Ela apresenta-se em 15 isoformas que se expressam de acordo com o órgão e estágio de desenvolvimento.

Liesi (1997) (29) verificou, em um estudo *in vitro*, o efeito do etanol na interação das células neuronais com a Laminina. Os resultados mostraram que os neurônios tratados com etanol degradaram seu substrato de Laminina, ligaram-se excessivamente aos peptídeos neuroativos derivados da cadeia $\beta 2$ e os liberaram em seu meio de cultura. Estes resultados indicam que o etanol afeta a expressão de Laminina nos neurônios de ratos e pode aumentar sua atividade proteolítica.

A Laminina também possui uma importante função no desenvolvimento dentário. Alterações na sua expressão têm sido relacionadas com a presença de anormalidades nesse processo (22, 30). Salmivirta *et al.* (1997) (31) demonstraram que as cadeias α da Laminina têm um padrão de distribuição único durante o desenvolvimento dentário e que ocorrem mudanças no padrão de expressão durante os estágios do desenvolvimento. Tanto o epitélio quanto o mesênquima dental produzem cadeias α de Laminina. O mRNA das cadeias $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 4$ está expressos no mesênquima dental enquanto as cadeias $\alpha 3$ e $\alpha 5$ são encontradas no epitélio. O mRNA da cadeia $\alpha 5$ está largamente expresso no epitélio dental, e a proteína correspondente, igualmente distribuída ao longo da MB dentária durante todo desenvolvimento embrionário. Portanto, os autores sugerem que a cadeia $\alpha 5$ seja a principal cadeia α da Laminina da MB dentária. Fukumoto *et al.* (2006)(22), contribuíram para essa hipótese, estudando camundongos mutantes para os genes

codificadores dessa proteína e verificando que esses animais desenvolveram dentes pequenos e com cúspides alteradas.

Com o objetivo de elucidar os efeitos do etanol pré-natal na odontogênese, este estudo avaliou os aspectos morfológicos e a expressão da Laminina em germes dentários de ratos provenientes de fêmeas que ingeriram etanol durante a gestação.

Materiais e Métodos:

Considerações Éticas:

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Animais:

Para este estudo foram selecionadas 60 ratas da linhagem Wistar de 60 dias provenientes do C.R.E.A.L. do ICBS-UFRGS. Os animais foram mantidos em temperatura e umidade controladas e em ciclo de claro e escuro de 12 horas. Para a alimentação, foi utilizada a ração convencional Nuvilab CR1 *ad libitum*. Os animais foram aleatoriamente divididos em 2 grupos: GC, composto de 20 ratas que receberam água *ad libitum* e GT, composto por 40 ratas, que receberam etanol a 25% *ad libitum* (14, 15). A concentração de etanol foi aumentada semanalmente, tendo sido iniciada com 10% na primeira semana e passando para 15%, 20% e 25% nas semanas seguintes. A solução de 25% foi mantida por mais uma semana, quando então as ratas foram colocadas para acasalamento, com ratos não tratados, de aproximadamente 90 dias. Este processo foi realizado diariamente, durante duas semanas ao final da tarde. Na manhã do dia seguinte, um esfregaço vaginal era realizado até às 8h30min. A presença de espermatozoides configurava a prenhez e esse dia era estabelecido como dia 0 (zero) da gravidez.

Coleta e Processamento das Peças

Após anestesia, as fêmeas prenhes foram submetidas à eutanásia por deslocamento cervical nos dias 14, 15, 17 e 19 de gestação e tiveram seus fetos removidos. Para cada tempo de desenvolvimento, foram coletados todos os fetos de 3 fêmeas do GT e de 2 fêmeas do GC, exceto no dia 19 de VIU em que foi coletado fetos

de 2 ratas do GT e de 2 do GC. As amostras corresponderam aos estágios de desenvolvimento do primeiro molar referente à lâmina dentária (F14), broto (F15), casquete (F17) e campânula inicial (F19), respectivamente. Recém-nascidos (RN) foram submetidos à eutanásia por decapitação para análise do estágio de campânula tardia/modelado da coroa. Para tanto se coletou todos os filhotes da ninhada de 3 fêmeas do GT e de 2 do GC. A fixação dos fetos removidos e dos recém-nascidos foi realizada com Metacarn¹ durante 3 horas a temperatura ambiente (TA) e, logo após, as peças foram submetidas ao processamento histológico de rotina e incluídas em Paraplast. Após fixação e hidratação, as peças provenientes dos animais de 19 dias de vida intra-uterina (VIU) e recém-nascidos foram descalcificadas com ácido etileno diamino tetra-acético (EDTA) a 4,13% por aproximadamente 4 e 7 dias, respectivamente, antes de serem processadas e incluídas.

Análise Morfológica:

Foram realizados cortes seriados, frontais, de 5 µm, de 1 feto de cada fêmea, em toda a extensão da região onde se encontrava os germes dentários dos primeiros molares inferiores. Após coloração pela técnica da hematoxilina e Eosina (H/E), foram observadas:

- A organização e o estado de diferenciação das células constituintes do espessamento epitelial nos estágios de lâmina dentária e broto.
- A organização das porções constituintes do órgão do esmalte nos estágios subseqüentes do desenvolvimento.
- A presença ou ausência da MB entre o epitélio interno e a papila dental e a organização e o estado de diferenciação celular da condensação ectomesenquimal papilar e folicular.

Em cada corte frontal apareceram de 1 a 4 germes dentários do primeiro molar, entretanto, apenas os germes inferiores mais íntegros e representativos da fase avaliada entraram nas análises (32). As observações dos campos foram realizadas em 100X, 200X, 400X e 1000X com um microscópio de luz binocular Zeiss-Standart 20 por um examinador seguindo o princípio de cegamento e treinado por um profissional

¹ Solução de Carnoy modificada: 60% metanol, 30% clorofórmio e 10% ácido acético glacial.

especialista da área. Em alguns casos, para confirmar os achados, os demais fetos da mesma ninhada foram avaliados.

Nos animais recém-nascidos do GT e GC, para evidenciar a secreção dos tecidos dentários, foi realizada em alguns cortes a técnica de tricrômico de Masson.

Análise da Expressão da Laminina:

Para esta análise foi utilizada a técnica da Imunoistoquímica Enzimática (Avidina – Biotina - Peroxidase) em um animal de 19 dias de VIU do GT e outro do GC. Nos recém-nascidos, foram selecionados 1 animal de cada ninhada pertencente as 3 ratas do GT e as 2 do GC, totalizando 3 cortes para o GT e 2 para o GC nessa etapa. Os cortes coletados foram frontais de 5 µm, próximo às pontas das cúspides do primeiro molar inferior. Estes, foram submetidos à desparafinização, com banhos seqüenciais de Xilol, e à hidratação, com banhos seqüenciais em etanol de concentrações decrescentes. Antes da reação imunoistoquímica, realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena com 4 trocas de solução H₂O₂ a 10% por 5 minutos. Após este passo, procedeu-se a digestão enzimática com tripsina a 0,002%, diluída em tampão fosfato (Pb) a 37° por 5 minutos e o bloqueio dos sítios antigênicos inespecíficos com soro não-imune do animal hospedeiro do anticorpo secundário na concentração de 1:10 diluído em PB/triton 0,2% por 1 h. A seguir, realizou-se a incubação do anticorpo primário Anti-Pan-Laminina (Sigma) diluído em PB/triton 0,2% na concentração de 1:100, overnight (ON). O anticorpo secundário utilizado foi IGg de Cabra biotilado na concentração de 1:200, diluído em PB/triton 0,2% a TA, por 1h30min. Em seguida, foi realizada a incubação do complexo terciário por 2 h. A revelação foi realizada com diaminobenzidina (DAB) e a contra coloração com hematoxilina de Harris. A comparação entre o GT e o GC foi realizada entre cortes da mesma bateria de imunoistoquímica sendo que a reação foi realizada em triplicata, obtendo-se resultado semelhante nos três experimentos.

O controle negativo consistiu da omissão do anticorpo primário e o controle positivo, da observação da marcação das fibras musculares (33), vasos (34) e nervos (26) no mesmo corte (controle positivo interno).

Nos germes dentários, observou-se a localização da marcação da proteína e a existência de diferença na porcentagem de área marcada entre o GT e o GC. Em cada

corte frontal apareceram de 1 a 4 germes dentários do primeiro molar, entretanto, entraram nas análises apenas os germes inferiores mais íntegros e representativos da fase avaliada (32).

As observações dos campos foram realizadas em 100X, 200X, 400X e 1000X com um microscópio de luz binocular Zeiss-Standart 20 por um examinador treinado. Para estabelecer a quantidade de marcação, as imagens foram capturadas por uma câmera Olympus (modelo QColor 5, Coolet, RTV) acoplada a um microscópio binocular Olympus (modelo CX41RF) e a um computador Dell (modelo Dimension 5150) da Unidade de Morfometria e Histometria da Patologia da FO-UFRGS². As imagens foram salvas em formato TIFF, com resolução de 96dpi e dimensão de 1024 x 768 pixels germe dentário (germe dentário) ou 1920 por 2560 pixels (demais imagens).

Nos animais recém-nascidos do GT e do GC, foram capturadas, em aumento de 100x, a região que contemplava o germe dentário e área circunvizinha e a região exclusivamente do germe dentário. Em aumento de 400x, foi capturada a região das cúspides e da alça cervical. Nas lâminas dos animais de 19 dias de VIU, do GT e do GC foi capturada apenas a região que contemplava o germe dentário e área circunvizinha, em aumento de 200x.

A porcentagem da área marcada pela laminina foi estabelecida em todas as imagens descritas acima. Para tanto, utilizou-se o software Image J 1.38x (35, 36), por um examinador previamente treinado, cuja calibração foi testada por meio do coeficiente de correlação intraclasse utilizando o software SPSS versão 13 e obtendo o valor de 0,93. Através de um plug-in específico para evidência da imunistoquímica com DAB/H, este programa decompõe a imagem em 3 partes, a saber: DAB, Hematoxilina e fundo. Após este processo, o software calcula a porcentagem da área de cada uma das 3 porções obtidas a partir da imagem original.

Resultados:

Nesse estudo, 20 ratas do GC e 40 do GT foram colocadas para acasalamento. Das 20 (100%) ratas iniciais do GC, 17 (85%) fêmeas engravidaram e 16 (80%) desenvolveram embriões. Entretanto, 6 (30%) foram perdidas durante o processamento histológico. Portanto, 10 (50%) participaram do estudo. No GT, das 40

² Edital Fapergs Proap 04/2005 processo 0410882, sob responsabilidade do Prof. Dr. Manoel Sant'anna Filho

(100%) ratas iniciais, apenas 24 (60%) engravidaram e dessas, 18 (45%) desenvolveram embriões. Entretanto, 1 (2,5%) apresentou fetos atrofiados, em 1(2,5%) caso houve canibalismo dos filhotes e 2 (5%) foram perdidas durante o processamento histológico. Portanto, 14 (35%) fêmeas participaram do estudo. (fig.1)

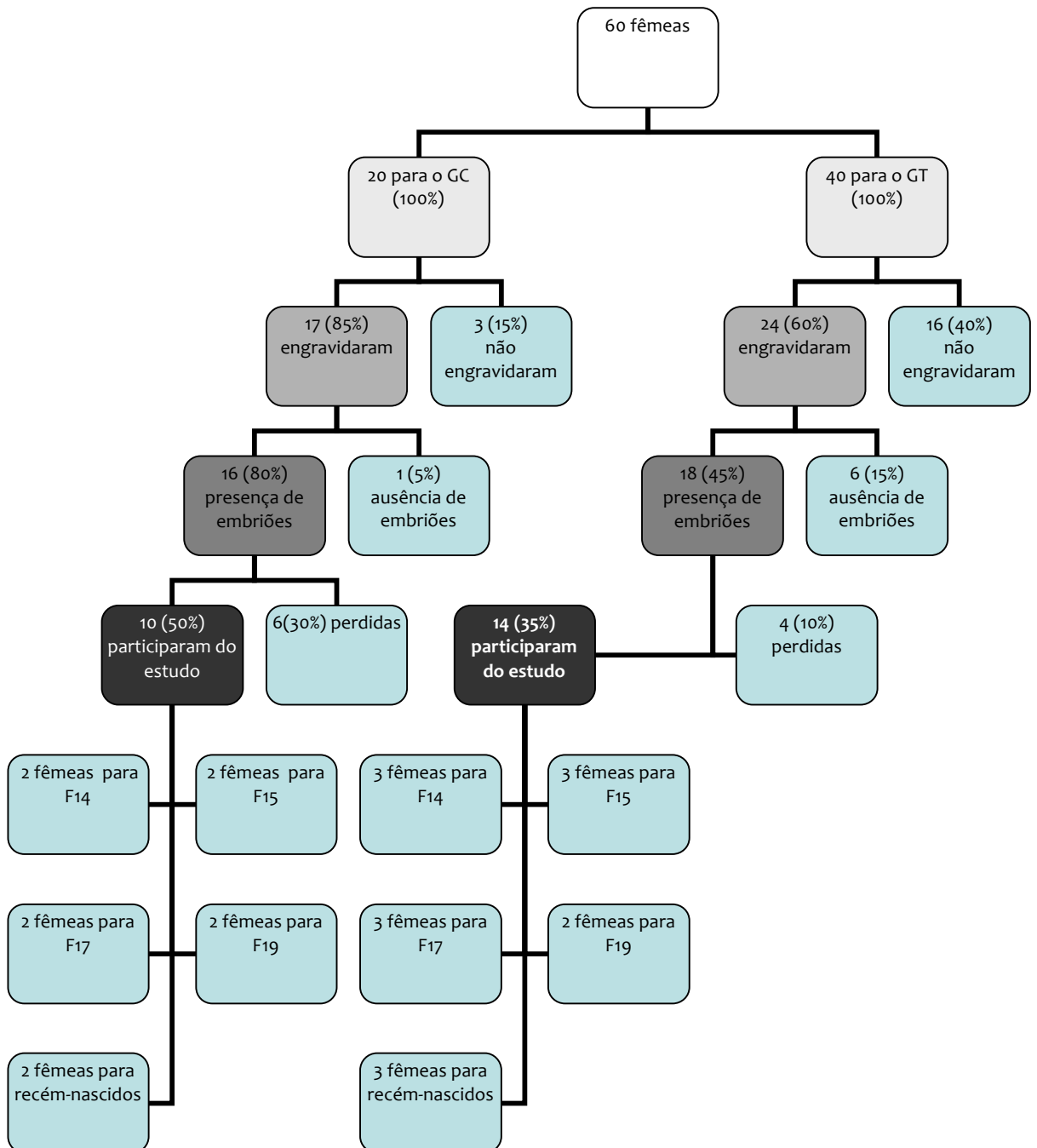


Fig.1: Organograma da distribuição das fêmeas no GT e no GC

Análise Morfológica:

As alterações morfológicas encontradas nos germes dentários dos animais provenientes das fêmeas do GT ocorreram em alguns filhotes, ou seja, não atingiu a ninhada da mesma forma.

