

LUCIANA BARROS SANT'ANNA

***EFEITOS DA INGESTÃO DO ÁLCOOL DURANTE A
GESTAÇÃO NA IMUNOEXPRESSÃO DO EGF NA
AMELOGÊNESE E DENTINOGENESE DO 1º MOLAR
INFERIOR DE RATOS***

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Biologia Buco-Dental, área de concentração em Histologia e Embriologia.

PIRACICABA
2004

LUCIANA BARROS SANT'ANNA

***EFEITOS DA INGESTÃO DO ÁLCOOL DURANTE A
GESTAÇÃO NA IMUNOEXPRESSÃO DO EGF NA
AMELOGÊNESE E DENTINOGENESE DO 1º MOLAR
INFERIOR DE RATOS***

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Biologia Buco-Dental, área de concentração em Histologia e Embriologia.

Orientadora: Profa.Dra.Darcy de Oliveira Tosello

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Darcy de Oliveira Tosello

Profa. Dra. Emilia Angela Loschiavo Arisawa

Prof. Dr. Jesus Carlos Andreo

Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line

Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez

PIRACICABA
2004

Ficha Catalográfica

Sa59e Sant'ana, Luciana Barros.
Efeitos da ingestão do álcool durante a gestação na imunoexpressão do EGF na amelogênese e dentinogênese do 1º molar inferior de ratos. / Luciana Barros Sant'ana. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2004.
x, 86f. : il.

Orientadora : Profª Drª Darcy de Oliveira Tosello.
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Histologia dentária. 2. Imunohistoquímica. 3. Esmalte dentário. 4. Dentina. I. Tosello, Darcy de Oliveira. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8-6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 18 de Fevereiro de 2004, considerou a candidata LUCIANA BARROS SANT'ANNA aprovada.

1. Profa. Dra. DARCY DE OLIVEIRA TOSELLO

2. Profa. Dra. EMILIA ÂNGELA LOSCHIAVO ARISAWA

3. Prof. Dr. VICTOR ELIAS ARANA CHAVES

4. Prof. Dr. JESUS CARLOS ANDREO

5. Prof. Dr. SERGIO ROBERTO PERES LINE

DEDICATÓRIA

*A meus pais Paulo e Marina,
que com seus sacrifícios me possibilitaram
o estudo e me mostraram o caminho da fé,
do amor e do trabalho.*

*Ao Nilson meu esposo,
por ter dado novo sentido à minha vida,
companheiro constante, cuja paciência,
compreensão e estímulo foram imprescindíveis
para a realização desse trabalho.*

*Aos meus filhos Pedro Miguel e Felipe,
razão da minha vida e fruto do amor puro
e verdadeiro, pela alegre presença em
todos os momentos da minha vida, mesmo
naqueles, em que estive ausente.*

AGRADECIMENTOS

Eu pedi força....

e Deus me deu dificuldades para me fazer forte.

Eu pedi sabedoria...

E Deus me deu problemas para resolver.

Eu pedi prosperidade...

E Deus me deu cérebro e músculo para trabalhar.

Eu pedi coragem...

E Deus me deu pessoas com problemas para resolver.

Eu pedi favores...

E Deus me deu oportunidades.

Eu não recebi nada do que pedi

Mas eu recebi tudo de que precisava.

(Autor desconhecido)

*Obrigada Senhor, pelo dia de hoje, pela família que me deste,
meu trabalho e sobretudo pela presença Tua em minha vida
permitindo, assim a realização desta pesquisa.*

*À orientadora e amiga,
Professora Associada Dra. Darcy de Oliveira Tosello*

"Cada um que passa em nossa vida, passa sozinho, pois cada pessoa é única e nenhuma substitui outra.

*Cada um que passa em nossa vida, passa sozinho, mas não vai só nem nos deixa sós.
Leva um pouco de nós mesmos, deixa um pouco de si mesmo.*

Há os que levam muito, mas há os que não levam nada.

Essa é a maior responsabilidade de nossa vida, e a prova de que duas almas não se encontram ao acaso. "

(Antoine de Saint-Exupéry)

*Pela confiança em mim depositada e oportunidade
de ingresso e continuidade do curso de pós-graduação.*

Por me receber atenciosamente como sua orientada.

*Pela competência com que sempre conduziu suas
atribuições na carreira de docente.*

*Pelos conhecimentos transmitidos com sabedoria e
decisão no decorrer da pesquisa.*

*Pela espontaneidade do seu jeito de ser, que muito
contribuiu e contribui para o meu viver.*

*Pela capacidade de sorrir mesmo quando a vida
parece fechar as portas para o nosso caminhar.*

*Por me lembrar sempre, que quando algumas portas
se fecham, outras se abrem...*

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP, na pessoa de seu DD. Diretor Professor Doutor Thales Rocha de Mattos Filho e da coordenadora do programas de Pós-Graduação de Biologia Buco Dental, Profa. Dra. Silvana Pereira Barros, pelas condições oferecidas para a realização desse curso de pós-graduação.

Ao Professor Titular Sérgio Roberto Peres Line da área de histologia do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba -UNICAMP, pela competência e dedicação à pesquisa e grande capacidade de transmissão dos conhecimentos técnicos científicos.

Ao Professor Associado Pedro Duarte Novaes, da área de histologia do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba -UNICAMP, por dedicar parte do seu tempo precioso durante a realização das fotografias das lâminas histológicas desse trabalho.

Ao Professor Titular José Merzel da área de histologia do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba -UNICAMP, pela suas criteriosas observações e por ter compartilhado seus valiosos conhecimentos científicos na área de histologia.

À Professora Associada Fernanda Klein Marcondes, da área de fisiologia e biofísica do Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia de Piracicaba -UNICAMP, pela orientação e auxílio no tratamento dos animais.

À Professora Associada Glaucia M. Bovi Ambrosano, da área de bioestatística do Departamento de Odontologia Social da Faculdade de Odontologia de Piracicaba -UNICAMP, pelo auxílio na análise estatística dos resultados desse trabalho.

À bióloga Eliene Ap. Orsini Narvaes Romani, técnica do laboratório de microscopia eletrônica do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, pelo auxílio e atenção dispensados no decorrer de todo o trabalho.

À técnica Maria Aparecida Santiago Varella do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, cujas simpatia e atenção foram de imensurável valor durante o desenvolvimento da fase laboratorial. Minha gratidão!

Ao técnico Vanderley Francisco Vieira, do Biotério da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, pela colaboração na manipulação e tratamento dos animais utilizados nesta pesquisa.

À bibliotecária Heloísa M. Ceccotti, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, pelo valioso auxílio na elaboração desse trabalho.

Aos amigos e colegas do curso de doutorado, pela amizade e companheirismo que tivemos durante esse período de formação, principalmente à Cristiane Salmon, a qual proporcionou-me uma agradável estadia em sua residência no período que fiquei em Piracicaba.