Estágio de Lamina Dentária (14 dias de VIU)

No GC, esta fase caracterizou-se por um espessamento epitelial no local onde se desenvolveria o germe. As células epiteliais próximas à cavidade bucal eram pavimentosas e apareceram, em alguns espécimes, posicionadas paralelamente à membrana basal. No centro, as células tinham aspecto alongado, com núcleo grande e estavam bem condensadas. As células próximas ao mesênquima estavam perpendiculares à membrana basal, que estava evidente em alguns cortes. Havia uma condensação de células ectomesenquimais indiferenciadas em torno do epitélio, e abaixo dessa condensação observou-se a presença de vasos sanguíneos. (fig.2A)

No GT, o espessamento epitelial era menor e as células presentes não apresentavam disposição e arranjo semelhante ao GC na maioria das amostras avaliadas. Tanto a MB como a condensação ectomesenquimática se apresentaram semelhante em ambos os grupos. (fig.2B)

Estágio de Broto (15 dias VIU)

No GC, a porção epitelial do germe dentário se caracterizou por um formato esférico, onde as células próximas ao mesênquima estavam mais condensadas, perpendiculares à MB e com núcleos alongados. As células mais centrais possuíam núcleos mais arredondados e estavam mais espaçadas. A MB estava bem evidente entre o epitélio e a condensação ectomesenquimática que contornava a saliência epitelial. (fig.2C)

No GT, os botões epiteliais apresentavam tamanho reduzido com um aspecto mais indiferenciado de suas células, que não apresentavam distinção entre aquelas localizadas no centro e as da periferia da estrutura epitelial. (fig.2D)

Estágio de Casquete (17 dias de VIU)

No GC, nesta fase, foi possível diferenciar as partes do germe dentário: Papila dentária, folículo dentário e o órgão do esmalte, composto por epitélio externo, epitélio interno com a evidência ou não do nó de esmalte. O epitélio externo estava composto por células colunares baixas. O epitélio interno foi composto por células colunares que apresentavam núcleo alongado, central e pouco polarizado. Algumas figuras de mitose puderam ser observadas nas extremidades do órgão epitelial e entre o epitélio interno e a papila dental, a MB estava evidente. A papila foi constituída por células mesenquimais indiferenciadas com muitos vasos e figuras de mitose. Estas, também foram observadas no folículo que era composto de células alongadas com a presença de vasos próximos à base do germe. Também foi possível visualizar indícios de matriz óssea ao redor dos germes dentários. (fig.3A e 3B)

Nesse estágio os germes dentários dos animais de GT e GC apresentaram aspectos morfológicos semelhantes. (fig.3A e 3B)

Fase de Campânula Precoce (19 dias de VIU)

Neste estágio, em ambos os grupos, foi possível observar, além das estruturas já citadas, o extrato intermediário, retículo estrelado, nó de esmalte secundário e alça cervical. Apareceram os indicativos do local das futuras cúspides e o germe estava adquirindo a forma de um dente molar. O epitélio externo constituiu-se de células cuboidais baixas ou altas que se tornavam achatadas em direção cervical e observou-se a presença de vários vasos no folículo dentário, próximos a essa estrutura. O epitélio interno era composto por células colunares de núcleo central sem indicativo de diferenciação celular. O extrato intermediário caracterizou-se por 2 a 3 camadas de células mais achatadas sobre o epitélio interno, e o retículo estrelado, por células dispersas ligadas por junções unitivas. A presença do nó- de- esmalte secundário foi identificada em alguns germes dentários. A membrana basal estava evidente entre o epitélio interno e a papila dental. A papila foi composta por células indiferenciadas posicionadas de maneira dispersa com a presença de muitos vasos sanguíneos. O folículo foi composto de células pavimentosas, localizadas entre a cripta óssea agora mais desenvolvida e o germe dentário. Na cripta óssea foi possível observar um grande número de osteoclastos. A alça cervical, união do epitélio interno e epitélio externo, caracterizou-se pela convergência em direção à papila. (fig.3C e 3D)

Também nesse estágio, o GT e o GC apresentaram aspectos morfológicos semelhantes. (fig.3C e 3D)

Estágio de Campânula Tardia / Modelado da Coroa (Recém-Nascidos)

No GC, neste estágio, já foi possível observar células diferenciadas, com núcleos polarizados e organizados em paliçada tanto na periferia da papila como no órgão do esmalte. Na região das cúspides, na periferia da papila dentária/polpa, já se observava uma camada de pré-dentina e de dentina mineralizada e a presença de muitos vasos sanguíneos na polpa central. As células da região da alça cervical, tanto epiteliais como mesenquimáticas, não estavam totalmente diferenciadas. O extrato intermediário estava bastante evidente, e o epitélio externo composto por células pavimentosas. O retículo estrelado encontrava-se acumulado entre as cúspides. O folículo era composto por células pavimentosas com a presença de vasos e um grande número de osteoclastos próximo à cripta óssea. (fig.4A e 4B)

Nesse estágio, no GT, as células epiteliais e ectomesenquimáticas, situadas na ponta das cúspides, não apresentavam sinais evidentes de diferenciação. A maioria dos animais avaliados apresentou pouca ou nenhuma secreção de tecido dentário no germe dentário do primeiro molar inferior quando comparados ao GC. (fig. 4C e 4D) Pela coloração de Tricrômico de Masson, verificou-se que os germes dentários do GT sugeriam ter menor tamanho do que aqueles do GC.(fig. 4E e 4F)

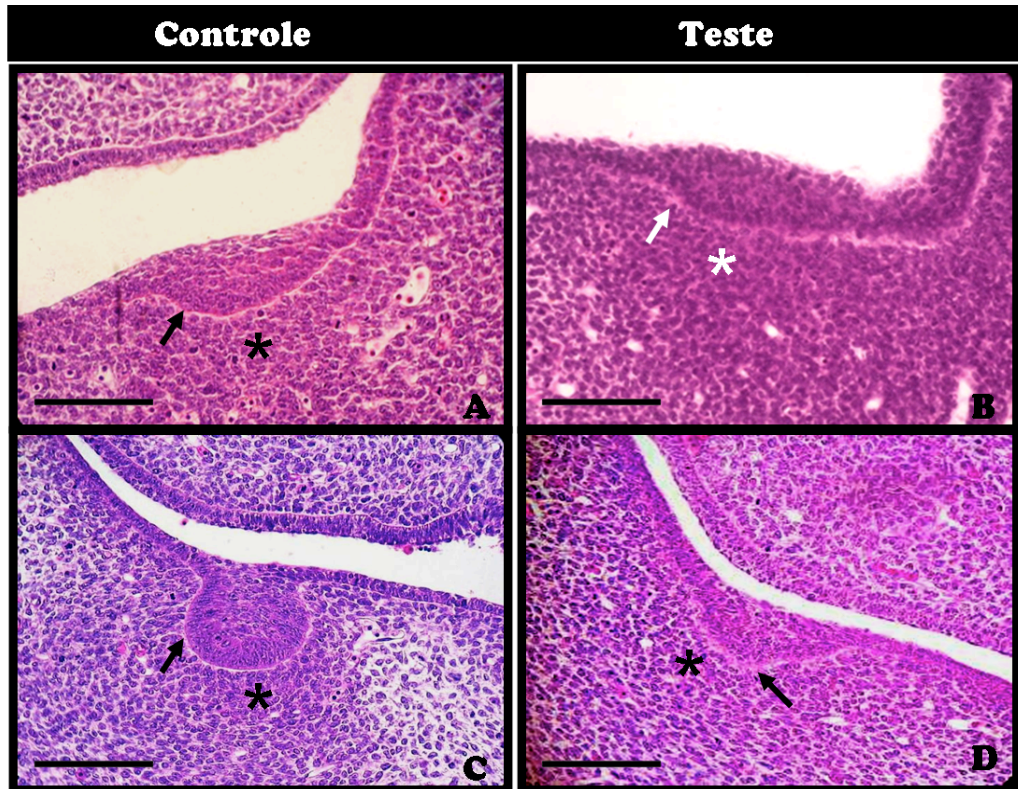


Fig.2: Aspectos morfológicos das fases iniciais do desenvolvimento dentário dos animais do GT e GC A e B- Estágio de lâmina dentária -14 dias de VIU (400x) C e D- Estágio de broto - 15 dias de VIU (400x) Asterisco (*) - Condensação ectomesenquimal, seta (→) - Membrana Basal. (Barras: 100 μ m) Observa-se, no GT, atraso no desenvolvimento e falta de organização das células,

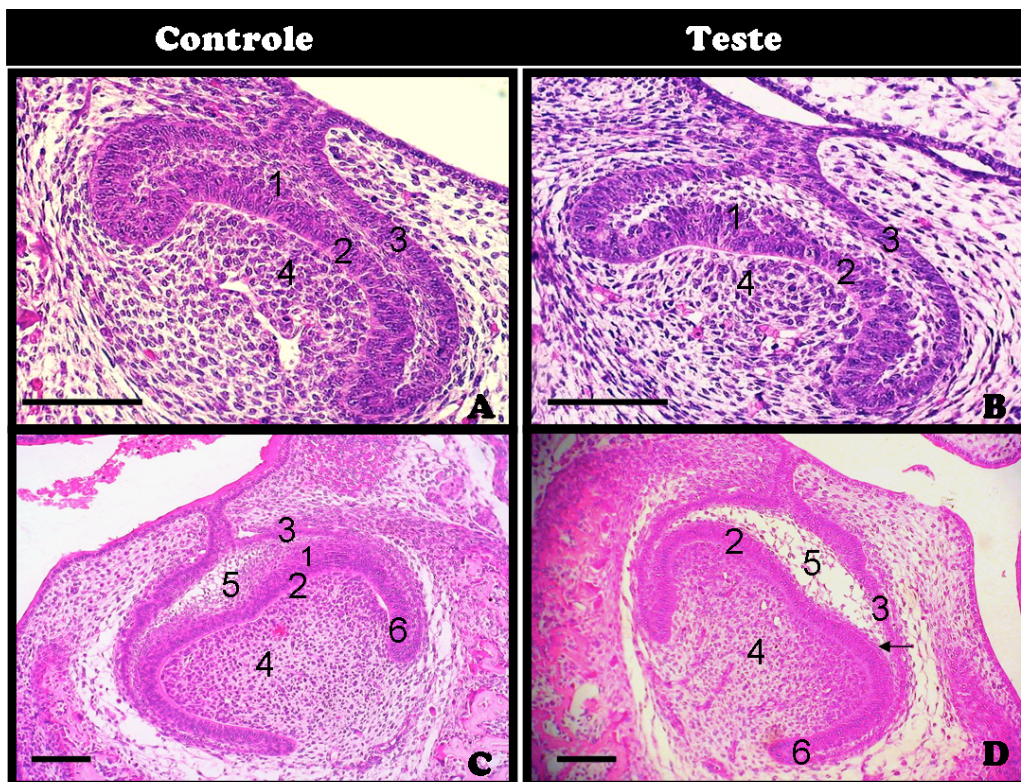


Fig.3: Aspectos morfológicos das fases iniciais do desenvolvimento dentário dos animais do GT e GC. A e B- Estágio de Capuz -17 dias de VIU (400x) C e D- Estágio de Campânula Precoce - 19 dias de VIU (200x) 1-Nó-de-esmalte, 2-Epitélio interno do órgão do esmalte, 3-Epitélio externo do órgão do esmalte, 4- Papila dentária, 5- Reticulo estrelado, 6 -Alça Cervical, seta (→) Estrato Intermediário. (Barras: 100 μ m). Nestes estágios não foram observadas diferenças morfológicas entre o GT e o GC.

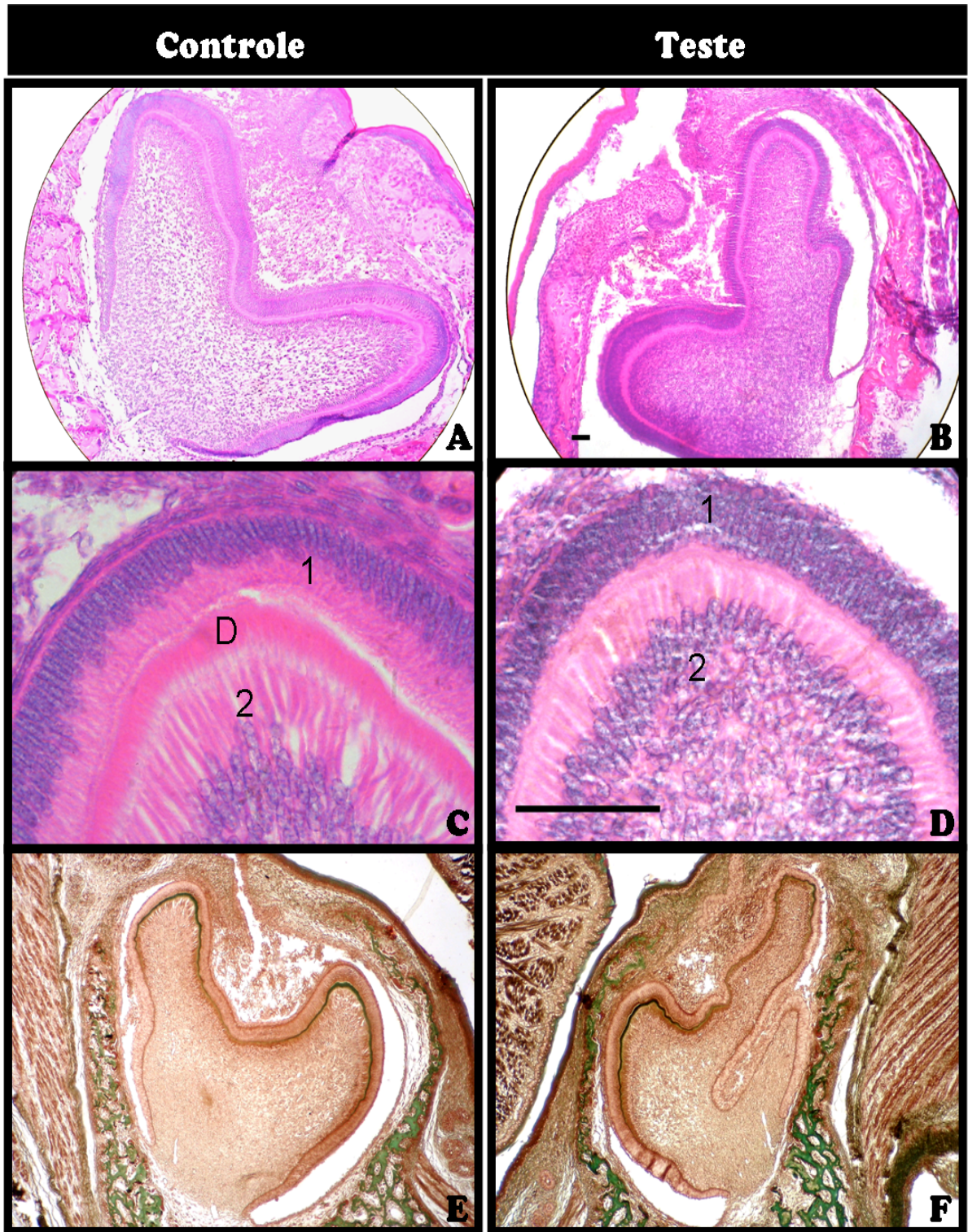


Fig.4: Aspectos morfológicos do germe dentário no estágio de Campânula Tardia/modelado da coroa. A e B aspecto geral do germe dentário (H/E -100x). C e D aspecto das pontas das cúspides (H/E-1000x). (1) – Ameloblastos, (2) Odontoblastos, (D) dentina -C- Observa-se ameloblastos e odontoblastos bem polarizados e uma camada de tecido secretado. D- Observa-se atraso na diferenciação dos ameloblastos e ausência de tecido secretado. E e F aspecto geral do germe dentário. Em verde, matriz óssea e dentina. (Tricrômico de Masson-100x). (Barras: A, B, E e F, 100 μ m; C e D, 50 μ m)

Análise da Expressão da Laminina

A observação da expressão da Laminina foi realizada nos germes dentários dos animais recém-nascidos devido ter sido, esta fase, a que apresentou alterações mais evidentes pela análise morfológica. Também realizou-se nos animais de 19 dias de VIU com o objetivo de verificar se, mesmo na ausência de alterações morfológicas evidentes, havia modificações na expressão da proteína.

Estágio de campânula Precoce (19 dias de VIU)

Nos germes dentários dos animais de 19 dias de VIU das fêmeas do GC, a proteína se mostrou espalhada nas células ectomesenquimáticas, nas células do epitélio interno do órgão do esmalte, no folículo dentário e na MB das células endoteliais dos vasos da papila e do folículo dental. (fig.5)

Nos germes dentários dos fetos do GT a imunomarcagem da Laminina foi menor, estando ausente em algumas estruturas, situação confirmada pela análise quantitativa. (Tabela1)

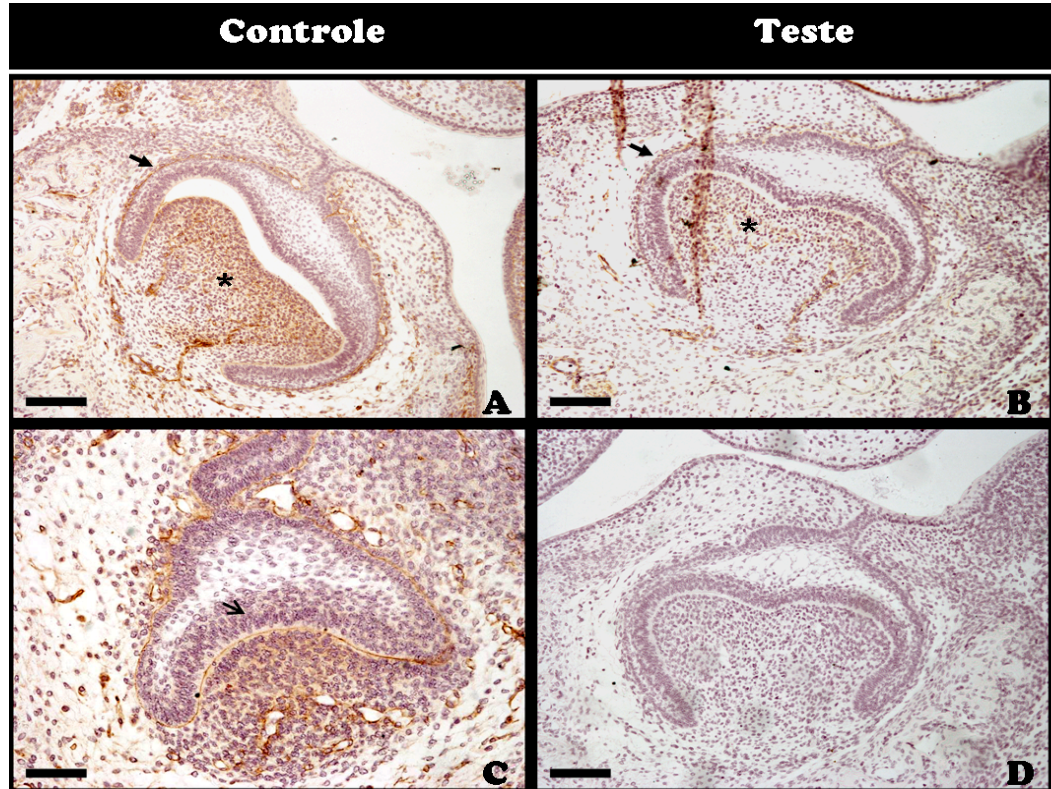


Fig.5: Expressão da Laminina nos germes dentários na fase de campânula precoce – 19 dias de VIU. A, B e C: Imunomarcagem da Laminina (200x), D: Controle negativo (200x), Asterisco (*) – Imunomarcagem da Laminina dispersa no ectomesênquima da papila dentária. Seta (→) – Imunomarcagem no folículo. Flecha (↗) – Imunomarcagem no Epitélio interno. (Barras: 100 µm). No GT observou-se pouca ou nenhuma imunomarcagem nas estruturas avaliadas.

Estágio de Campânula Tardia/Modelado da Coroa (recém-nascidos)

Nos germes dentários dos animais recém-nascidos das fêmeas do GC, a proteína se expressou concentrada em cervical, na interface entre o epitélio interno do órgão do esmalte e a papila dentária e entre o epitélio externo do órgão do esmalte e o folículo dental. Além disso, a Laminina estava presente na MB das células endoteliais dos vasos da papila, do folículo dentário e daqueles presentes no retículo estrelado. Intensa imunomarcagem da proteína foi observada no citoplasma dos pré-odontoblastos e odontoblastos (Fig 5 – C). Verificou-se a diminuição da concentração da proteína na MB nos locais onde havia presença de dentina secretada. No GT observou-se pouca ou nenhuma marcação em toda extensão do limite entre papila dentária e órgão do esmalte, bem como nas outras estruturas acima citadas (Fig. 1 – B,D e F).

A porcentagem da área marcada pela Laminina foi calculada através do programa Image J. Essa foi menor no GT quando comparado a campo correspondente no GC, em todas as imagens analisadas. (Tabela 2)

Tabela 1: Porcentagem da área marcada pela laminina nos germes dentários dos animais de 19 dias de VIU (campânula precoce)

Grupo	Amostra	Estrutura Avaliada / Aumento da Captura	
		germe dentário e áreas circunvizinhas (200X)	
GC	1	5,1%	
GT	1	2,7%	

Tabela 2: Porcentagem da área marcada pela laminina nos germes dentários dos animais recém-nascidos (Campânula Tardia)

Grupo	Amostra	Estruturas Avaliadas / Aumento da Captura			
		Germe dentário (100x)	Alça Cervical (400x)	Cúspide (400X)	Germe dentário e áreas circunvizinhas (100X)
GC	1	10,9%	6,5%	3,5%	9,4%
GC	2	9,7%	7,1%	4,9%	6,9%
GT	1	0	0	0,2%	0,7%
GT	2	1,5	0,5%	0	2,5%
GT	3	0	2,6%	1,7%	2,5%

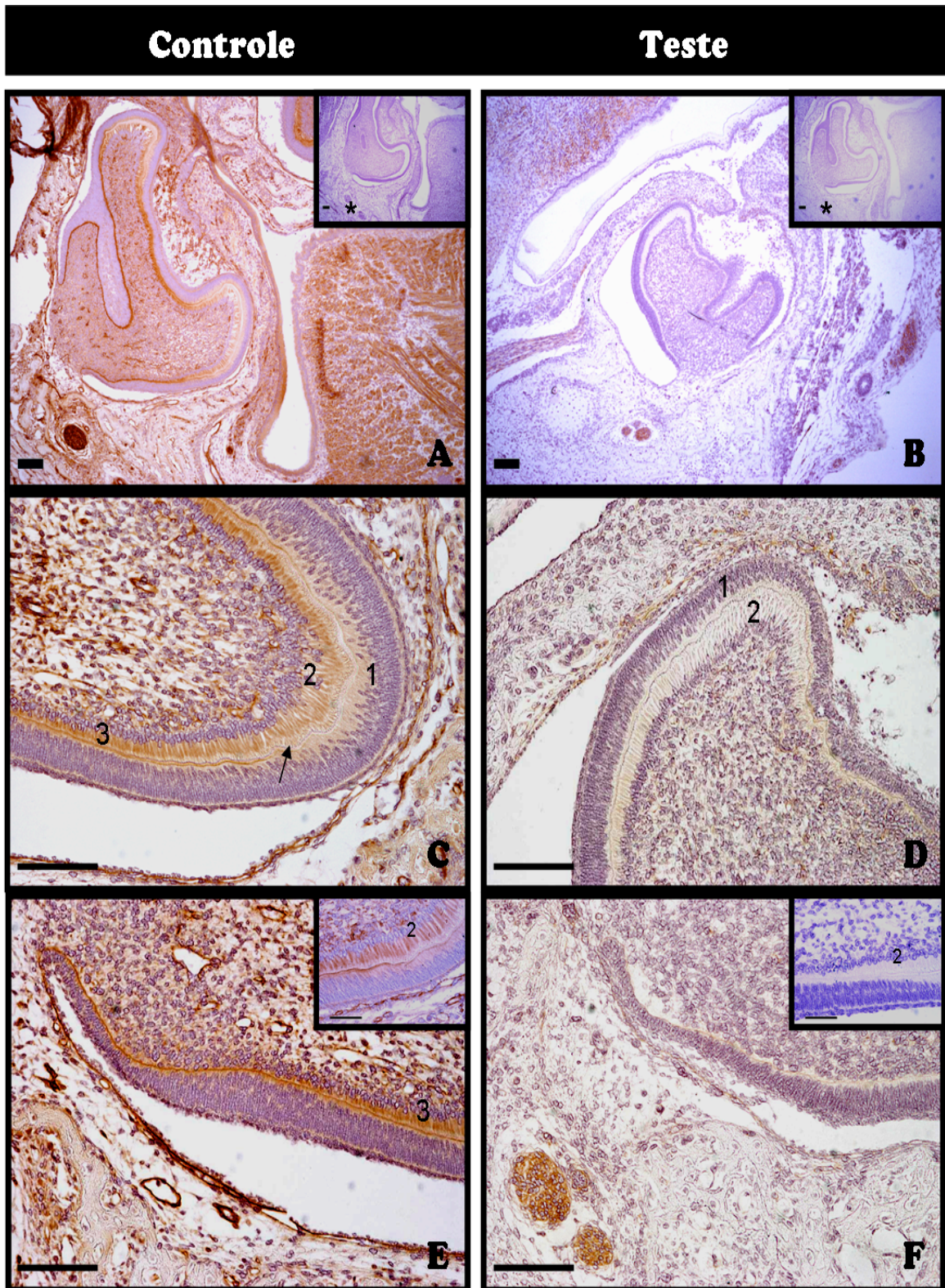


Fig.5 – Reação Imunoistoquímica nos germes dentários na fase de campânula tardia/modelado de coroa. A e B – germe dentário e áreas circunvizinhas. (100x) Asterisco (*) – Controle negativo C e D – Ponta das cúspides (400x) (1) – Ameloblastos, (2) Odontoblastos, (3) Pré-odontoblastos, seta (→) dentina. E e F – Alça cervical (400x) (3) Pré-odontoblastos. No detalhe: Terço médio (1000x) (2) Odontoblastos. (Barras: de A a F, 100µm; detalhe de E e F, 50 µm). No GT observou-se pouca ou nenhuma imunomarcção.

Discussão:

Os efeitos nocivos da ingestão crônica de etanol pela gestante se refletem no desenvolvimento de diversos órgãos. A formação craniofacial e dentária tem sido alvo de pesquisas que buscam trazer maiores esclarecimentos sobre os mecanismos celulares afetados. (1, 3, 5-7, 9-13, 37-40)

No presente estudo, um grande número de fêmeas que ingeriram etanol não engravidou quando acasaladas. Essa constatação está de acordo com as observações de Sant'Anna *et al.* (2005)(14) em pesquisa semelhante. Isto sugere uma alteração na fertilidade das fêmeas, induzida pelo consumo de etanol, como já havia sido sugerido por Van Thiel *et al.*(1978) (41). Além disso, no GT, houve um grande número de “falsa gravidez”, o que pode ser interpretado como prováveis reabsorções embrionárias. Este resultado está de acordo com os resultados encontrados em estudos anteriores (4, 6, 14, 19) Segundo Hadi *et al.* (1987) (7) essas reabsorções são equivalentes ao aborto em seres humanos. Acredita-se que o efeito nocivo do álcool seja de tal intensidade, que determine alterações celulares graves que levem à interrupção do desenvolvimento embrionário.

As alterações morfológicas encontradas no GT do presente estudo, não estavam presentes em todos os animais. Possivelmente, uma variabilidade genética tenha determinado a suscetibilidade de alguns animais à exposição ao etanol. Este fato está de acordo com as observações feitas em seres humanos que mostram que nem todos os filhos de mães que ingeriram álcool durante a gestação irão desenvolver anomalias e que, entre aqueles que as desenvolvem, haverá vários graus de comprometimento (5).

Campos e Duranza (1988)(19) realizaram um estudo em germes dentários de camundongos expostos ao etanol no período pré-natal. Os autores encontraram alterações de desenvolvimento dentário nos estágios precoces da odontogênese, principalmente relacionado ao órgão epitelial. Apesar da semelhança com os resultados obtidos no presente estudo, relacionados aos aspectos morfológicos do GC, as alterações descritas no GT não foram identificadas. Na fase de broto aqueles autores observaram mais de uma camada de células na camada basal e estas apresentavam alturas diferentes. No estágio em casquete, foi observado que o epitélio externo apresentava-se em algumas zonas estratificado e desorganizado. Estes aspectos não foram observados no presente estudo, podendo ser atribuídos a

diferenças entre os modelos animais utilizados ou a diferentes planos de cortes histológicos. Além disso, o etanol não foi administrado previamente ao acasalamento como foi realizado no presente estudo. Segundo Streissguth *et al.* (1980) (6), diferenças metodológicas entre os experimentos, relativo ao período em que o álcool é administrado durante à gestação, à dose, à forma de administração e à linhagem do animal utilizado, contribuem para algumas dificuldades em reproduzir resultados.

Foi possível observar nos animais do GT, por meio de cortes corados por H/E, que a lâmina dentária e o botão epitelial mostravam um aspecto diferente daquele apresentado pelo GC. As células epiteliais apresentaram um arranjo esparso e desorganizado, com uma progressão menos acentuada em direção ao ectomesênquima, o que determinou um aspecto pouco desenvolvido à porção epitelial.

Deve ser levado em conta que a proteína, codificada por importante gene, com função chave no desenvolvimento dentário, q *Sonic hedgehog* (Shh), tem sua expressão diminuída em embriões expostos ao etanol no período pré natal (36). O Shh é um membro da família de genes *Hedgehog* (Hh) que tem função chave durante a embriogênese e organogênese (43). No desenvolvimento dentário, a proteína codificada pelo gene atua nas interações epitélio-mesenquimais necessárias para deflagrar a odontogênese, bem como no crescimento, morfogênese e citodiferenciação durante o estágio de campânula (34,35). Em seu estudo, Fukumoto *et al.* (2006), observaram que a expressão de Shh estava diminuída no nó de esmalte dos germes dentários dos camundongos mutantes para Laminina $\alpha 5$. Segundo os autores, essa redução na expressão de Shh pelo epitélio dental causou uma proliferação reduzida do epitélio e do mesênquima o que contribuiu para o desenvolvimento menor do germe dentário.

Isso explicaria o fato de termos observado alterações nos estágios iniciais de lamina e broto, estágios em que o Shh tem fundamental importância. Já em casquete e campânula precoce, provavelmente, o gene estaria inativo, voltando a atuar nos estágios de morfodiferenciação e citodiferenciação ao nascimento.

Ahlgren *et al.*(2002) (36) já haviam demonstrado uma redução na expressão de Shh em embriões expostos ao etanol no período pré-natal.