À minha amiga Silvana Pasetto, cujos desprendimento, altruísmo e colaboração inestimáveis durante a padronização da técnica da imunohistoquímica, foram imprescindíveis para a realização deste trabalho. Minha eterna gratidão!

À minha amiga Valéria Abrantes Pinheiro Carvalho, pelas alegrias e dificuldades vividas juntas nesses anos de convivência.

À todos que de uma maneira ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho e fizeram parte de minha vida.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro indispensável à realização das atividades científicas (Processo nº140140/2001-8).

meu muito obrigada.

Muito além de uma porta...

“Se você encontrar uma porta à sua frente poderá abri-la ou não.

Se você abrir a porta, poderá ou não entrar em uma nova sala.

Para entrar, você vai ter que vencer a dúvida, titubeio ou o medo.

Se você venceu você deu um grande passo: nesta sala vive-se.

Mas também tem um preço: são inúmeras as outras portas que você descobre. O grande segredo é saber quando e qual porta deve ser aberta.

A vida não é rigorosa: ela propicia erros e acertos.

Os erros podem ser transformados em acertos, quando, com eles, se aprende. Não existe a segurança do acerto eterno.

A vida é generosa: a cada sala em que se vive, descobre-se outras tantas portas. A vida enriquece a quem se arrisca a abrir novas portas.

Ela privilegia quem descobre seus segredos, e generosamente oferece afortunadas portas.

Mas a vida também pode ser dura e severa: se você não ultrapassar a porta, terá sempre a mesma porta pela sua frente. É a repetição perante a criação. É a monotonia cromática perante o arco-íris. É a estagnação da vida.

Para a vida, as portas não são obstáculos...

São apenas diferentes passagens.”

Dr. Içami Tiba

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS	1
RESUMO	2
ABSTRACT	3
1. INTRODUÇÃO	4
2. REVISÃO DA LITERATURA	7
2.1 Efeitos do álcool sobre as células	8
2.2 Mecanismos de ação do álcool	13
2.2.1 Efeitos indiretos ou secundários: hipóxia fetal	13
2.2.2 Efeitos diretos ou primários sobre o tecido fetal	14
2.3 Fator de Crescimento Epidermal (EGF)	17
2.4 Efeitos do álcool sobre o EGF	22
2.5 Efeitos do álcool sobre o EGF no germe dental	24
3. PROPOSIÇÃO	25
4. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 Animais	26
4.2 Processamento histológico	27
4.3 Preparo das lâminas	28

4.4 Microtomia	29
4.5 Imunohistoquímica	29
4.6 Análise Estatística	31
5. RESULTADOS	33
5.1 Desenvolvimento das ratas no período de tratamento	33
5.2 Desenvolvimento dos filhotes	40
5.3 Imunoexpressão do Fator de Crescimento Epidermal (EGF)	41
5.3.1 Período de 0º dia pós-natal	44
5.3.2 Período de 4º dia pós-natal	50
5.3.3 Período de 9º dia pós-natal	55
6. DISCUSSÃO	62
7. CONCLUSÕES	73
REFERÊNCIAS	74
ANEXO	86

LISTA DE SIGLAS

Aa	aminoácido
AR	Anfiregulina
bFGF	Fator de Crescimento fibroblástico básico
BSA	Albumina de soro bovino
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
EGF	Fator de crescimento epidermal
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidermal
GF	Fator de crescimento
Grb 2	Receptor do fator de crescimento ligado à proteína 2
HBEGF	EGF ligado à heparina
HCl	Ácido clorídrico
¹²⁵ I-EGF	EGF marcado com iodo 125
IGF-I	Fator de crescimento semelhante à insulina-I
IGF-II	Fator de crescimento semelhante à insulina-II
KD	Kilo Dalton
PBS	Solução tampão fosfato
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaqueta
PLC γ 1	Fosfolipase C- γ 1
SFA	Síndrome fetal alcoólica
Shc	Família de proteínas
SNC	Sistema nervoso central
TGF- β	Fator de crescimento beta-transformador

RESUMO

Estudos prévios, relatam que a exposição materna ao álcool reduz o desenvolvimento maxilo-facial, incluindo retardo na formação e na erupção do germe dental, assim como anomalias do esmalte. Os mecanismos destas ações deletérias não estão totalmente esclarecidos. O objetivo deste estudo foi avaliar usando anticorpo policlonal do Fator Epidermal de Crescimento (EGF), a imunoexpressão do EGF durante a amelogênese do 1º molar inferior de filhotes de ratas que ingeriram álcool em concentrações teratogênicas antes e durante a gestação. Dezoito ratas receberam uma solução de água e etanol (grupo tratado) em concentrações crescentes de 1%,5%,10%,15%,20% e 25%: (v/v) alteradas semanalmente. Na 7ª semana, estas ratas foram postas para acasalar durante uma noite e continuaram a receber a solução de 25% de álcool até ao final da gestação. Destas, somente 10 ficaram prenhas e 7 chegaram a termo. Dez ratas (grupo controle) receberam somente água durante o mesmo período, foram postas para acasalamento por uma noite e somente 6 ficaram prenhas. Nos dias 0, 4º e 9º pós-natal foram sacrificados 2 filhotes de cada ninhada para a remoção das hemi-mandíbulas, as quais foram processadas e incluídas em paraplast e contra-coradas em hematoxilina de Mayer. No 0 dia pós-natal, no grupo controle foi encontrada marcação forte para o EGF, no epitélio interno do órgão do esmalte e nos pré-ameloblastos, porém, no grupo tratado, a marcação nestas mesmas estruturas foi fraca. No 4º dia pós-natal, a marcação forte foi encontrada nos ameloblastos secretores e odontoblastos do grupo controle, enquanto que no grupo tratado, a marcação foi moderada. No 9º dia pós-natal, no grupo controle foi observada marcação de intensidade forte nos ameloblastos em maturação, sendo que no grupo tratado, a marcação foi fraca. Esses resultados sugerem que a ingestão de álcool durante a gestação, interferiu com a expressão do EGF durante os estágios iniciais da amelogênese e na secreção e maturação do esmalte

ABSTRACT

Previous studies have reported that the maternal exposure to alcohol reduces the maxilo-facial development, including a delay in the formation and eruption of the tooth, as well as, enamel anomalies. The mechanisms of these deleterious effects are not fully clarified. The objective of this study was to analyze using polyclonal antibody of the Epidermal Growth Factor (EGF), the immunoexpression of the EGF during amelogenesis of the first mandibular molar on offspring of female rats that ingested alcohol in teratogenic concentrations before and during pregnancy. Eighteen female rats were given ethanol in drinking water (treated group) starting at concentrations of 1% and increasing weekly to 5%, 10% 15%, 20% an 25%: (v/v). On week 7, these rats were mated overnight and continued to receive the 25% alcoholic solution, up to delivery. Ten female rats got pregnant, but only 7 gave birth. Another group of 10 female rats (control group) received just water during the same period, were put to mate at the same time and only 6 got pregnant. On the 0, 4th and 9th post-natal days, two offspring of each brood were killed their hemi-mandibles removed, processed for paraplast embedding and counter-stained in Mayer's hematoxilin. In the control group it was found in the 0 post-natal day, strong intensity for EGF in the inner dental epithelium and pre-ameloblasts, but in the treated group, the immunostaining in these same structures was weak. On the 4th post-natal day, strong intensity was observed in the secretory ameloblasts and odontoblasts of the control group, however, in the treated group the immunostaining was moderate. On the 9th post-natal day, strong intensity for EGF was noted for the control group and weak for the treated, in the mature ameloblasts. These results suggested that, the alcohol ingestion in teratogenic doses during pregnancy, interfered with the EGF expression at the initial stages of amelogenesis and in the secretion and maturation of the enamel.