Jiménez-Farfán *et al.* (2005) (20) avaliaram germes dentários de camundongos provenientes de fêmeas que ingeriram etanol a 25%. No estágio de campânula precoce verificaram um epitélio interno do órgão do esmalte com várias polaridades nucleares e perda do limite celular. Na papila dental, verificaram células sem sinal de diferenciação, com núcleos indefinidos e fragmentados. Liquefação celular e perda da membrana basal também foram observadas. Estes resultados diferem do presente estudo que não encontrou alterações morfológicas nesta fase do desenvolvimento. Esta divergência também pode estar relacionada com a diferença do modelo animal utilizado (6). Os autores observaram que no estágio de campânula tardia os germes dentários apresentaram atraso no desenvolvimento, evidenciado por um germe dentário menor com ausência de diferenciação celular e um padrão alterado de cúspide, sendo, esses resultados, semelhantes com os do presente estudo.

Tomados em conjunto, estes resultados apontam para interferências do etanol e seus derivados no metabolismo celular, causando alterações nas vias de sinalização, mecanismo fundamental para a organogênese (25).

É importante considerar que a odontogênese se deflagra por meio de sinalizações provenientes do ectoderma que, em seguida, são substituídas por sinais ectomesenquimais. Desta forma, moléculas sinalizadoras difusíveis ou constituintes da MEC, e seus receptores, interagem desencadeando cascatas moleculares que controlam as induções recíprocas entre os dois tecidos (44-48). Entre eles, a MEC forma a MB, que é uma camada especializada de moléculas, com funções biológicas e mecânicas importantes no controle do comportamento celular (30, 31). A MB dental consiste em colágeno tipo IV, Laminina, nidogenio/entactina, proteoglicana heparan sulfato, fibronectina e colágeno tipo III (32). As cadeias α_1 , α_2 e α_4 da Laminina encontram-se no mesênquima e a α_3 e α_5 são encontradas no epitélio. Os dois tecidos produzem a proteína (33). Portanto, é possível que alterações na composição da MB possam alterar a troca de informação entre o epitélio e o mesênquima prejudicando o desenvolvimento dentário.

No presente estudo, os germes dentários dos animais recém-nascidos foram escolhidos para a análise da expressão da Laminina, por terem sido estes germes dentários os que apresentaram alterações mais evidentes segundo as observações das lâminas coradas com H/E e tricrômico de Masson. As amostras de F19 (campânula

precoce) foram submetidas à mesma avaliação, com a finalidade de verificar se haviam modificações na expressão da proteína mesmo sem terem sido constatadas alterações morfológicas. Neste estudo, foi utilizado um anticorpo Anti-pan-Laminina capaz de reconhecer várias isoformas da proteína. Os germes dentários dos animais de F19 (campânula precoce) e recém-nascidos (campânula tardia) provenientes das fêmeas do GT apresentaram uma área marcada pela Laminina menor do que os correspondentes do GC. Este resultado sugeriu uma diminuição na expressão da proteína nos estágios de desenvolvimento avaliados e pode ser um dos fatores envolvidos nas alterações morfológicas observadas. Estes resultados corroboram com os de Liesi (1997) e Özer (2000) que já haviam demonstrado a diminuição da expressão da laminina devido à exposição ao etanol.

A imunomarcção pouco expressiva da proteína nos germes do GT sugeriu uma composição alterada da MB, conseqüência de um provável desarranjo no metabolismo das células responsáveis por sua síntese. Pode-se inferir, que tal alteração na deposição da laminina se reflita diretamente sobre a diferenciação celular, pois alguns estudos realizados em germes dentários de animais mutantes para diversas isoformas da laminina mostraram um padrão de alterações morfológicas bastante semelhante ao encontrado nos germes dentários dos animais expostos ao etanol no período pré-natal do presente estudo (22, 30, 33).

Yuasa *et al.* (2004) (33) avaliaram a função da Laminina α_2 no desenvolvimento dentário em camundongos mutantes para essa isoforma da proteína. Os animais mutantes homozigotos (-/-) apresentaram a superfície do esmalte mais fina e irregular e os túbulos dentinários bastante amplos devido à redução da sialofosfoproteína dentinária (DSPP) e da proteína da matriz dentinária (DMP), quando comparados aos heterozigotos (+/-) e aos animais normais (*wild-type*). Anormalidades no esmalte foram observadas no esmalte superficial, resultando em incisivos esbranquiçados. Este aspecto pode indicar uma hipoplasia / hipocalcificação do tecido - aspecto que foi descrito em pacientes com FAS (1). Provavelmente, a marcação incipiente da Laminina no presente estudo, observada em toda face dos fetos submetidos à ação do álcool também possa estar implicada nas alterações crânio-faciais características da síndrome. (dado não mostrado)

Em outras pesquisas genéticas, Salmivitra *et al.* (1997) (31) e Fukumoto *et al.* (2006) (22) demonstraram que as Lamininas de cadeia $\alpha 5$ também são essenciais para a morfogênese dentária. Em seu estudo, camundongos mutantes para os genes codificadores destas proteínas desenvolveram germes dentários pequenos e com o fenótipo das cúspides alterado. Além disso, apesar da invaginação do epitélio em direção ao ectomesênquima subjacente ter ocorrido, a proliferação do epitélio dental foi reduzida, sugerindo que a Laminina $\alpha 5$ está envolvida na proliferação celular.

Em 1998, Yoshida *et al.* (51) verificaram, através de hibridização *in situ* e imunofluorescência indireta, a presença de mRNA das subunidades da Laminina 5 em germes dentários de camundongos em várias etapas da odontogênese. No estágio de campânula precoce, a subunidade $\alpha 3$ estava restrita ao epitélio externo e ao epitélio interno. Nas regiões da alça cervical, sinais intensos para as subunidades $\beta 3$ e $\gamma 2$ foram observados. Da mesma forma que no presente estudo, utilizando diferentes experimentos, alguma imunomarcagem foi visualizada no epitélio interno, mas não nas células do retículo estrelado e do estrato intermediário. Na fase de campânula tardia, foi observado, nos pré-ameloblastos e ameloblastos, acúmulo de mRNA das três subunidades. Este resultado concorda com os achados da presente pesquisa, onde foi observada uma suave imunomarcagem nessas células. Os autores concluem que a diminuição da Laminina-5 no epitélio interno acompanhada por aumento da atividade mitótica e histogênese pode estar relacionado com a diferenciação celular, pois na região da bainha epitelial de Hertwig onde nenhum ameloblasto se diferencia, a Laminina-5 está sempre presente. Os resultados encontrados neste trabalho concordam com esta afirmativa, pois apesar de não ser possível afirmar qual cadeia de determinada isoforma de Laminina estava sendo imunomarcada, a expressão da proteína foi muito intensa e concentrada nas regiões próxima à alça cervical, tornando-se difusa próxima às cúspides onde a diferenciação estava completa.

Estes resultados reforçam a idéia de que a alteração da expressão da Laminina pode estar envolvida com as anomalias no desenvolvimento dentário devido à exposição pré-natal ao etanol.

Em relação à distribuição da Laminina, a localização e o padrão de marcação observados no GC está de acordo com estudos anteriores (25, 34). Della Coletta *et al.* (1997) (34) analisando germes dentários de animais recém-nascidos, verificaram que a

Laminina estava distribuída de forma contínua na MB do epitélio interno do órgão do esmalte, exceto na região onde havia secreção da matriz orgânica de dentina, o que coincidia com a diferenciação dos ameloblastos. Segundo os autores, a degradação da MB pode ser o fator desencadeador da diferenciação das células do epitélio interno em ameloblastos.

No presente estudo, também foi verificada a diminuição da expressão da proteína na região das cúspides onde se inicia a deposição dos tecidos dentários, o que denota, além da renovação constante da MB, uma provável destruição desta estrutura, o que permitiria o contato entre a dentina recém secretada e a célula epitelial em final de diferenciação. Neste momento, ao contrário do estágio anterior, em que as células epiteliais em contato com a MB e as ectomesenquimáticas parecem ser a fonte da proteína, foi possível observar a imunomarcagem citoplasmática intensa dos pré-odontoblastos e odontoblastos. Estas observações sugerem que a Laminina atua na histodiferenciação pois, em estágio mais avançado do desenvolvimento, ela deixa de estar dispersa no ectomesênquima para encontrar-se concentrada no citoplasma das células periféricas da papila em estágio avançado de diferenciação – pré-odontoblastos/odontoblastos. Essas células parecem ser, nessa etapa, as principais responsáveis pela síntese da Laminina. Esta é uma situação conveniente, já que o pré-odontoblasto utiliza parte da MB na constituição da primeira camada de dentina. Além disso, a intensa síntese de Laminina que parece ocorrer, pode ser necessária para sua diferenciação final em célula adulta.

Outros possíveis mecanismos das alterações no germe dentário já foram demonstrados, tais como: diminuição na expressão do *Epidermal Growth Factor* (EGF) (14), aumento da expressão dos receptores para este fator de crescimento (20) e alteração no padrão de sialização (18). Em relação às anomalias craniofaciais, já foi sugerido a diminuição da proteína Shh e subsequente morte das células da crista neural (37).

Reunindo os resultados relacionados à expressão do EGF e seus receptores, com os obtidos no presente estudo, podemos sugerir que a expressão alterada da Laminina, pela ingestão de etanol no período gestacional, possa interferir na ação de fatores de crescimento importantes para a cito e morfodiferenciação dentária, uma vez que, estes fatores podem complexar-se com proteínas da MEC que atuam como

reservatórios desses peptídeos (44). Além disso, a própria redução na expressão da Laminina poderá afetar a sua interação com seus receptores celulares alterando as vias de sinalização necessárias ao desenvolvimento dentário (34).

Deve-se atentar ao fato de que, dependendo do órgão ou tecido atingido, as seqüelas devido ao contato prematuro ao etanol podem ser permanentes (49). Desta forma, é extremamente importante considerar que, como os tecidos dentários não sofrem *turn-over* (50), as alterações morfológicas observadas nas fases precoces da odontogênese podem não se reverter. Portanto, além de serem necessários mais estudos que busquem entender os mecanismos associados ao aparecimento dessas alterações, há a necessidade de estudos de acompanhamento que verifiquem a extensão destas nas fases mais tardias do desenvolvimento.

Referências

1. Jackson IT, Hussain K. Craniofacial and oral manifestations of fetal alcohol syndrome. *Plast Reconstr Surg* 1990; **85**(4):505-512.
2. Cudd TA. Animal model systems for the study of alcohol teratology. *Exp Biol Med (Maywood)* 2005; **230**(6):389-393.
3. Chaudhuri JD. Alcohol and the developing fetus--a review. *Med Sci Monit* 2000; **6**(5):1031-1041.
4. Sulik KK, Johnston MC, Webb MA. Fetal alcohol syndrome: embryogenesis in a mouse model. *Science* 1981; **214**(4523):936-938.
5. Clarren SK, Smith DW. The fetal alcohol syndrome. *N Engl J Med* 1978; **298**(19):1063-1067.
6. Streissguth AP, Landesman-Dwyer S, Martin JC, Smith DW. Teratogenic effects of alcohol in humans and laboratory animals. *Science* 1980; **209**(4454):353-361.
7. Hadi HA, Hill JA, Castillo RA. Alcohol and reproductive function: a review. *Obstet Gynecol Surv* 1987; **42**(2):69-74.
8. Sulik KK. Genesis of alcohol-induced craniofacial dysmorphism. *Exp Biol Med (Maywood)* 2005; **230**(6):366-375.
9. Church MW, Eldis F, Blakley BW, Bawle EV. Hearing, language, speech, vestibular, and dentofacial disorders in fetal alcohol syndrome. *Alcohol Clin Exp Res* 1997; **21**(2):227-237.

10. Kieser JA. Fluctuating odontometric asymmetry and maternal alcohol consumption. *Ann Hum Biol* 1992;**19**(5):513-520.
11. Sant'Anna LB, Tosello DO. Fetal alcohol syndrome and developing craniofacial and dental structures--a review. *Orthod Craniofac Res* 2006;**9**(4):172-185.
12. Fetal Alcohol Spectrum Disorders (FASD) Center for Excellence Web site. 2007.
13. Henderson GI, Schenker S. The effect of maternal alcohol consumption on the viability and visceral development of the newborn rat. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1977;**16**(1):15-32.
14. Sant'Anna LB, Tosello DO, Pasetto S. Effects of maternal ethanol intake on immunoexpression of epidermal growth factor in developing rat mandibular molar. *Arch Oral Biol* 2005;**50**(7):625-634.
15. Sant'Anna LB, Tosello DO. A histomorphometrical Study of the Effects of Ethanol on Enamel Formation in Rat Mandibular Molars during Pregnancy. *Braz J Morphol Sci* 2005;**22**(3):155-159.
16. Murillo-Fuentes L, Artillo R, Carreras O, Murillo L. Effects of maternal chronic alcohol administration in the rat: lactation performance and pup's growth. *Eur J Nutr* 2001;**40**(4):147-154.
17. Oyama LM, Couto RC, Couto GE, Damaso AR, Oller do Nascimento CM. Ethanol intake during lactation. I. Effects On dams' metabolism and pups' body weight gain. *Alcohol* 2000;**21**(3):195-200.
18. Jimenez-Farfan D, Guevara J, Zenteno E, Hernandez-Guerrero JC. Alteration of the sialylation pattern of the murine tooth germ after ethanol exposure. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2005;**73**(12):980-988.
19. Campos RM, Duranza MC. Efectos del consumo prolongado de etanol sobre las etapas tempranas del desarrollo dentario en ratones. *Rev cuba invest bioméd* 1988;**7**(1):30-35.
20. Jimenez-Farfan D, Guevara J, Zenteno E, Malagon H, Hernandez-Guerrero JC. EGF-R and erbB-2 in murine tooth development after ethanol exposure. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2005;**73**(2):65-71.
21. Ozer E, Sarioglu S, Gure A. Effects of prenatal ethanol exposure on neuronal migration, neuronogenesis and brain myelination in the mice brain. *Clin Neuropathol* 2000;**19**(1):21-25.
22. Fukumoto S, Miner JH, Ida H, Fukumoto E, Yuasa K, Miyazaki H, et al. Laminin alpha5 is required for dental epithelium growth and polarity and the development of tooth bud and shape. *J Biol Chem* 2006;**281**(8):5008-5016.

23. Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, et al. Fundamentos da Biologia celular. Porto Alegre: Artmed, 1999.
24. Lodish H, Berk A, Zipursky L, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. Molecular Cell Biology . New York: Freeman & Co 4ed, 1999
25. Thesleff I, Barrach HJ, Foidart JM, Vaheri A, Pratt RM, Martin GR. Changes in the distribution of type IV collagen, laminin, proteoglycan, and fibronectin during mouse tooth development. *Dev Biol* 1981;**81**(1):182-192.
26. Colognato H, Yurchenco PD. Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev Dyn* 2000;**218**(2):213-234.
27. Ryan MC, Christiano AM. The functions of laminins: Lessons from in vivo studies. *Matrix Biology* 1996;**15**(6):369-381.
28. Timpl R, Rohde H, Robey PG, Rennard SI, Foidart JM, Martin GR. Laminin--a glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem* 1979;**254**(19):9933-9937.
29. Liesi P. Ethanol-exposed central neurons fail to migrate and undergo apoptosis. *J Neurosci Res* 1997;**48**(5):439-448.
30. Ryan MC, Lee K, Miyashita Y, Carter WG. Targeted disruption of the LAMA3 gene in mice reveals abnormalities in survival and late stage differentiation of epithelial cells. *J Cell Biol* 1999;**145**(6):1309-1323.
31. Salmivirta K, Sorokin LM, Ekblom P. Differential expression of laminin alpha chains during murine tooth development. *Dev Dyn* 1997;**210**(3):206-215.
32. Ten Cate R. Histologia bucal : desenvolvimento, estrutura e função, 5 Edition. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
33. Yuasa K, Fukumoto S, Kamasaki Y, Yamada A, Fukumoto E, Kanaoka K, et al. Laminin alpha2 is essential for odontoblast differentiation regulating dentin sialoprotein expression. *J Biol Chem* 2004;**279**(11):10286-10292.
34. Della Coletta R, Veiga SS, Line SR. Immunohistochemical and biochemical analysis of laminin in neonatal rat first molars. *J Nihon Univ Sch Dent* 1997;**39**(4):176-181.
35. Hayes DM, Knapp DJ, Breese GR, Thiele TE. Comparison of basal neuropeptide Y and corticotropin releasing factor levels between the high ethanol drinking C57BL/6J and low ethanol drinking DBA/2J inbred mouse strains. *Alcohol Clin Exp Res* 2005;**29**(5):721-729.
36. Hughes JL, Lackie PM, Wilson SJ, Church MK, McGill JI. Reduced structural proteins in the conjunctival epithelium in allergic eye disease. *Allergy* 2006;**61**(11):1268-1274.

37. Ahlgren SC, Thakur V, Bronner-Fraser M. Sonic hedgehog rescues cranial neural crest from cell death induced by ethanol exposure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;**99**(16):10476-10481.
38. Giglio MJ, Vieiro M, Friedman S, Bozzini CE. Effect of prenatal ethanol exposure on the growth of rat mandible skeletal units. *J Biol Buccale* 1987;**15**(4):211-216.
39. Green JH. Fetal Alcohol Spectrum Disorders: understanding the effects of prenatal alcohol exposure and supporting students. *J Sch Health* 2007;**77**(3):103-108.
40. Manning MA, Eugene Hoyme H. Fetal alcohol spectrum disorders: a practical clinical approach to diagnosis. *Neurosci Biobehav Rev* 2007;**31**(2):230-238.
41. Van Thiel DH, Gavaler JS, Lester R. Alcohol-induced ovarian failure in the rat. *J Clin Invest* 1978;**61**(3):624-632.
42. Dassule HR, Lewis P, Bei M, Maas R, McMahon AP. Sonic hedgehog regulates growth and morphogenesis of the tooth. *Development* 2000;**127**(22):4775-4785.
43. Gritli-Linde A, Bei M, Maas R, Zhang XM, Linde A, McMahon AP. Shh signaling within the dental epithelium is necessary for cell proliferation, growth and polarization. *Development* 2002;**129**(23):5323-5337.
44. Adams JC, Watt FM. Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development* 1993;**117**(4):1183-1198.
45. Dassule HR, McMahon AP. Analysis of epithelial-mesenchymal interactions in the initial morphogenesis of the mammalian tooth. *Dev Biol* 1998;**202**(2):215-227.
46. Thesleff I. Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. *J Cell Sci* 2003;**116**(Pt 9):1647-1648.
47. Thesleff I, Vaahtokari A, Vainio S, Jowett A. Molecular mechanisms of cell and tissue interactions during early tooth development. *Anat Rec* 1996;**245**(2):151-161.
48. Thesleff I, Vainio S, Jalkanen M. Cell-matrix interactions in tooth development. *Int J Dev Biol* 1989;**33**(1):91-97.
49. Spohr HL, Willms J, Steinhausen HC. Fetal alcohol spectrum disorders in young adulthood. *J Pediatr* 2007;**150**(2):175-179, 179 e171.
50. Schour I, Massler M. The Teeth. In: GRIFFITH JQ, FARRIS EJ, editors. The rat in laboratory investigation. Philadelphia: J.B.Lippincott Company 1942. p. 102-163.
51. Yoshida K., Yoshida N., Aberdam D., Meneguzzi G., Perrin-Schmitt F., Stoetzel C., Ruch JV e Lesot H. Expression and localization of laminin-5 subunits during mouse tooth development. *Dev Dyn*, 1998; **211** (20): 164-76.



Referências nos padrões da revista Archives of Oral Biology

**A INGESTÃO DE ETANOL DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO PODE CAUSAR
ALTERAÇÕES MORFOMÉTRICAS NOS DENTES MOLARES DA PROLE - ESTUDO EM
RATOS.**

Letícia Westphalen Bento

Dalva Maria Pereira Padilha

Fernando Borba de Araújo

Anna Christina Medeiros Fossati

Resumo:

Objetivo: O objetivo desse estudo foi verificar a existência de diferenças morfométricas entre dentes molares de ratos filhos de fêmeas que ingeriram etanol a 25% *ad libitum* e filhos de fêmeas que ingeriram água *ad libitum* durante a gestação e lactação. **Método:** Foram utilizadas 6 ratas Wistar divididas em dois grupos: Grupo Teste (GT), composto por 3 ratas que ingeriram Etanol a 25% *ad libitum* e Grupo Controle (GC), composto por 3 ratas que ingeriram água *ad libitum*. Após 6 semanas, as ratas foram acasaladas com machos não-tratados. No 40º dia pós-natal (PN), 7 animais do GT e 6 animais do GC foram sacrificados e suas mandíbulas e maxilas retiradas. Após a remoção do tecido mole, as peças foram fotografadas com uma máquina digital Canon A300 em uma lupa estereoscópica. A aferição dos diâmetros méso-distal (MD) e vestibulo-lingual (VL) foi realizada em todos os dentes molares superiores e inferiores com o auxílio do software Image Tool for Windows versão 3.0. **Resultados:** A média dos diâmetros MD e VL do primeiro, segundo e terceiros molares tanto inferiores como superiores do GT foi menor que a do GC. Todas as diferenças entre as médias foram estatisticamente significativas, com exceção do diâmetro MD e VL do primeiro molar inferior e MD do primeiro molar superior. **Conclusão:** A ingestão

de etanol a 25% *ad libitum* durante a gestação e lactação em ratos pode provocar alterações morfológicas nos molares da prole.

Palavras –Chave: Etanol, Gestação, Lactação, Tamanho Dentário, Rato

Introdução

O alcoolismo é um problema social que afeta uma considerável parcela da população em diferentes classes sociais (1). Ainda que o álcool seja um dos agentes teratogênicos mais comuns, os mecanismos pelos quais provoca alterações não estão completamente esclarecidos. O consumo de álcool durante a gravidez pode ocasionar no feto efeitos físicos, mentais e comportamentais definidos sob o termo “espectro de desordens do álcool fetal” (FASD) (2-5). As alterações crânio-faciais ocasionadas pela ingestão de álcool durante a gravidez incluem alterações de tecidos moles e duros faciais, além de inúmeras alterações dentárias incluindo a presença de dentes pequenos e atraso no desenvolvimento dentário (6-15). Após acompanhar, durante 20 anos, pacientes portadores de FASD Spohr *et al.* (2007) (16) verificaram que algumas alterações persistiram durante a vida do indivíduo.

Os distúrbios de forma dentária ocorrem ainda na vida intra-uterina, em fases precoces da odontogênese, na maioria dos grupos dentários (17-19). Essas alterações, quando estabelecidas, são definitivas, já que o esmalte dentário não sofre remodelação ou renovação e a dentina somente se repara na tentativa de proteção do órgão pulpar. Nos tecidos dentários não se observa o *turn-over* constante característico do tecido ósseo (20).

O diagnóstico preciso dos efeitos teratogênicos do etanol em humanos é dificultado devido à falta de informações completas a respeito do consumo de álcool durante o período gestacional, ao uso concomitante de drogas lícitas e/ou ilícitas, às variabilidades da dieta, às variáveis genéticas e à dificuldade de se obter uma amostra significativa nos estudos clínicos (3, 5, 7, 10, 11, 14). Em vista disso, modelos animais têm sido utilizados devido à vantagem de controlarem estas variáveis (11). Um dos modelos animais mais utilizados no estudo dos efeitos da ingestão de álcool durante a gestação e durante a lactação tem sido o rato (3, 7, 12, 14, 21-25). Em um estudo histomorfológico e histomorfométrico de germes dentários de ratos provenientes de

fêmeas submetidas à ingestão de etanol já foi verificado uma diminuição na espessura da matriz de esmalte e na densidade volumétrica dos animais tratados (23).

Portanto, o objetivo deste estudo foi verificar a existência de diferenças morfológicas entre molares de ratos provenientes de fêmeas que ingeriram etanol a 25% *ad libitum* durante a gestação e lactação e ratos provenientes de fêmeas que ingeriram água *ad libitum*.

Materiais e Métodos:

Considerações Éticas:

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Animais:

Para este estudo foram utilizadas 6 ratas da linhagem Wistar de 60 dias provenientes do C.R.E.A.L. do ICBS-UFRGS. Os animais foram mantidos em temperatura e umidade controladas e em ciclo de claro e escuro de 12 horas. Para a alimentação, foi utilizada a ração convencional Nuvilab CR1 *ad libitum*. Os animais foram aleatoriamente divididos em 2 grupos: GC, composto de 3 ratas que receberam água *ad libitum* e GT, composto por 3 ratas, que receberam etanol a 25% *ad libitum* (22, 23). A concentração de etanol foi aumentada semanalmente, iniciando com 10% na primeira semana e passando para 15%, 20% e 25% nas semanas seguintes. A concentração desejada (25%) foi mantida por mais uma semana e então as ratas foram colocadas para acasalamento, com ratos não tratados, de aproximadamente 90 dias. Este processo foi realizado diariamente, durante duas semanas no final da tarde. Na manhã do dia seguinte, um esfregaço vaginal era realizado até às 8h30min. A presença de espermatozoides configurava a prenhez e este dia foi estabelecido como dia 0 (zero) da gravidez. As fêmeas foram monitoradas quanto à quantidade de ração e líquido ingerido. Após o nascimento dos filhotes, durante a lactação, manteve-se a mesma dieta sólida e líquida para ambos os grupos. No 20º dia pós-natal (PN) a administração de etanol às fêmeas lactantes foi suspensa para que seus filhotes não tivessem acesso a ele. No 25º dia PN os filhotes foram desmamados.

Coleta e Fotografia das Peças

No 40º dia PN (26) 7 machos do GT e 6 do GC, aleatoriamente escolhidos, foram sacrificados por deslocamento cervical após anestesia e aferição do seu peso. As maxilas e mandíbulas foram removidas, dissecadas e armazenadas em solução de Formalina Tamponada 10% (26). Dessa forma, obteve-se 12 hemimandíbulas e 12 hemimaxilas no GC e 14 no GT. Após a remoção do tecido mole, as peças foram fotografadas com auxílio de uma lupa estereoscópica e uma câmera digital Canon A300, com zoom de 1.6. Em todos os campos fotografados, foi colocado um paquímetro digital calibrado em 1 mm para servir de referência no momento das medições. (fig.1) Para realizar as fotografias do diâmetro méso-distal (MD), as peças foram estabilizadas em uma lâmina de cera utilidade alinhando as cúspides vestibulares com as linguais. Para as fotografias do diâmetro vestibulo-lingual (VL), manteve-se a peça em uma posição que permitisse visualizar o osso alveolar tanto por vestibular como por lingual em torno dos 3 dentes molares. As fotografias foram armazenadas em formato Jpeg, em 96dpi, com dimensões de 2048x1536 pixels.

Medições

Foram realizadas medições no sentido MD e VL em todos os molares, tanto superiores como inferiores, utilizando o programa *Image Tool for Windows* versão 3.00 por um único operador devidamente treinado, calibrado e cego para os grupos (fig.1). A calibração do operador foi avaliada utilizando-se o coeficiente de correlação intraclasse, por meio do programa SPSS versão 13, obtendo-se o valor de 0,984. Para a aferição do diâmetro VL, foi realizada a medida de cada cúspide de cada dente na maior distância considerada entre a face lingual/palatina e a face vestibular conforme figura 2A e 2B. A média obtida no programa foi registrada. Para a aferição do diâmetro MD, foram realizadas 3 medidas consecutivas na maior distância considerada entre a face mesial e distal de cada dente conforme a figura 2C e 2D. A média obtida no programa foi registrada. Tais procedimentos foram realizados em todos os molares de todas as peças do GT e do GC. Cada grupo dentário (primeiro, segundo e terceiro molar superior e inferior), tanto dos animais do GT como dos animais do GC, tiveram as médias do diâmetro MD e VL comparadas. A análise de significância entre o GT e GC foi

realizada utilizando o teste-t considerando um nível de significância de 95%, por meio do programa SPSS versão 13.



Fig. 1: Fotografia da amostra 15 mostrando a colocação do paquímetro digital (seta) em 1mm e a numeração para contemplar o princípio de cegamento.

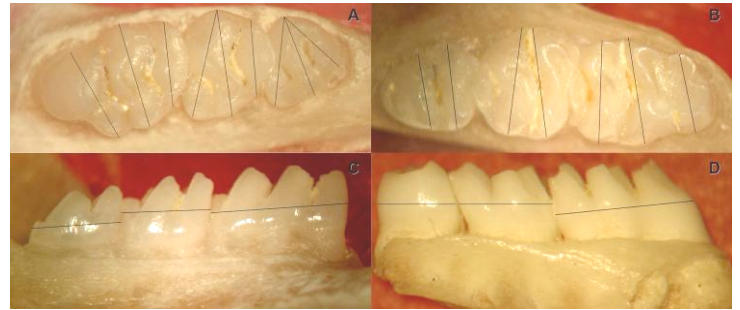


Fig 2: Aferição dos diâmetros MD e VL. A) Maior distância VL considerada das cúspides dos molares inferiores; B) Maior distância VL considerada das cúspides dos molares superiores; C) Maior distância MD considerada nos molares inferiores; D) Maior distância MD considerada nos molares superiores.

Resultados

Nos molares superiores, as médias do diâmetro MD e VL foram menores no GT do que no GC. (Fig. 3) As diferenças entre as médias foram estatisticamente significativas com exceção do diâmetro MD do primeiro molar. (Tabela 1 e 2)

Tabela 1: Média, em milímetros, do diâmetro MD dos molares superiores dos animais pertencentes ao GT e GC.

	GC (n=12) (média ± dp)	GT (n=14) (média ± dp)	Valor de p
Primeiro Molar	3,20±0,14	3,13±0,11	0,18
Segundo Molar	2,06±0,06	1,92±0,04	<0,001*
Terceiro Molar	1,75±0,04	1,48±0,11	<0,001*

* - diferença estatisticamente significativa entre o GT e GC

Tabela 2: Média, em milímetros, do diâmetro VL dos molares superiores dos animais pertencentes ao GT e GC.

	GC (n=12) (média ± dp)	GT (n=14) (média ± dp)	Valor de p
Primeiro Molar	2,02±0,08	1,94±0,05	0,005*
Segundo Molar	2,12±0,07	2,02±0,04	0,001*
Terceiro Molar	1,68±0,05	1,50±0,12	<0,001*

* - diferença estatisticamente significativa entre o GT e GC

Da mesma forma, nos molares inferiores, as médias tanto do diâmetro MD como VL foram menores no GT do que no GC. (Fig. 3) As diferenças entre as médias foram estatisticamente significativas, com exceção do diâmetro MD e VL do primeiro molar inferior. (Tabela 3 e 4)

Tabela 3: Média, em milímetros, do diâmetro MD dos molares inferiores dos animais pertencentes ao GT e GC.