1. INTRODUÇÃO

A exposição ao álcool durante a gestação causa uma série de malformações congênitas no feto, decorrentes de interferências nos processos fisiológicos, durante o desenvolvimento embrionário normal e conhecidas coletivamente como Síndrome Fetal Alcoólica (S.F.A.). As alterações observadas nas crianças portadoras desta Síndrome, compreendem disfunção neurológica, retardo no crescimento pré e pós-natal e um distinto padrão de anomalias faciais. As anomalias crânio-faciais e oro-dentais representam 80% dos defeitos observados nos indivíduos com a SFA (Streissguth *et al.*⁶³, 1991). Church *et al.*¹⁰ (1997) e Jackson & Hussain²⁹ (1990) relataram a presença de dentes pequenos, hipoplasia do esmalte e retardo na erupção da dentição permanente.

Outros estudos, em ratos, demonstraram o retardo na erupção e no crescimento pós-eruptivo dos dentes incisivos (Tomazela *et al.*⁷¹, 1997; Silva *et al.*⁵⁸, 1999). O retardo na erupção dentária também foi observado no 1º molar inferior de camundongos, assim como a diminuição no tamanho do germe dentário (Guerrero *et al.*²⁵, 1996). Guerrero²³ (1990), verificou que a ingestão de álcool antes e durante a gestação, causava redução na proliferação celular do germe dentário em fase de botão e retardo na calcificação da matriz dentinária. Alguns trabalhos revelaram que a amelogenese pode ser afetada por vários agentes químicos, incluindo tetraciclina (Westergaard,⁸³ 1980) e nicotina (Saad,⁵¹ 1991) gerando, assim, defeitos permanentes na estrutura do esmalte. Römert & Matthiessen⁵⁰ (1988), observaram alterações na ultraestrutura dos ameloblastos no estágio secretor dos germes dentários de fetos de mini porcos. Estas alterações refletiram uma função secretora anormal dos ameloblastos. Um estudo preliminar, em molares de ratos, revelou que o álcool durante a gestação causou uma redução no desenvolvimento do germe dentário e na espessura da matriz do

esmalte (Sant' Anna,⁵² 2001; Sant' Anna *et al.*⁵³, 2001) e da matriz dentinária (Tosello *et al.*⁷⁴, 2001)

Os mecanismos pelos quais o álcool atua sobre células e tecidos não estão totalmente esclarecidos. Esses mecanismos de ação podem ser devidos a vários processos, incluindo interações ao nível de membrana entre as células em desenvolvimento, alterações em processos celulares e metabólicos (síntese, secreção protéica, metabolismo do cálcio, transporte de aminoácidos através da placenta, entre outros) e nos fatores de crescimento, necessários para o crescimento normal (Guerrero *et al.*²⁴, 1998). Segundo este autor é possível especular que o álcool influencia no papel fisiológico do Fator de Crescimento Epidermal (EGF).

O EGF é um polipeptídeo de massa molecular de 6,045kD e 53 aa. Foi primeiramente isolado de extratos de glândula submandibular de ratos machos e foi descoberto inicialmente pela sua habilidade de induzir a abertura precoce das pálpebras e erupção de dente incisivo de rato (Cohen¹³, 1962). Também é encontrado em diferentes órgãos (rim, pulmão, pele, dente) e fluídos corpóreos (saliva, urina, leite, plasma). Originalmente o EGF estimula a proliferação de células epiteliais e mesenquimais e a diferenciação de ambas, promove a síntese de macromoléculas e reabsorção do osso (Carpenter & Cohen⁸, 1979) tendo um papel importante no controle da remodelação óssea (Davideau *et al.*¹⁶, 1995).

Vários estudos demonstraram a presença do EGF e/ou seu receptor (EGFR) nas células do órgão dentário durante os estágios da amelogênese. Durante a fase de cito e histodiferenciação o EGF foi localizado no epitélio dentário interno, células ectomesenquimais da papila dentária, ameloblastos e odontoblastos (Cam *et al.*⁵, 1990; Cobo *et al.*¹², 1992). Outros autores como: Topham *et al.*⁷², (1987); Martineau-Doizé *et al.*⁴², (1991); Tanikawa e Bawden⁶⁶(1999), localizaram o EGF nos odontoblastos, ameloblastos e estrato intermédio durante o período de secreção e nos ameloblastos de superfície estriada durante a maturação do esmalte, sugerindo a participação do EGF no controle dessas funções celulares.

Estudos *in vivo* e *in vitro*, realizados no fígado (Henderson *et al.*²⁷, 1989; O'Rourke *et al.*⁴³, 1997; Saso *et al.*⁵⁴, 1997) e na mucosa bucal de ratos (Wang *et al.*⁷⁷, 1991; Wang *et al.*⁷⁶, 1992) demonstraram o efeito tóxico do álcool sobre o EGF e seu receptor. Esses estudos verificaram que o álcool age inibindo a atividade enzimática do EGFR e conseqüentemente sua função fisiológica causando a diminuição na ligação do EGF ao seu receptor. Portanto o álcool altera a habilidade do EGF ativar a tirosinoquinase do receptor promovendo, assim um acúmulo de receptores inativos na superfície dos hepatócitos do fígado dos ratos expostos cronicamente ao álcool (O'Rourke *et al.*⁴³, 1997).