	GC (n=12) (média ± dp)	GT (n=14) (média ± dp)	Valor de p
Primeiro Molar	3,27±0,14	3,21±0,09	0,20
Segundo Molar	2,16±0,08	2,03±0,08	0,001*
Terceiro Molar	2,17±0,06	1,74±0,23	<0,001*

* - diferença estatisticamente significativa entre o GT e GC

Tabela 4: Média do diâmetro VL dos molares inferiores, em milímetros, dos animais pertencentes ao GT e GC.

	GC (n=12) (média ± dp)	GT (n=14) (média ± dp)	Valor de p
Primeiro Molar	1,83±0,06	1,78±0,07	0,08
Segundo Molar	2,06±0,06	1,98±0,09	0,01*
Terceiro Molar	1,64±0,05	1,53±0,18	0,04*

* - diferença estatisticamente significativa entre o GT e GC

Em outra análise, observou-se que o diâmetro referente à soma dos molares de cada arcada foi menor no GT, quando comparado ao GC, em ambos os diâmetros analisados. A diferença foi estatisticamente significativa, com exceção do diâmetro VL dos molares inferiores. (Tabela 5)

Tabela 5: Média da soma dos diâmetros dos molares por arcada, em milímetros, dos animais pertencentes ao GT e GC.

Diâmetro/arcada	GC (n=12) (média ± dp)	GT (n=14) (média ± dp)	Valor de p
MD / Maxila	7,01± 0,19	6,54±0,13	<0,001*
VL / Maxila	5,83±0,17	5,46±0,19	<0,001*
MD / Mandíbula	7,52±0,38	6,98±0,31	0,001*
VL / Mandíbula	5,50±0,22	5,34±0,32	0,14

* - diferença estatisticamente significativa entre o GT e GC

Além disso, as fêmeas gestantes pertencentes ao GT ingeriram menos ração e líquido do que as do GC e esta diferença foi estatisticamente significativa. (Tabela 6)

Tabela 6: Média da ingestão de ração e líquido das fêmeas pertencentes ao GT e GC.

	GC (média ± dp)	GT (média ± dp)	Valor de p
Ingestão de Ração (g/dia/animal)	15,31±2,01	10,86	<0,001*
Ingestão de Líquido (ml/dia/animal)	29,16±3,36	20,95±6,64	<0,001*

* - diferença estatisticamente significativa entre o GT e GC

Verificou-se que no 40º dia PN os animais do GT apresentaram peso menor do que os do GC e essa diferença foi estatisticamente significativa. (Tabela 7)

Tabela 7: Média do peso dos filhotes, aos 40 dias de vida, pertencentes ao GT e GC.

	GC (n=6) (média ± dp)	GT (n=7) (média ± dp)	Valor de p
Peso (g)	135,67±17,18	110,86±21,89	0,04*

* - diferença estatisticamente significativa entre o GT e GC

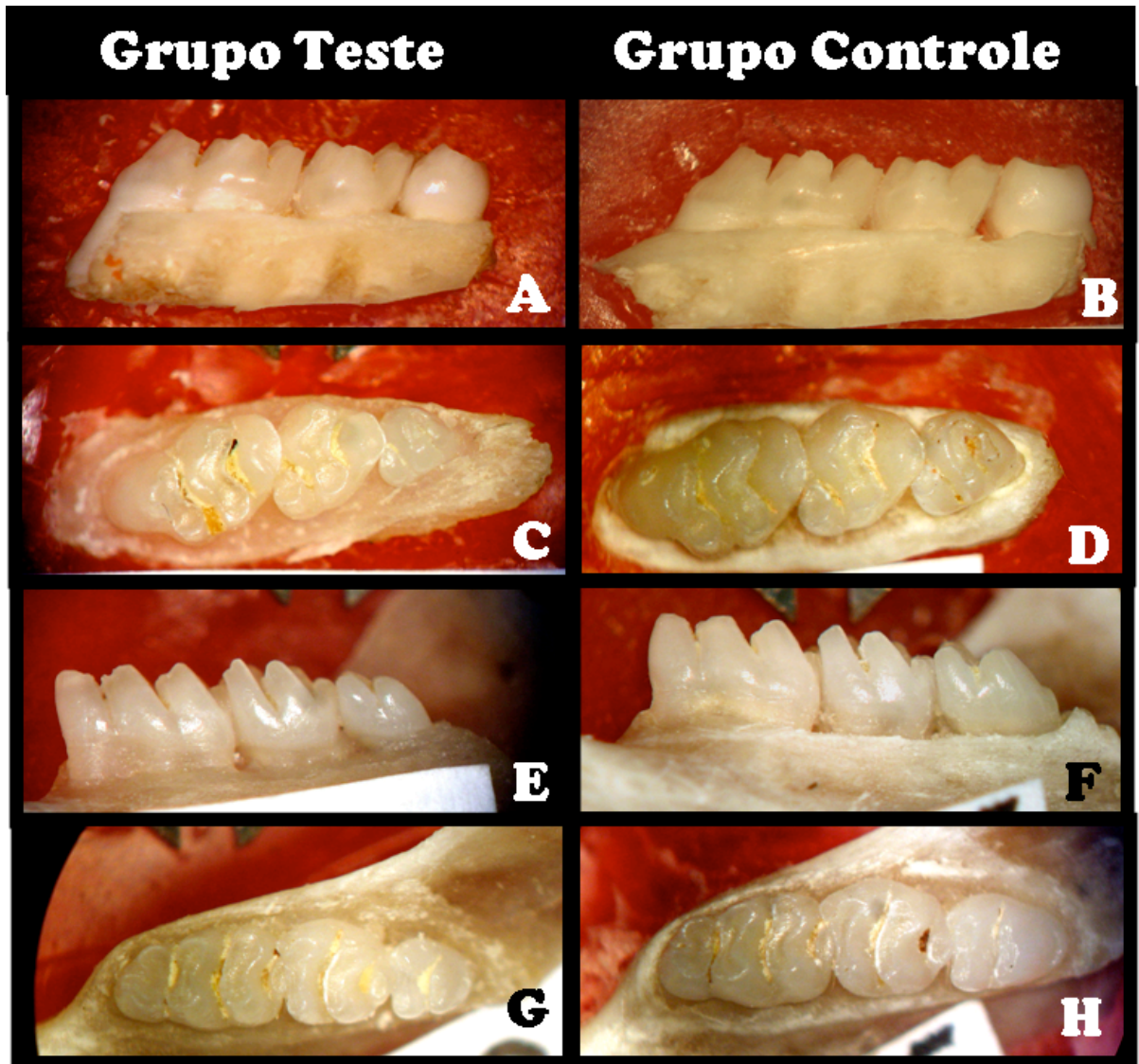


Fig.3: Fotografias do GT e GC. Em A e B – diâmetro MD dos molares superiores. Em C e D – diâmetro VL dos molares superiores. Em E e F – diâmetro MD dos molares inferiores. Em G e H – diâmetro VL dos molares inferiores. Observar a evidente diferença, no tamanho do terceiro molar inferior e superior, em todos os diâmetros avaliados

Discussão

No presente estudo, buscou-se avaliar as diferenças no tamanho dentário em animais provenientes de mães que consumiram álcool, pois até o momento, poucos estudos relacionaram a presença destas alterações à exposição de etanol durante a gestação e/ou lactação. A utilização de um modelo animal permitiu a padronização da idade das fêmeas, da dieta por elas consumida, da concentração alcoólica ingerida e do período de consumo do álcool durante e após a gestação. Com essa metodologia foram controladas algumas variáveis importantes a serem consideradas na avaliação dos dados. Ainda assim, mesmo com este controle, alguma variabilidade genética poderá explicar diferenças entre os resultados dos estudos, pois segundo Hadi *et al.*

(1987) (12), as rotas metabólicas da oxidação do etanol são controladas por fatores genéticos e esta influência poderia explicar porque, níveis iguais de consumo de álcool podem determinar diferenças nos níveis de álcool no sangue e nas malformações.

A concentração alcoólica utilizada (25%) já demonstrou, em estudos anteriores, interferir no desenvolvimento do feto e causar alterações na odontogênese (22, 23). A administração do álcool via oral *ad libitum*, também utilizada em outros estudos, proporcionou, provavelmente, uma ingestão crônica, pois esta foi mantida durante um período prolongado e em quantidades toleráveis (22, 23, 25, 27-29). Outros estudos utilizaram a injeção intraperitoneal, uma ou duas vezes durante a gestação, possivelmente mimetizando uma ingestão alcoólica aguda e ocasional (9). Segundo Streissguth *et al.* (1980) (11), diferenças metodológicas entre os experimentos, relativas ao período em que o álcool é administrado durante a gestação, a dose, a forma de administração e a linhagem do animal utilizado, contribuem para algumas dificuldades em reproduzir resultados. Apesar disso, obteve-se resultados semelhantes aos estudos que também utilizaram modelos animais (22, 23).

No presente trabalho, observou-se que os animais do GT diminuíram a ingestão do etanol ao longo do tempo e esta foi significativamente menor do que a ingestão de água pelas ratas do GC. (Tabela 7) No estudo de Sant'anna *et al.* (2005) (22) a quantidade de etanol ingerida foi cerca de 34ml/dia enquanto no presente trabalho foi de aproximadamente 21ml/dia. Ainda assim, verificou-se que o menor consumo de etanol foi suficiente para causar alterações. Este fato é mais uma evidência de que ainda não é possível determinar uma dose mínima segura para a ingestão de etanol durante a gravidez (10, 11).

Observou-se também que as fêmeas do GT ingeriram menos ração do que as fêmeas do GC (Tabela 6), fato este, provavelmente devido ao ganho calórico fornecido pelo etanol. Em um estudo, também em ratos, mas da linhagem Sprague-Dawley, Giglio *et al.* (1987) (29) avaliaram o efeito do álcool pré-natal no crescimento mandibular. Nesse estudo, um dos grupos controles utilizados recebeu um suplemento alimentar relativo à quantidade calórica fornecida pelo etanol e a mesma quantidade de ração ingerida pelo grupo teste, procurando, dessa forma, mimetizar apenas a redução nutricional que ocorre nos indivíduos alcoolistas. Os autores

mostraram que neste grupo controle não ocorreram alterações no desenvolvimento mandibular enquanto que no grupo que ingeriu etanol, houve uma redução significativa no tamanho da mandíbula. Streissguth *et al.*(1980) (11), descrevem que muitos estudos em animais procuram usar grupos controles com equiparação do consumo calórico do grupo que consome álcool, entretanto, os resultados obtidos têm sugerido que o principal agente teratogênico é o álcool e não a pouca nutrição. Da mesma forma, Murillo-Fuentes *et al.*(2001) (24) mostraram que a má nutrição de uma mãe alcoolista não é considerada um fator importante no retardo de crescimento dos seus filhotes. Portanto, no presente estudo, a redução nutricional que pode ter ocorrido nas fêmeas do GT, provavelmente, não esteja relacionada com a diminuição no tamanho dentário observado. Além disso, o estado de desnutrição, em roedores é caracterizado pela ocorrência de distúrbios de comportamento, queda ou alterações na distribuição de pêlos, diarreia e edema, além de acentuada perda de peso (30), sinais esses, não observados nas fêmeas do presente estudo.

O peso dos animais provenientes das fêmeas do GT foi influenciado pelo consumo de etanol, pois foi significativamente menor que aqueles nascidos das fêmeas do GC. Este resultado concorda com os de Henderson e Schenker (1977) (21) e Santana *et al.* (2005) (22) que também observaram redução de peso dos animais em estudos com metodologia semelhante. Esse resultado também está de acordo com as observações em humanos que verificam redução de peso nas crianças cujas mães consumiram álcool durante a gestação (10).

Os resultados mostraram que os animais provenientes das fêmeas do GT desenvolveram dentes molares com diâmetro menor do que os do GC. O tamanho dentário reduzido nestes dentes pode estar relacionado com a forma dentária, ou seja, os efeitos nocivos do álcool teriam sido mais atuantes durante a fase de morfodiferenciação (17). Por outro lado, a redução do diâmetro dentário também pode ter sido resultado de uma ação sobre as células diferenciadas responsáveis pela síntese e mineralização dos tecidos dentários, uma vez que, o estudo de Sant'anna e Tosello (2005) (23) aponta para esse fato. Neste caso, as alterações mais significativas ocorreram durante a dentinogênese e/ou amelogênese ou ainda, como resultado de uma associação dos dois fatores.

Os molares do rato iniciam o seu desenvolvimento no 13º dia de VIU com o aparecimento da lâmina dentária do primeiro molar. Este termina a formação de sua coroa no 11º dia PN. A fase de morfo e histodiferenciação desse dente ocorre por volta do 19º dia de VIU estando o feto nesta época somente sob influência do álcool pré-natal. Sabe-se que o etanol tem um peso molecular baixo e uma alta solubilidade nos lipídios, portanto, a passagem pela placenta é livre proporcionando uma rápida disponibilidade ao embrião a níveis similares aos da mãe (31, 32). No entanto, o início de formação de dentina e esmalte ocorre no primeiro dia PN, coincidindo com o início da lactação (20, 33, 34). Desta forma, é importante considerar que a lactação administrada por um animal que ingere etanol, também contribui para as alterações no desenvolvimento dentário de sua prole.

Os achados do presente estudo concordam com os de Jimenez-Farfan *et al.* (2005) (27) que, ao avaliarem fetos provenientes de fêmeas que ingeriram etanol entre 15% e 25%, verificaram que estes apresentavam os primeiros molares menores que os do grupo controle. Também se obteve resultados semelhantes aos de Sant'anna e Tosello (2005) (23), que verificaram diferença na espessura de esmalte e na densidade volumétrica do germe dentário do primeiro molar inferior quando utilizaram o mesmo animal e a mesma concentração alcoólica do presente estudo. Além disso, as alterações dimensionais dentárias observadas concordam com algumas observações realizadas em humanos, que verificaram a presença de microdontias, assimetrias faciais e maloclusões. (6, 14, 15).

As maiores diferenças foram observadas no diâmetro do segundo e do terceiro molar. Nestes dentes, tanto a fase de histo e morfodiferenciação, como a de secreção de tecidos duros, ocorre após o nascimento. Portanto, ficam sujeitas aos efeitos deletérios da ingestão de etanol tanto durante a gestação como durante a lactação.

Outro fator importante a ser considerado, é a maior alteração dimensional observada nos terceiros molares. Como estes dentes iniciam sua formação já no final do período gestacional, os germes dentários se desenvolvem quase totalmente após o nascimento. Desta forma, as fases de diferenciação, migração e secreção celular, que são as fases mais críticas para o surgimento de anomalias, ocorreram após um período mais prolongado de exposição ao etanol, pois, as células ectodérmicas de

revestimento da cavidade bucal primitiva encontravam-se sob ação do álcool desde o início do desenvolvimento. O raciocínio inverso também pode explicar a falta de diferença estatística, apesar da diferença numérica, entre o GT e GC em algumas medições do primeiro molar, pois as células que darão origem a este grupo dentário ficaram menos tempo expostas a ação deletéria do etanol.

É importante considerar que as avaliações de Sant'anna e Tosello (2005)(23) e Jimenez-Farfan *et al.* (2005) (27) foram realizadas em cortes histológicos. Para a realização desses cortes, as peças são submetidas a um processamento histológico que altera as estruturas a serem estudadas. Somado a isto, este tipo de medição proporciona uma análise bidimensional. E, quando se obtém cortes histológicos de uma estrutura tridimensional, como o germe dentário, são obtidos cortes em várias dimensões e muitas vezes, não se consegue determinar aquele que representa o maior diâmetro da estrutura. Na metodologia proposta pelo presente estudo, trabalhou-se com as maxilas e mandíbulas após a completa formação das coroas dentárias e com os três dentes molares totalmente erupcionados. Este método proporcionou uma visualização tridimensional das estruturas, a obtenção de fotografias em diversas posições, o que permitiu a aferição de dois diâmetros (VL e MD), além da avaliação de todas as peças dentárias. A aferição realizada através de fotografias facilitou a determinação do maior diâmetro de cada elemento dentário.

A suspensão do etanol no 20º dia foi realizada para evitar o consumo de álcool pelos filhotes, já que estes se aproximavam de um tamanho possível de alcançarem a mamadeira. Entretanto, mesmo que algum filhote tenha, acidentalmente, consumido etanol, este consumo teria ocorrido próximo ao 20º dia e algum efeito relacionado a ele seria, provavelmente, radicular, pois próximo ao 21º dia a coroa dos três dentes molares já está completa. A diferença observada entre a soma dos diâmetros MD em ambas as arcadas entre o GT e GC, pode ser interpretado como uma possível redução no comprimento do arco dentário, bem como, a diferença na média da soma dos diâmetros VL dos molares superiores poderia indicar uma atresia do arco dental superior. Estes aspectos podem estar relacionados com as maloclusões já descritas em crianças com FASD. (15)

A ingestão de etanol é uma prática comum em todo o mundo (1). Considera-se que um consumo mínimo eventual não seja prejudicial à saúde do indivíduo,

entretanto, ainda não se conhece a quantidade mínima tolerada pelo feto. Um grande número de gestações ocorre de forma inesperada e, muitas vezes, só é descoberta após as primeiras semanas, período extremamente crítico para o desenvolvimento de malformações (12). A ingestão de etanol em pequenas ou altas doses tão precocemente na gravidez pode ser tão deletéria ao feto quanto um consumo pesado constante (9). Segundo Church *et al.* (1997) (14), talvez a intervenção precoce nas desordens dento-faciais, auditivas, de fala e linguagem possam reduzir os problemas comportamentais, intelectuais e emocionais apresentados pelos pacientes portadores da síndrome completa (FAS). Portanto, é importante salientar a necessidade de mais estudos que busquem elucidar os mecanismos das alterações causadas pelo consumo de álcool durante a gestação e lactação para que se possa desenvolver terapêuticas adequadas e medidas eficazes de prevenção.

Referências

1. BAU C, DOTTO H. Estado atual e perspectivas da genética e epidemiologia do alcoolismo. *Ciênc saúde coletiva* 2002;**7**(1):p.183-190.
2. Sampson PD, Streissguth AP, Bookstein FL, Little RE, Clarren SK, Dehaene P, *et al.* Incidence of fetal alcohol syndrome and prevalence of alcohol-related neurodevelopmental disorder. *Teratology* 1997;**56**(5):317-326.
3. Sant'Anna LB, Tosello DO. Fetal alcohol syndrome and developing craniofacial and dental structures--a review. *Orthod Craniofac Res* 2006;**9**(4):172-185.
4. Manning MA, Eugene Hoyme H. Fetal alcohol spectrum disorders: a practical clinical approach to diagnosis. *Neurosci Biobehav Rev* 2007;**31**(2):230-238.
5. Fetal Alcohol Spectrum Disorders (FASD) Center for Excellence Web site. 2007.
6. Jackson IT, Hussain K. Craniofacial and oral manifestations of fetal alcohol syndrome. *Plast Reconstr Surg* 1990;**85**(4):505-512.
7. Cudd TA. Animal model systems for the study of alcohol teratology. *Exp Biol Med (Maywood)* 2005;**230**(6):389-393.
8. Chaudhuri JD. Alcohol and the developing fetus--a review. *Med Sci Monit* 2000;**6**(5):1031-1041.
9. Sulik KK, Johnston MC, Webb MA. Fetal alcohol syndrome: embryogenesis in a mouse model. *Science* 1981;**214**(4523):936-938.

10. Clarren SK, Smith DW. The fetal alcohol syndrome. *N Engl J Med* 1978;**298**(19):1063-1067.
11. Streissguth AP, Landesman-Dwyer S, Martin JC, Smith DW. Teratogenic effects of alcohol in humans and laboratory animals. *Science* 1980;**209**(4454):353-361.
12. Hadi HA, Hill JA, Castillo RA. Alcohol and reproductive function: a review. *Obstet Gynecol Surv* 1987;**42**(2):69-74.
13. Sulik KK. Genesis of alcohol-induced craniofacial dysmorphism. *Exp Biol Med (Maywood)* 2005;**230**(6):366-375.
14. Church MW, Eldis F, Blakley BW, Bawle EV. Hearing, language, speech, vestibular, and dentofacial disorders in fetal alcohol syndrome. *Alcohol Clin Exp Res* 1997;**21**(2):227-237.
15. Kieser JA. Fluctuating odontometric asymmetry and maternal alcohol consumption. *Ann Hum Biol* 1992;**19**(5):513-520.
16. Spohr HL, Willms J, Steinhausen HC. Fetal alcohol spectrum disorders in young adulthood. *J Pediatr* 2007;**150**(2):175-179, 179 e171.
17. Ten Cate R. Histologia bucal : desenvolvimento, estrutura e função, 5 Edition. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
18. Katchburian E, Arana V. Histologia e Embriologia Oral, 1ed. Edition. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.
19. Fossati ACM, Ruschel H. Bases Biológicas In: KRAMER, P.F. Traumatismos na Dentição Decídua. São Paulo: Santos, 2005.
20. Schour I, Massler M. The Teeth. In: GRIFFITH JQ, FARRIS EJ, editors. The rat in laboratory investigation. Philadelphia: J.B.Lippincott Company 1942. p. 102-163.
21. Henderson GI, Schenker S. The effect of maternal alcohol consumption on the viability and visceral development of the newborn rat. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1977;**16**(1):15-32.
22. Sant'Anna LB, Tosello DO, Pasetto S. Effects of maternal ethanol intake on immunoexpression of epidermal growth factor in developing rat mandibular molar. *Arch Oral Biol* 2005;**50**(7):625-634.
23. Sant'Anna LB, Tosello DO. A histomorphometrical Study of the Effects of Ethanol on Enamel Formation in Rat Mandibular Molars during Pregnancy. *Braz J Morphol Sci* 2005;**22**(3):155-159.

24. Murillo-Fuentes L, Artillo R, Carreras O, Murillo L. Effects of maternal chronic alcohol administration in the rat: lactation performance and pup's growth. *Eur J Nutr* 2001;**40**(4):147-154.
25. Oyama LM, Couto RC, Couto GE, Damaso AR, Oller do Nascimento CM. Ethanol intake during lactation. I. Effects On dams' metabolism and pups' body weight gain. *Alcohol* 2000;**21**(3):195-200.
26. Souza MAL. A morphometric and histological study on the development and eruption on the rat mandibular first molar tooth. Newcastle: University of Newcastle Upon Tyne 1981.
27. Jimenez-Farfan D, Guevara J, Zenteno E, Malagon H, Hernandez-Guerrero JC. EGF-R and erbB-2 in murine tooth development after ethanol exposure. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2005;**73**(2):65-71.
28. Jimenez-Farfan D, Guevara J, Zenteno E, Hernandez-Guerrero JC. Alteration of the sialylation pattern of the murine tooth germ after ethanol exposure. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2005;**73**(12):980-988.
29. Giglio MJ, Vieiro M, Friedman S, Bozzini CE. Effect of prenatal ethanol exposure on the growth of rat mandible skeletal units. *J Biol Buccale* 1987;**15**(4):211-216.
30. Campana AO, Burini RC, Outa AY, De Camargo JL. Experimental protein deficiency in adult rats. *Rev Bras Pesqui Med Biol* 1975;**8**(3-4):221-226.
31. Mann LI, Bhakthavathsalan A, Liu M, Makowski P. Placental transport of alcohol and its effect on maternal and fetal acid-base balance. *Am J Obstet Gynecol* 1975;**122**(7):847-844.
32. Chernoff GF. The fetal alcohol syndrome in mice: an animal model. *Teratology* 1977;**15**(3):223-229.
33. Webb PP, Moxham BJ, Ralphs JR, Benjamin M. Immunolocalisation of collagens in the developing rat molar tooth. *Eur J Oral Sci* 1998;**106 Suppl 1**:147-155.
34. Luukko K. Neuronal cells and neurotrophins in odontogenesis. *Eur J Oral Sci* 1998;**106 Suppl 1**:80-93.

Considerações Finais

*“Quem senta no fundo de um poço para contemplar o céu,
há de achá-lo pequeno.”*

(Hom Yu)

O atendimento odontopediátrico está integrado no conjunto de medidas que asseguram a saúde da criança durante seu desenvolvimento. Em razão disso, o profissional que se dedica a essa área deve possuir um conhecimento amplo dos aspectos do desenvolvimento humano para que possa estar voltado a uma prática que conduza o paciente como um todo e não apenas focada à cavidade oral.

O procedimento que mais aproxima o odontopediatra da realidade e história pregressa do paciente é a anamnese. Por este motivo, esta primeira abordagem deve ser executada com detalhamento adequado, a fim de identificar elementos importantes que possam nortear as condutas e auxiliar no diagnóstico. O conhecimento atual das deficiências crânio-faciais e dentárias envolvidas no contato pré-natal com o etanol mostra que essa questão deveria ser considerada na entrevista inicial com os responsáveis.

No presente estudo, pode-se concluir que: o consumo de álcool durante o desenvolvimento pode provocar alterações morfológicas nos germes dentários, e que a diminuição da expressão da laminina pode ser um dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento dessas alterações. Pode-se verificar ainda, que as alterações encontradas na vida intra-uterina mantiveram-se na vida adulta do animal já que estes desenvolveram dentes de tamanho menor do que aqueles provenientes das fêmeas que ingeriram água durante o período de gestação e lactância. Portanto, esse trabalho mostrou que a ingestão de álcool durante a gestação pode ser deletéria à odontogênese e que, uma vez afetados, os tecidos dentários apresentam pouca capacidade de regeneração.

As maiores anormalidades encontrados foram relacionados com a diferenciação celular. Dessa forma, a análise estrutural do esmalte e da dentina, após a completa formação, identificaria possíveis modificações nos tecidos já totalmente secretados

relacionadas às alterações encontradas. Devido à importância da membrana basal no desenvolvimento dentário, também seria importante verificar anormalidades na expressão de outras proteínas constituintes dessa estrutura, bem como a de seus receptores. Além disso, outros eventos do desenvolvimento dentário, tais como erupção, formação radicular e pulogênese deveriam ser investigados.

O anticorpo utilizado para a imunomarcagem da laminina, não diferenciou as diversas isoformas. Em função disso, não houve a oportunidade de identificar a mais afetada. Portanto, é importante descobrir se há alguma isoforma mais afetada e identificá-la, ou verificar se todas as isoformas presentes no germe dentário diminuem sua expressão de maneira uniforme.

Uma das limitações deste estudo, em relação à administração de etanol, se refere ao fato de que disponibilizando a solução *ad libitum*, existe a dificuldade de padronizar a quantidade diária ingerida por animal. Por outro lado, mimetiza-se uma ingestão crônica, de pequenas quantidades diárias toleráveis, muito comum de ocorrer em humanos. Apesar de que, ao contrário do que ocorre nos humanos, o etanol foi a única fonte de hidratação dos animais. Em relação ao período de consumo, há a necessidade de investigar se este é mais prejudicial se ingerido durante a lactação ou gestação. Além disso, resultados importantes poderão ser alcançados realizando um estudo sobre a ingestão aguda de etanol em períodos críticos e/ou não críticos do período gestacional.

A diferença entre o comprimento méso-distal dos arcos dentários, entre os grupos testados, é um dado importante a considerar no estabelecimento de maloclusões nos pacientes que tiveram contato pré-natal com álcool. Para complementar esses resultados, uma importante contribuição será a avaliação de possíveis diferenças no tamanho mandibular e maxilar entre os animais normais e os afetados.

É importante considerar que os resultados obtidos são mais uma evidência que contribui para uma preocupação crescente quanto aos efeitos do etanol no desenvolvimento infantil, já que a formação dentária, apesar de ser apenas um dos processos envolvidos, é um importante marcador. Portanto, sendo o odontopediatra um profissional de saúde extremamente preocupado com o bem estar da criança e que visa a saúde geral desta através dos cuidados orais, cabe a ele alertar os futuros pais

dos efeitos deletérios, a curto e longo prazo, que o consumo de etanol na gestação poderá causar ao seu filho. No Brasil, existe uma grande carência de estudos sobre a epidemiologia dos efeitos do álcool sobre o feto mas acredita-se que seus efeitos atinjam um grande número de indivíduos e que as conseqüências sejam importantes (BAU e DOTTO, 2002; FREIRE *et al.*, 2005).

No que se refere à prevenção e conscientização das gestantes, é de grande valia que profissionais da saúde estejam cientes do problema e tenham a capacitação necessária para realizar uma abordagem eficaz. É importante conscientizar as mulheres que o período crítico para as teratologias é o primeiro trimestre de gestação e que neste momento inicial a gravidez pode passar despercebida.

Mesmo com os estudos existentes, são necessárias maiores evidências, em humanos, a respeito dos efeitos do consumo de álcool durante a gestação e lactação focados nas alterações crânio-faciais e dentárias. Dessa forma será possível conhecer a extensão de seus efeitos, compreender a totalidade de seus mecanismos de ação e desenvolver estratégias de prevenção e tratamento efetivos.

Perspectivas



- Avaliar o esmalte dos animais do GT em Microscopia Eletrônica de varredura.
- Avaliar a existência de modificações pulpares nos animais do GT.
- Avaliar a expressão de outras proteínas da MEC/MB, tais como: Fibronectina e Colágeno.
- Avaliar a expressão da laminina nas demais fases do desenvolvimento dentário.
- Avaliar a formação radicular dos animais do GT.
- Realizar estudos epidemiológicos focados nas repercussões dentárias do contato pré-natal ao álcool.

Considerações Éticas

“Quando o homem aprender a respeitar até o menor ser da criação, seja animal ou vegetal, ninguém precisará ensiná-lo a amar seu semelhante.”

(Albert Schweitzer)

Este projeto foi realizado seguindo os Princípios Éticos para o uso de animais de laboratório do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (C.O.B.E.A.), o Código Estadual de Proteção aos Animais (Lei 119115/2003), a Lei Federal nº. 6638 de 08 de maio de 1979 e o projeto de Lei federal nº. 1153-A de 1995 apenso o PL-3964 de 1997 - Uso científico de animais. Além de ter sido aprovado pelo comitê de ética desta faculdade.

Referências



ADAMS, J.C. e WATT, F.M. Regulation of development and differentiation by the extra cellular matrix. Development, v.117, n.4, p.1183-98 Apr. 1993.

ALBERTS, B., BRAY, D., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. e WALTER, P. Fundamentos da Biologia celular. Porto Alegre: Artmed. 1999. 757p. p.