Entretanto, pouca atenção tem sido dada à observação dos efeitos do álcool sobre a expressão do EGF durante o desenvolvimento do germe dentário, *in vivo*. Guerrero *et al.*²⁵ (1996) analisaram o efeito da ingestão materna de álcool sobre o EGF na odontogênese de camundongos com 1,5^o dia pós-natal, e descreveram que a imunexpressão do EGF no folículo dentário do 1^o molar inferior, era forte e homogênea no grupo controle, porém fraca e heterogênea no tratado, sugerindo que a diminuição no tamanho do germe dentário dos animais tratados pode ter sido devida à inibição do EGF pelo álcool. Portanto, a hipótese central deste trabalho é que a exposição materna ao álcool, altera o desenvolvimento dentário, incluindo a formação do esmalte pela interferência na expressão do EGF. Esta hipótese é baseada na evidência de que o álcool afeta os processos celulares, tais como: proliferação, diferenciação, síntese, secreção e maturação, os quais são regulados pelo EGF.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Lemoine *et al.*³⁷, em 1968 descreveram alguns defeitos característicos na prole de alcoólatras. Entretanto, somente em 1973, Jones *et al.*³⁰ descreveram o padrão completo das malformações observadas nas crianças de mães alcoólatras, e o termo “Síndrome Fetal Alcoólica” foi estabelecido (SFA). Ela é caracterizada por um pronunciado retardo no crescimento pré e pós-natal, microcefalia, disfunção neurológica e retardo mental. As características crânio-faciais da síndrome mais conhecidas e comumente observadas são: hipoplasia de filtro labial (filtro indistingüível ou pequeno sulco vertical), lábio superior estreito, fissura palpebral curta, retrognatismo na infância e relativo prognatismo na adolescência, porção média da face pequena e achatada, hipoplasia maxilar, nariz pequeno e arrebitado e orelhas malformadas. Ocasionalmente, pode-se observar fenda labial e fenda palatina (Clarren & Smith¹¹, 1978).

Church *et al.*¹⁰ (1997) em um estudo com 22 pacientes, observaram uma alta incidência de anomalias dento-faciais e também na articulação têmporo - mandibular (ATM). Desse total, 12 deles apresentaram fenda palatina, sendo que 4 pacientes tinham fenda palatina associada com fenda labial. Já outros 15, mostraram alterações dentais, tais como, mordida cruzada, mordida aberta, agenesia dentária, dentes girovertidos, diastema, hipoplasia do esmalte e retardo na erupção da dentição permanente. Já a disfunção da ATM foi significativa em 4 pacientes. Segundo os autores os casos de maloclusão dentária são influenciados pela raça e sexo do indivíduo.

Jackson *et al.*²⁹ (1990), estudaram o desenvolvimento crânio facial e dentário de pacientes que apresentaram a SFA, por meio de análise cefalométrica (análise de Bolton), radiografias periapicais e exame clínico da cavidade oral. Os resultados mostraram uma base do crânio extremamente inclinada, desenvolvimento incompleto da região média da face com deficiência no conteúdo

ósseo (particularmente a maxila, espinha, osso e abertura nasais) e incisivos superiores inclinados para compensar a retrusão maxilar. Com relação à cavidade oral esses autores observaram palato ogival, e anomalias do esmalte (esmalte opaco na incisal e oclusal dos dentes decíduos). Dos 6 casos estudados, dois apresentaram moderada queda no desenvolvimento dentário (de 6 a 10 meses). Uma análise posterior deste desenvolvimento demonstrou em um dos casos que aos 13 anos de idade o hipodesenvolvimento dentário permaneceu aproximadamente o mesmo, indicando uma constância. Entretanto não foram observadas alterações na posição e tamanho dos dentes.

2.1 Efeitos do álcool sobre as células

Estudos em camundongos demonstraram que a administração intraperitoneal de 25% de álcool no 7^o dia de prenhez (estágio de gástrula do embrião) está associada com malformações faciais e cardíacas similares àquelas encontradas nas crianças com SFA. A microscopia eletrônica de varredura de embriões, 24 horas após a exposição inicial, revelou uma redução no tamanho da placa neural, a qual foi particularmente visível na região do prosencéfalo. Assim, deficiências da placa neural neste estágio resultam no desenvolvimento anormal do cérebro. Em um estágio embrionário mais avançado evidenciou-se anormalidades no desenvolvimento do processo nasal mediano, área responsável pela formação do filtro labial, do processo alveolar maxilar, local de implantação dos incisivos e da porção anterior do palato duro. Uma análise posterior do esqueleto do crânio dos animais recém nascidos do grupo tratado mostrou ausência da pré-maxila (Sulik & Johnston⁶⁴, 1983).

Clarren & Smith¹¹ (1978) afirmam, que o córtex cerebral é particularmente suscetível aos efeitos da exposição pré-natal ao álcool. Sendo assim, Zhou *et al.*⁸⁸ (2001) submeteram ratas a uma dieta líquida onde o álcool promovia 20% das calorias diárias, entre os 8^o e 14^o dias de prenhez, com o

objetivo de avaliar os neurônios responsáveis pela produção de serotonina. No 15^o dia pré-natal, foram obtidos os cérebros dos fetos, os quais foram processados para imunohistoquímica. Os neurônios do grupo tratado com álcool apresentaram três aspectos de anormalidade: atraso na migração, menor diferenciação e diminuição no número de neurônios no córtex cerebral. Estas alterações levaram a uma menor quantidade de serotonina, conseqüentemente causando interferência no processo de sinalização celular durante a maturação cerebral com prejuízo, por exemplo, no processamento das sensações.

Ludena *et al.*⁴⁰ (1983) administraram álcool à água de ratas em concentrações crescentes de 10%, 15%, 25% e 30%, alteradas semanalmente. Durante o período de gestação e lactação as ratas foram mantidas com a solução de 30% de álcool. Um segundo grupo de ratas recebeu a mesma concentração de álcool, porém somente até o 21^o dia de gestação e o grupo controle recebeu água *ad libitum* durante todo período de tratamento. Foram avaliados, o peso e o comprimento dos animais, as dimensões (largura e comprimento) dos ossos dos membros superiores e inferiores, assim como o número de centros de ossificação. Verificaram, que os filhotes das ratas do 1^o grupo apresentavam diminuição no peso, no comprimento e retardo na maturidade óssea. Ao contrário, os filhotes de mães que receberam álcool somente até o 21^o dia de gestação, mostravam normalização no peso e no comprimento ao 15^o dia pós-natal, entretanto a maturidade óssea ainda continuava reduzida. Esses dados confirmam a hipótese, de que o consumo materno de álcool antes e durante a gestação, afetou os mecanismos regulatórios do crescimento durante o desenvolvimento embrionário, sendo este efeito persistente após o nascimento.

Giglio *et al.*¹⁹ (1987) estudou as mandíbulas de filhotes de ratas que ingeriram álcool na água em concentrações de 5% e 10% por um período de duas semanas antes da gestação e 20% durante a gestação. Verificaram que certas regiões da mandíbula eram mais afetadas pelo álcool do que outras. As mais afetadas foram: altura da base, comprimento e largura do processo condilar e altura da região da sínfise. As menos afetadas foram: comprimento da base,

comprimento do processo angular, comprimento e altura da mandíbula e altura do processo coronóide. A espessura da mandíbula medida em 3 regiões diferentes (forame mental, 1º molar e forame mandibular) não mostrou diferença significativa entre os grupos controle e tratado. Os resultados sugeriram que o crescimento aposicional do osso não foi afetado.