BAU, C. e DOTTO, H. Estado atual e perspectivas da genética e epidemiologia do alcoolismo. Ciênc. saúde coletiva, v.7, n.1, p.p.183-190. 2002.

BERKOVITZ, B.K.B. Anatomia, embriologia e histologia bucal. Porto Alegre: Artmed. 2004. 378 p.

CAMPOS, R.M. e DURANZA, M.C. Efectos del consumo prolongado de etanol sobre las etapas tempranas del desarrollo dentario en ratones. Rev cuba invest bioméd, v.7, n.1, p.30-5. 1988.

CHAUDHURI, J.D. Alcohol and the developing fetus--a review. Med Sci Monit, v.6, n.5, p.1031-41 Sep-Oct. 2000.

CHERNOFF, G.F. The fetal alcohol syndrome in mice: an animal model. Teratology, v.15, n.3, p.223-9 Jun. 1977.

CHURCH, M.W., ELDIS, F., BLAKLEY, B.W. e BAWLE, E.V. Hearing, language, speech, vestibular, and dentofacial disorders in fetal alcohol syndrome. Alcohol Clin Exp Res, v.21, n.2, p.227-37 Apr. 1997.

CLARREN, S.K. e SMITH, D.W. The fetal alcohol syndrome. N Engl J Med, v.298, n.19, p.1063-7 May 11. 1978.

COBOURNE, M.T., MILETICH, I. e SHARPE, P.T. Restriction of sonic hedgehog signalling during early tooth development. Development, v.131, n.12, p.2875-85 Jun. 2004.

CUDD, T.A. Animal model systems for the study of alcohol teratology. Exp Biol Med (Maywood), v.230, n.6, p.389-93 Jun. 2005.

DASSULE, H.R., LEWIS, P., BEI, M., MAAS, R. e MCMAHON, A.P. Sonic hedgehog regulates growth and morphogenesis of the tooth. Development, v.127, n.22, p.4775-85 Nov. 2000.

DE COSTER, P.J., MORTIER, G., MARKS, L.A. e MARTENS, L.C. Cranial suture biology and dental development: genetic and clinical perspectives. J Oral Pathol Med, v.36, n.8, p.447-55 Sep. 2007.

DELLA COLETTA, R., JUNIOR, J.J., LOPES, M.A., ALMEIDA, O.P.D. e LINE, S.R.P. Expressão de laminina no germe dental do primeiro molar de ratos em desenvolvimento. RPG, v.4, n.2, p.87-92 Piracicaba 1997.

Fetal Alcohol Spectrum Disorders (FASD) Center for Excellence Web site. 2007.

FOSSATI, A.C.M. Integrinas e Proteínas da Matriz Extracelular Durante o Desenvolvimento da Glândula Submandibular de Ratos. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000. 105 p.

FOSSATI, A.C.M. e RUSCHEL, H. Bases Biológicas In: KRAMER, P.F. Traumatismos na Dentição Decídua. São Paulo: Santos. 2005. Cap.2 311 p.

FREIRE, T.D.M., MACHADO, J.C., MELO, E.V.D. e MELO, D.G. Efeitos do Consumo de Bebida alcoólica sobre o Feto. Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia, v.27, n.7, p.376-81. 2005.

FUKUMOTO, S., MINER, J.H., IDA, H., FUKUMOTO, E., YUASA, K., MIYAZAKI, H., HOFFMAN, M.P. e YAMADA, Y. Laminin alpha5 is required for dental epithelium growth and polarity and the development of tooth bud and shape. J Biol Chem, v.281, n.8, p.5008-16 Feb 24. 2006.

GARBARSCHE, C., MATTHIESSEN, M.E., OLSEN, B.E., MOE, D. e KIRKEBY, S. Immunohistochemistry of the intercellular matrix components and the epithelio-mesenchymal junction of the human tooth germ. Histochem J, v.26, n.2, p.110-8 Feb. 1994.

GARDNER, L.P. e HIATT, J.L. Color Textbook of Histology. Londres: W.B.Saunders Company. 1997

GILBERT, S.F. Ramifications of Developmental Biology. In: GILBERT, S.F. Developmental Biology. Sunderland: Sinauer Associates, 2000. p.<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?highlight=teratogenic&rid=dbio.section.5173#5175>.

GRINFELD, H., GOLDENBERG, S., SEGRE, C.A. e CHADI, G. Fetal alcohol syndrome in Sao Paulo, Brazil. Paediatr Perinat Epidemiol, v.13, n.4, p.496-7 Oct. 1999.

GRITLI-LINDE, A., BEI, M., MAAS, R., ZHANG, X.M., LINDE, A. e MCMAHON, A.P. Shh signaling within the dental epithelium is necessary for cell proliferation, growth and polarization. Development, v.129, n.23, p.5323-37 Dec. 2002.

HADI, H.A., HILL, J.A. e CASTILLO, R.A. Alcohol and reproductive function: a review. Obstet Gynecol Surv, v.42, n.2, p.69-74 Feb. 1987.

HARALSON, M.A. e HASSELL, J.R. The extracellular matrix - an overview. In: Extracellular Matrix, A practical approach. New York: Oxford university press, 1995. p.1-30

HU, J.C. e SIMMER, J.P. Developmental biology and genetics of dental malformations. Orthod Craniofac Res, v.10, n.2, p.45-52 May. 2007.

JACKSON, I.T. e HUSSAIN, K. Craniofacial and oral manifestations of fetal alcohol syndrome. Plast Reconstr Surg, v.85, n.4, p.505-12 Apr. 1990.

JIMENEZ-FARFAN, D., GUEVARA, J., ZENTENO, E. e HERNANDEZ-GUERRERO, J.C. Alteration of the sialylation pattern of the murine tooth germ after ethanol exposure. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, v.73, n.12, p.980-8 Dec. 2005a.

JIMENEZ-FARFAN, D., GUEVARA, J., ZENTENO, E., MALAGON, H. e HERNANDEZ-GUERRERO, J.C. EGF-R and erbB-2 in murine tooth development after ethanol exposure. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, v.73, n.2, p.65-71 Feb. 2005b.

KATCHBURIAN, E. e ARANA, V. Histologia e Embriologia Oral. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1999

KIESER, J.A. Fluctuating odontometric asymmetry and maternal alcohol consumption. Ann Hum Biol, v.19, n.5, p.513-20 Sep-Oct. 1992.

KLATCHOIAN, D.A. A Formação do Vínculo em Odontopediatria In: Psicologia Odontopediátrica. São Paulo: Santos, . 2002. 375p. p.

KREIS, T. e VALE, R. Extracellular Matrix, Anchor and Adhesion Proteins. Nova York: Oxford University Press. 1999. 568p. p.

LI, S., EDGAR, D., FASSLER, R., WADSWORTH, W. e YURCHENCO, P.D. The role of laminin in embryonic cell polarization and tissue organization. Dev Cell, v.4, n.5, p.613-24 May. 2003.

LIESI, P. Ethanol-exposed central neurons fail to migrate and undergo apoptosis. J Neurosci Res, v.48, n.5, p.439-48 Jun 1. 1997.

LUUKKO, K. Neuronal cells and neurotrophins in odontogenesis. Eur J Oral Sci, v.106 Suppl 1, p.80-93 Jan. 1998.

MANN, L.I., BHAKTHAVATHSALAN, A., LIU, M. e MAKOWSKI, P. Placental transport of alcohol and its effect on maternal and fetal acid-base balance. Am J Obstet Gynecol, v.122, n.7, p.847-44 Aug 1. 1975.

MANNING, M.A. e EUGENE HOYME, H. Fetal alcohol spectrum disorders: a practical clinical approach to diagnosis. Neurosci Biobehav Rev, v.31, n.2, p.230-8. 2007.

MOORE, L.K. e PERSAUD, N.V.T. Embriologia Básica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2000

MURASHIMA-SUGINAMI, A., TAKAHASHI, K., KAWABATA, T., SAKATA, T., TSUKAMOTO, H., SUGAI, M., YANAGITA, M., SHIMIZU, A., SAKURAI, T., SLAVKIN, H.C. e BESSHO, K. Rudiment incisors survive and erupt as supernumerary teeth as a result of USAG-1 abrogation. Biochem Biophys Res Commun, v.359, n.3, p.549-55 Aug 3. 2007.

NATHAN, C. e SPORN, M. Cytokines in context. J Cell Biol, v.113, n.5, p.981-6 Jun. 1991.

OZER, E., SARIOGLU, S. e GURE, A. Effects of prenatal ethanol exposure on neuronal migration, neuronogenesis and brain myelination in the mice brain. Clin Neuropathol, v.19, n.1, p.21-5 Jan-Feb. 2000.

PETERS, H. e BALLING, R. Teeth. Where and how to make them. Trends Genet, v.15, n.2, p.59-65 Feb. 1999.

RILEY, E.P., THOMAS, J.D., GOODLETT, C.R., KLINTSOVA, A.Y., GREENOUGH, W.T., HUNGUND, B.L., ZHOU, F., SARI, Y., POWROZEK, T. e LI, T.K. Fetal alcohol effects: mechanisms and treatment. Alcohol Clin Exp Res, v.25, n.5 Suppl ISBRA, p.110S-116S May. 2001.

RUCH, J.V., LESOT, H. e BEGUE-KIRN, C. Odontoblast differentiation. Int J Dev Biol, v.39, n.1, p.51-68 Feb. 1995.

RYAN, M.C., LEE, K., MIYASHITA, Y. e CARTER, W.G. Targeted disruption of the LAMA3 gene in mice reveals abnormalities in survival and late stage differentiation of epithelial cells. J Cell Biol, v.145, n.6, p.1309-23 Jun 14. 1999.

SALMIVIRTA, K., SOROKIN, L.M. e EKBLUM, P. Differential expression of laminin alpha chains during murine tooth development. Dev Dyn, v.210, n.3, p.206-15 Nov. 1997.

SAMPSON, P.D., STREISSGUTH, A.P., BOOKSTEIN, F.L., LITTLE, R.E., CLARREN, S.K., DEHAENE, P., HANSON, J.W. e GRAHAM, J.M., JR. Incidence of fetal alcohol syndrome and prevalence of alcohol-related neurodevelopmental disorder. Teratology, v.56, n.5, p.317-26 Nov. 1997.

SANT'ANNA, L.B. e TOSELLO, D.O. A histomorphometrical Study of the Effects of Ethanol on Enamel Formation in Rat Mandibular Molars during Pregnancy. Braz. J. Morphol. Sci, v.22, n.3, p.155-9. 2005.

SANT'ANNA, L.B. e TOSELLO, D.O. Fetal alcohol syndrome and developing craniofacial and dental structures--a review. Orthod Craniofac Res, v.9, n.4, p.172-85 Nov. 2006.

SANT'ANNA, L.B., TOSELLO, D.O. e PASETTO, S. Effects of maternal ethanol intake on immunoexpression of epidermal growth factor in developing rat mandibular molar. Arch Oral Biol, v.50, n.7, p.625-34 Jul. 2005.

SCHOUR, I. e MASSLER, M. The Teeth. In: GRIFFITH, JQ e FARRIS, EJ The rat in laboratory investigation. Philadelphia: J.B.Lippincott Company 1942. p.102-63.

SOUZA, M.A.L. A morphometric and histological study on the development and eruption on the rat mandibular first molar tooth. University of Newcastle Upon Tyne Newcastle, 1981. 164 p.

SPOHR, H.L., WILLMS, J. e STEINHAUSEN, H.C. Fetal alcohol spectrum disorders in young adulthood. J Pediatr, v.150, n.2, p.175-9, 179 e1 Feb. 2007.

STREISSGUTH, A.P., LANDESMAN-DWYER, S., MARTIN, J.C. e SMITH, D.W. Teratogenic effects of alcohol in humans and laboratory animals. Science, v.209, n.4454, p.353-61 Jul 18. 1980.

SULIK, K.K. Genesis of alcohol-induced craniofacial dysmorphism. Exp Biol Med (Maywood), v.230, n.6, p.366-75 Jun. 2005.

SULIK, K.K., JOHNSTON, M.C. e WEBB, M.A. Fetal alcohol syndrome: embryogenesis in a mouse model. Science, v.214, n.4523, p.936-8 Nov 20. 1981.

TEN CATE, R. Histologia bucal : desenvolvimento, estrutura e função. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001. 439 p.

THESLEFF, I. Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. J Cell Sci, v.116, n.Pt 9, p.1647-8 May 1. 2003.

THESLEFF, I., BARRACH, H.J., FOIDART, J.M., VAHERI, A., PRATT, R.M. e MARTIN, G.R. Changes in the distribution of type IV collagen, laminin, proteoglycan, and fibronectin during mouse tooth development. Dev Biol, v.81, n.1, p.182-92 Jan 15. 1981.

THESLEFF, I. e VAAHTOKARI, A. The role of growth factors in determination and differentiation of the odontoblastic cell lineage. Proc Finn Dent Soc, v.88 Suppl 1, p.357-68. 1992.

THESLEFF, I., VAAHTOKARI, A. e PARTANEN, A.M. Regulation of organogenesis. Common molecular mechanisms regulating the development of teeth and other organs. Int J Dev Biol, v.39, n.1, p.35-50 Feb. 1995.

THESLEFF, I., VAAHTOKARI, A., VAINIO, S. e JOWETT, A. Molecular mechanisms of cell and tissue interactions during early tooth development. Anat Rec, v.245, n.2, p.151-61 Jun. 1996.

THESLEFF, I., VAINIO, S. e JALKANEN, M. Cell-matrix interactions in tooth development. Int J Dev Biol, v.33, n.1, p.91-7 Mar. 1989.

TIMPL, R. Macromolecular organization of basement membranes. Curr Opin Cell Biol, v.8, n.5, p.618-24 Oct. 1996.

TIMPL, R., ROHDE, H., ROBEY, P.G., RENNARD, S.I., FOIDART, J.M. e MARTIN, G.R. Laminin- α glycoprotein from basement membranes. J Biol Chem, v.254, n.19, p.9933-7 Oct 10. 1979.

WEBB, P.P., MOXHAM, B.J., RALPHS, J.R. e BENJAMIN, M. Immunolocalisation of collagens in the developing rat molar tooth. Eur J Oral Sci, v.106 Suppl 1, p.147-55 Jan. 1998.

YOSHIBA, K., YOSHIBA, N., ABERDAM, D., MENEGUZZI, G., PERRIN-SCHMITT, F., STOETZEL, C., RUCH, J.V. e LESOT, H. Expression and localization of laminin-5 subunits during mouse tooth development. Dev Dyn, v.211, n.2, p.164-76 Feb. 1998.

YUASA, K., FUKUMOTO, S., KAMASAKI, Y., YAMADA, A., FUKUMOTO, E., KANAOKA, K., SAITO, K., HARADA, H., ARIKAWA-HIRASAWA, E., MIYAGOE-SUZUKI, Y., TAKEDA, S., OKAMOTO, K., KATO, Y. e FUJIWARA, T. Laminin α 2 is essential for odontoblast differentiation regulating dentin sialoprotein expression. J Biol Chem, v.279, n.11, p.10286-92 Mar 12. 2004.

ZHANG, Y.D., CHEN, Z., SONG, Y.Q., LIU, C. e CHEN, Y.P. Making a tooth: growth factors, transcription factors, and stem cells. Cell Res, v.15, n.5, p.301-16 May. 2005.