Segundo Edwards & Dow-Edwards¹⁷ (1991) a ingestão de 6,7% (v/v) de álcool em ratas entre o 6º e 21º dias da gestação, produziu diminuição no peso materno, no peso dos filhotes ao nascimento e redução no comprimento e na largura do crânio (palato e maxila) e da mandíbula nos filhotes com 100 dias de vida. A altura da mandíbula não foi afetada. Estes resultados foram devidos a um desequilíbrio hormonal e/ou nutricional, juntamente com uma alteração na síntese proteica dos osteoblastos e/ou na proliferação celular do prosencéfalo.

Guerrero *et al.*²⁴ (1998) administraram álcool à água de camundongos fêmeas em concentrações crescentes de, 1%, 5%, 10%, 15% e 20% por um período de duas semanas antes da prenhez. Após a constatação desta, as ratas prenhas ficaram expostas a 20% de álcool. Nos 14.5º, 21.5º e 28.5º dias de vida pós-natal, eles verificaram uma redução nas medidas do crânio e da mandíbula dos filhotes das ratas tratadas. Além disto, foi observado também uma diminuição no ganho de peso materno durante a prenhez e no peso dos filhotes ao nascimento.

Quanto às influências do álcool sobre o germe dentário, poucas pesquisas têm sido descritas na literatura. Segundo Thesleff *et al.*⁷⁰ (1995), citado por Partanen (1998), o desenvolvimento dentário está sob controle genético, porém é suscetível a modificações por fatores ambientais.

Schour & Massler⁵⁵ (1971) postulam que o dente é mais que um órgão mastigatório, suas propriedades peculiares são um valioso indicador biológico que reflete e registra, durante o seu desenvolvimento, as condições metabólicas do animal. Estes registros, diferentes daqueles em ossos não são transitórios, mas sim permanentemente gravados na estrutura do esmalte e dentina, onde não ocorre reabsorção, ou seja, qualquer distúrbio na função dos odontoblastos e

ameloblastos leva a defeitos permanentes na dentina e esmalte, respectivamente. A fim de analisar a resposta dos tecidos dentários às interferências locais ou sistêmicas, deve-se fazer distinção entre estruturas em crescimento e aquelas que não estão mais nesta fase. A reação biológica do tecido depende do estado metabólico das células formadoras dele. Se estas células estão ativas na formação, fatores locais ou sistêmicos afetarão o tecido em desenvolvimento e os distúrbios causados serão automaticamente refletidos e registrados na estrutura em crescimento. Por outro lado, após o crescimento e desenvolvimento estarem completos as células formadoras tornam-se quiescentes, não ativas ou até mesmo se degeneram e se perdem, como por exemplo, os ameloblastos. Conseqüentemente, não existirão células formadoras para serem afetadas e nenhuma estrutura em crescimento para refletir os distúrbios causados pelos fatores locais ou sistêmicos.

Em 1988, Campos & Duranza⁷, estudaram os efeitos do consumo prolongado de álcool sobre o desenvolvimento dentário. Para isto administraram 25% de álcool à água de ratas prenhas. Ao 14^o dia de vida intra-uterina os fetos foram removidos e suas maxilas e mandíbulas processadas para observação do germe dentário em microscopia de luz. O germe dentário em fase de botão apresentou a camada basal constituída por células em diferentes alturas, sugerindo a presença de mais de uma camada de células nesta região. Esta alteração também foi encontrada nas células dos epitélios do órgão dentário em fase de capuz, sendo mais pronunciada no epitélio interno.

Ainda em 1988, Römert & Matthiessen⁵⁰ pesquisaram os germes dentários de fetos de mini-porcos de mães que receberam doses variadas de álcool durante a gestação. No grupo tratado foram observadas alterações ultraestruturais nos ameloblastos secretores do germe dentário de todos os fetos, independente da quantidade de álcool administrada. Foram descritas também, forma e tamanho anormais das mitocôndrias e deposição de um material granular elétron denso no espaço intercelular. Desde que este material é normalmente encontrado dentro do processo de Tomes e em contato com o esmalte recém

formado, os autores puderam concluir que as alterações celulares observadas evidenciam a influência do álcool na função secretora do ameloblasto e conseqüentemente na formação do esmalte.

Guerrero²³ (1990) estudou os efeitos da ingestão materna de álcool sobre o germe dentário de filhotes de camundongos que receberam, via oral, 20% de álcool antes e durante a gestação. No grupo tratado o álcool foi administrado à água dos animais em concentrações crescentes de 1%, 5%, 10%, 15% e 20%, enquanto que os animais controles recebiam água *ad libitum*. Nos 1,5^o, 3,5^o, 7,5^o, 14,5^o, 21,5^o e 28,5^o dias de vida pós-natal as mandíbulas foram removidas e processadas para inclusão em parafina. Os seguintes resultados foram descritos: a) os animais do grupo tratado tiveram um período gestacional prolongado (22 dias) com redução no tamanho da ninhada. b) o peso materno durante a prenhez foi significativamente menor no grupo tratado. c) o germe dentário do 1^o molar inferior do grupo tratado apresentou-se ao 14,5^o dia de gestação em fase de botão, porém com menor desenvolvimento que no grupo controle. d) ao 1,5^o dia pós-natal a matriz dentinária não mostrou nenhum sinal de calcificação, evidenciando o retardo da mesma no grupo tratado. e) o germe dentário do 1^o molar inferior ao 14,5^o dia pós-natal mostrou retardo na erupção dentária nos animais do grupo tratado. Estes aspectos histológicos foram observados em 66% deste grupo. Sendo assim o autor concluiu que a ingestão materna de álcool causa retardo no desenvolvimento dentário de filhotes de camundongos.

Tomazela *et al.*⁷¹ (1997) estudaram o desenvolvimento do germe dentário e crescimento pós-eruptivo de incisivos de ratos submetidos aos efeitos do álcool etílico durante o período gestacional. No 7^o dia de gestação, etapa significativa na formação do crânio e face, nas ratas do grupo tratado, foram administradas 2 doses de 0,015 ml de álcool etílico (25%) por grama de peso corpóreo, via intraperitoneal, com intervalo de 4 horas entre as doses. Nas ratas controles foram aplicadas duas doses de solução salina. Os dados obtidos mostraram, com relação à cronologia de erupção, que 88,5% dos filhotes do grupo controle apresentaram seus incisivos superiores erupcionados até o 10^o dia,

enquanto que somente 54,5% dos tratados apresentaram erupção destes dentes no mesmo período. Nos 45,5% remanescentes deste grupo, a erupção desses dentes foi observada até o 13^o dia. As medidas pós-eruptivas dos incisivos apresentaram valores semelhantes no 16^o, 20^o e 24^o dias em ambos os grupos, entretanto no 28^o dia de vida os incisivos superiores do grupo tratado apresentaram um crescimento pós-eruptivo menor do que aqueles do grupo controle.

Assim, os estudos demonstraram que tecidos e órgãos em desenvolvimento são suscetíveis aos efeitos do álcool etílico durante a gestação e que estes variam de acordo com a dose, tempo e período de exposição ao álcool.

2.2 Mecanismos de ação do álcool

O mecanismo teratogênico do álcool ainda não está bem definido. Atualmente acredita-se que a ação do álcool é provavelmente multifatorial, com a participação de diferentes fatores, específicos dos estágios do desenvolvimento e do tipo de tecido afetado. Segundo Henderson *et al.*²⁶ (1999) esses mecanismos podem ser diretos e indiretos.

2.2.1 Efeitos indiretos ou secundários: hipóxia fetal

A ingestão materna de álcool pode restringir o suprimento sanguíneo da placenta, com conseqüente redução no fluxo sanguíneo materno-fetal e diminuição de oxigênio para o feto. O álcool pode agir indiretamente sobre o feto, também por meio dos seus efeitos sobre a estrutura e função placentária, causando prejuízo no transporte de nutrientes essenciais para o feto, podendo causar problemas nutricionais. A literatura mostra que estes problemas têm influência nas alterações morfológicas observadas nos tecidos, podendo até exarcebar o potencial teratogênico do álcool, porém o fator mais importante é o

álcool por si só (Lieber³⁸, 1984b; Weinberg⁸² 1985; Guerrero *et al.*^{25,24}, 1996, 1998).

2.2.2 Efeitos diretos ou primários sobre o tecido fetal

A exposição ao álcool na ausência dos efeitos indiretos, produz vários efeitos tóxicos diretamente nos tecidos fetais. São eles:

Aumento na formação de radicais livres: a exposição materna ao álcool leva à produção de fragmentos moleculares altamente reativos, resultantes do metabolismo do álcool. Esses fragmentos, chamados de radicais livres, vão atuar sobre componentes das membranas celulares, membranas de organelas, causando danos celulares, por exemplo, no SNC e região crânio-facial em desenvolvimento. Os tecidos fetais e particularmente as células da crista neural expressam baixos níveis de antioxidantes, portanto são mais sensíveis aos radicais livres do que os tecidos adultos.

Alteração na expressão gênica: a exposição materna ao álcool retarda o desenvolvimento do cérebro e a formação dos ossos da região crânio-facial. Rifas *et al.*⁴⁹ (1997) sugerem, que um dos mecanismos desta ação do álcool é a inibição da expressão do gene *msx 2*, com conseqüente alteração na “cascata” de eventos necessários para o desenvolvimento crânio-facial normal. Para testar esta hipótese, foi analisada a quantidade total de mRNA do *msx 2*, nos osteoblastos originários da calvária dos fetos de ratos no 18^o dia pré-natal, expostos ao álcool. Os resultados demonstraram, uma redução de 50% na expressão do *msx 2* nos osteoblastos do grupo tratado, quando comparado ao grupo controle. Verificaram, também que embriões expostos ao álcool no 8^o dia pré-natal mostraram, após dois dias, ausência na expressão do *msx 2*, juntamente com 50% de redução no tamanho do embrião.

Deficiência em ácido retinóico: Foi verificado que a administração de álcool durante a gestação, particularmente no período inicial do desenvolvimento embrionário (7^o dia de gestação) reduz a quantidade de ácido retinóico. A sua

deficiência causa apoptose das células da crista neural e/ou alteração na expressão dos genes “homeobox”, em especial o *msx 2*, resultando em defeitos crânio faciais e dentais visto sua importância na coordenação do desenvolvimento craniofacial e dentário. Porém, segundo o autor mais pesquisas são necessárias para elucidar melhor o mecanismo de ação do álcool sobre a expressão dos genes “homeobox” (Tenth Report to the U.S Congress on Alcohol and Health, 2000).

Alteração na estrutura e função da membrana: a membrana celular plasmática e suas moléculas de superfície exercem um importante papel na proliferação, reconhecimento, migração e maturação celular. O álcool pode interromper um ou mais destes processos pela desestabilização da estrutura da membrana celular. Este efeito pode ocorrer devido à interposição das moléculas do álcool na camada bilipídica, causando um aumento na área da superfície da membrana, com conseqüente alteração na fluidez da mesma (Armant & Saunders², 1996). Isto pode ocasionar alteração nos canais iônicos e na conformação das proteínas da membrana, incluindo os fatores de crescimento e enzimas (Henderson *et al.*²⁶, 1999).

Alteração nos fatores de crescimento: os fatores de crescimento são considerados alvos da toxicidade do etanol. Os efeitos inibitórios da exposição pré natal ao álcool, sobre a proliferação das células da crista neural, resultam da interferência com os fatores de crescimento (bFGF, EGF, PDGF, IGF-I). O etanol não afeta a ação dos fatores de crescimento da mesma maneira. Alguns são mais afetados do que outros. A suscetibilidade celular ao etanol está relacionada com a sua resposta aos fatores de crescimento, ou seja, as células que são ativamente estimuladas ou inibidas por um determinado fator de crescimento são mais suscetíveis ao etanol (Luo & Miller⁴¹, 1998).

De acordo com Costa *et al.*¹⁵ (2001) a alteração no processo de sinalização celular, pelo álcool, está associada a danos funcionais transitórios ou permanentes e até mesmo à morte celular. Particularmente, quando a exposição ao etanol ocorre durante períodos críticos do desenvolvimento cerebral, o

rompimento na “cadeia” de eventos moleculares, que controlam o funcionamento celular, pode levar a longo prazo a danos celulares irreversíveis. Em um estudo de cérebros de fetos expostos ao álcool no útero, Singh *et al.*⁵⁹ (1996) demonstraram que a expressão gênica dos fatores de crescimento semelhante à insulina (IGFs) e a concentração do IGF-I (fator de crescimento semelhante à insulina-I) foram diminuídas em até 40% resultando em retardo do crescimento cerebral. Também foi demonstrado que a redução na expressão dos IGF-I e IGF-II, assim como, nos níveis plasmáticos destes fatores de crescimento estava associada ao menor desenvolvimento dos filhotes de ratas expostas ao álcool durante a gestação (Singh *et al.*⁶⁰, 1994).

Singhal *et al.*⁶¹ (1999) demonstraram, em um estudo *in vitro*, que o aumento na apoptose de macrófagos, após a exposição ao etanol, foi mediado pelo aumento na expressão do fator de crescimento transformante- β_1 (TGF- β_1) no citoplasma dos macrófagos. Em 2002, Othman *et al.*⁴⁴ verificaram a ação da ingestão materna de álcool sobre a expressão do receptor adenosina A (1), o qual regula a atividade de vários neurotransmissores, tais como, glutamato, dopamina e serotonina. As ratas foram expostas a 15 % de álcool, antes e durante a gestação e lactação. No 6º dia pós-natal os animais foram selecionados para a avaliação imunohistoquímica em três regiões do cérebro: córtex, cerebelo e hipocampo. Os resultados indicaram, que a ingestão de álcool diminuiu o peso corpóreo, o peso cerebral, a quantidade de mRNA do receptor adenosina A (1) e a densidade protéica no córtex e cerebelo.

Portanto, o álcool altera a habilidade das células de produzirem e responderem a fatores que regulam o crescimento e desenvolvimento do feto.

2.3 Fator de Crescimento Epidermal (EGF)

Segundo Benett & Schultz⁴ (1993) a família do EGF inclui: EGF, TGF- β , anfiregulina (AR) e EGF ligado à heparina (HBEGF). Estes peptídeos são similares na estrutura, se ligam à mesma célula receptora de membrana, mas têm efeitos biológicos diferentes. O EGF é sintetizado como uma grande molécula precursora, uma proteína transmembrana de 1217aa que é proteoliticamente clivada para liberar este GF, que é um pequeno fragmento de 53aa biologicamente ativo. EGF é dobrado sobre si em 3 voltas, ligados por pontes dissulfeto. Esta estrutura de tripla volta é exigida para a atividade biológica e distingue os membros da família EGF de outras famílias de GFs.

O modo pelo qual o EGF interage com as células alvo é se ligando ao seu receptor localizado na membrana celular. O receptor do EGF é uma glicoproteína transmembrana de 170KD e 1186 aa composta de 3 regiões: domínio extracelular (621aa), que tem o sítio de ligação do fator de crescimento; o domínio transmembrana (23 aa), que consiste de aa hidrofóbicos; e o domínio citoplasmático (542 aa), que contém uma proteína tirosinoquinase específica que é ativada pela ligação do EGF no domínio extracelular. Quando o EGF se liga ao sítio do domínio extracelular, induz à dimerização do receptor (alteração na conformação) e ativa a tirosinoquinase no domínio citoplasmático resultando na ligação de uma molécula de ATP e finalmente na autofosforilação do receptor (transferência de um grupo fosfato do ATP para as cadeias laterais selecionadas de tirosina no próprio receptor). Após a ligação do EGF ao seu receptor, o complexo EGF/EGFR é internalizado na célula, isto é, este complexo é transportado por uma rede de túbulos e vesículas chamadas endossomos. Em seguida o EGF e seu receptor são finalmente degradado nos lisossomos, o que desencadeia uma cascata de fosforilação de outras proteínas intracelulares resultando, assim em determinada resposta celular (Benett & Schultz⁴, 1993; Raymond *et al.*⁴⁸, 2000). O EGF, assim como outros fatores de crescimento

exercem seus efeitos biológicos, principalmente por mecanismos parácrino (age sobre células adjacentes) e autócrino (age sobre a célula produtora) (Thesleff⁶⁸, 1987).

Em 1987 Partanen & Thesleff⁴⁵ estudaram a localização do ¹²⁵I-EGF no germe dentário do molar de camundongos, em diferentes estágios do desenvolvimento e também, durante o desenvolvimento embrionário de outros órgãos, tais como rim, pulmão, pele e glândula submandibular, os quais são formados por componentes epiteliais e mesenquimais. Em todos os tecidos examinados ocorreu alta intensidade de marcação nos estágios de maior atividade proliferativa de cada órgão. Por outro lado, a distribuição dos sítios de ligação do EGF foi alterada dramaticamente durante o desenvolvimento. Isso sugere, que o EGF atua na organogênese desses órgãos como estimuladores da proliferação epitelial durante os estágios iniciais e, também na progressão da morfogênese. Os autores concluíram, que a distribuição dos receptores nos diferentes tecidos e a resposta ao EGF estão sob controle local, sendo específicas do estágio do desenvolvimento de cada órgão, não estando relacionada à idade do embrião.

Shum *et al.*⁵⁷ (1993) verificaram que o mRNA do EGF, o EGF e o EGFR eram expressos no 1º arco branquial de camundongos e nos seus derivados, dentre os quais, pré-cartilagem, cartilagem de Meckel e osso, células epiteliais e ectomesenquimais do germe dentário na fase de botão. A localização das proteínas EGF e EGFR nas mesmas células sugere controles autócrino e parácrino do EGF sobre as células, regulando assim o tamanho e forma da cartilagem de Meckel, osso e do germe dentário durante o desenvolvimento crânio-facial.

Em 1995 Davideau *et al.*¹⁶ investigaram, em molares de ratos, o envolvimento do EGF na formação dos tecidos mineralizados por meio de hibridização *in situ* e imunohistoquímica. O EGFR foi detectado no diafragma epitelial, bainha epitelial de Hertwig e células formadoras do osso alveolar com forte intensidade de marcação, sugerindo a participação do EGF na proliferação e diferenciação celular dos tecidos mineralizados do dente.

Adicionalmente outras células expressam o EGF. Araújo *et al.*¹ (2003) avaliaram a expressão do EGF e seu receptor nas células epiteliais da gengiva normal e de pacientes com fibromatose gengival hereditária. O estudo revelou o mesmo padrão de distribuição para o EGF e EGFR. Estes foram localizados nas camadas basal, com maior intensidade de marcação, diminuindo progressivamente nas camadas espinhosa e granulosa. Esses dados indicaram que a síntese do EGF ocorre nas células basais do epitélio oral. Os EGF e EGFR, também foram encontrados, com forte intensidade de marcação, na região basal das papilas epiteliais hiperplásicas dos pacientes com fibromatose gengival hereditária, sugerindo o envolvimento do EGF na proliferação celular. Outro estudo, também mostrou forte expressão do EGF no epitélio oral próximo ao dente em desenvolvimento e na epiderme de camundongos (Gresik *et al.*²⁰, 1998).

Vários estudos relataram os efeitos do EGF sobre a formação do esmalte e localizaram o EGFR nas células do órgão dentário em vários estágios da amelogênese.

Snead *et al.*⁶² (1989) utilizaram técnicas de hibridização *in situ* e imunohistoquímica para localizar quais grupos de células produzem o EGF precursor, durante o desenvolvimento de órgãos dependentes de interações epitélio-mesênquima, tais como o órgão dentário de camundongos. A análise realizada detectou a presença de EGF precursor mRNA no epitélio dentário interno, estrato intermédio, retículo estrelado e nas células ectomesenquimais da papila dentária do germe dentário de molares no 17^o dia pré-natal. O EGF precursor mRNA, também mostrou-se presente na cartilagem de Meckel e na periferia dos centros osteogênicos da mandíbula. Além do EGF precursor mRNA, estas últimas estruturas mostraram a presença de receptores para o EGF. Sendo assim, durante o desenvolvimento mandibular os locais da produção de EGF coincidiram com células ricas em EGFR, sugerindo que estas regiões contribuem para o desenvolvimento mandibular.

Cam *et al.*⁵ (1990) descreveram o padrão de distribuição do EGFR, utilizando a técnica de imunofluorescência com anticorpo policlonal, durante os

eventos que levam à amelogenese do 1º molar inferior de camundongos. Durante a histomorfogenese (13º a 17º dias pré-natal) o EGFR estava localizado nos epitélios dentários, primeiramente no epitélio dentário interno e mais tardiamente no epitélio dentário externo. Após este período a expressão do EGFR nestas estruturas diminuía, enquanto que no retículo estrelado se mantinha com alta intensidade até o 20º dia pré-natal. Adicionalmente, no 0 dia pós-natal foi encontrada alta intensidade de marcação para o EGFR nas células do mesênquima apical. Esses resultados sugeriram que o EGF participa na cito e histodiferenciação durante o início da odontogênese e que macromoléculas da matriz extracelular podem estar envolvidas nesse processo.

Cobo *et al.*¹² (1992) estudaram por meio da imunohistoquímica, embriões de ratos com idade entre 16º e 21º dias pré-natal e acharam um padrão similar na distribuição do EGF e seu receptor. Observaram fraca marcação nas células do germe dentário em fase de botão, capuz e campânula. Durante a formação dos tecidos dentários (20º e 21º dias pré-natal) foi encontrada uma moderada marcação nos odontoblastos, ameloblastos e epitélio dentário interno, porém forte na dentina. Adicionalmente, a presença de ambos, EGF e seu receptor foi observada nas células do tecido ósseo que circunda o germe dentário. Esses resultados sugeriram que o EGF tem uma moderada participação durante os períodos iniciais da diferenciação do dente, e provavelmente está mais envolvido com a produção da dentina. Além disso, o EGF e seu receptor participam da diferenciação e maturação de outros tecidos, tais como, o SNC e o osso.

Shore *et al.*⁵⁶ (1992) verificaram, que o EGFR estava presente no órgão do esmalte e papila dentária na região odontogênica de incisivos de ratos jovens. As células da papila dentária, pré-ameloblastos e pré-odontoblastos apresentaram fraca marcação para o EGFR, enquanto que durante o estágio secretório os ameloblastos mostraram forte intensidade de marcação sugerindo, que estas células utilizam o EGF durante a secreção da matriz do esmalte.

Tanikawa & Bawden⁶⁶ (1999) estudaram a localização e possíveis efeitos biológicos do EGF em células do órgão dentário durante os eventos que levam diretamente à formação do esmalte, em molares de ratos no 5º dia pós-natal. Por meio da imunohistoquímica, localizaram sítios de ligação para o EGF nos ameloblastos pré-secretórios, nas regiões distal e proximal dos ameloblastos secretórios, nos odontoblastos e no estrato intermédio, entretanto no retículo estrelado foi notado ausência de marcação. Os resultados sugeriram que o EGF exerce papel importante na diferenciação e secreção dos ameloblastos.

Martineau-Doizé *et al.*⁴² (1991) estudaram a localização do ¹²⁵I-EGF no órgão dentário de incisivos de ratos, durante a amelogênese. Na zona pré-secretória foram observados sítios de ligação do ¹²⁵I-EGF nas células do epitélio dentário externo e na zona secretória, a expressão ocorreu nas células da camada papilar e estrato intermédio. Em ambas as zonas, pré-secretória e secretória, foi encontrada fraca, porém específica marcação sobre os ameloblastos. Na zona de maturação foi encontrada uma alta intensidade do EGF marcado nas células da camada papilar e nos ameloblastos de superfície estriada. Os ameloblastos de superfície lisa mostraram poucos receptores para o EGF. A análise radioautográfica em microscopia eletrônica das células da camada papilar e dos ameloblastos de superfície estriada, demonstrou após 2min da injeção do ¹²⁵I-EGF, marcação na membrana plasmática; após 15min a marcação estava sobre os endossomos e após 30min, sobre os lisossomos. Os ameloblastos modulam sua morfologia de superfície estriada para superfície lisa e vice-versa, em aproximadamente 2h indicando, que a modulação dos ameloblastos é mais rápida do que a meia vida dos receptores ($T_{1/2} \approx 10h$). Isto sugere a internalização dos receptores nos ameloblastos de superfície lisa e exteriorização daqueles nos ameloblastos de superfície estriada demonstrando, que os receptores reciclam durante a modulação entre os dois grupos de ameloblastos. Entretanto são necessários estudos adicionais, para avaliar as relações moleculares funcionais entre o EGF, modulação dos ameloblastos e a mineralização do esmalte.

Wise *et al.*⁸⁶ (1992) mostraram por intermédio de estudo imunohistoquímico em molares de ratos de 0 a 10 dias pós-natal, que o EGF e o EGFR apresentaram um padrão de distribuição similar nas células do órgão do esmalte e do folículo dentário, porém diferenças específicas existem. O EGF está presente no folículo dentário e ameloblastos intensamente até o 4^o dia, seguido de uma diminuição no 9^o e 10^o dias. Os odontoblastos e a polpa dentária tiveram suas marcações semelhantes, ou seja, média intensidade durante todo o período estudado. Já o retículo estrelado foi de intensidade fraca, também por todo o experimento. A imunomarcação do EGF nos ameloblastos foi mais intensa do que para o EGFR. Portanto a localização do EGF nas células do órgão do esmalte e do folículo dentário durante o período crítico da erupção dentária sugere que o EGF exerce um papel importante nos eventos iniciais da erupção dentária, por meio de efeito autócrino e/ou parácrino sobre o folículo dentário estando, assim envolvido na regulação do desenvolvimento dos dentes.

2.4 Efeitos do álcool sobre o EGF

Estudos *in vivo* e *in vitro* realizados no fígado demonstraram o efeito tóxico do álcool sobre o EGF e seu receptor (Henderson *et al.*²⁷,1989; Zang & Farrell⁸⁷,1999). Foi observado um bloqueio na proliferação celular dos hepatócitos dos fetos de ratas, no 19^o dia pré-natal, expostos ao álcool, assim como um aumento na expressão do EGF e de seu receptor, o que foi resultante da redução na autofosforilação do EGFR e diminuição na eficiência da internalização do complexo EGF/EGFR. Sendo assim, a interferência do álcool no processo de endocitose, bloqueou o efeito do EGF sobre a proliferação dos hepatócitos. Ainda estudando as células do fígado de ratos, Saso *et al.*⁵⁴ (1997) demonstraram que a ingestão de álcool reduziu a autofosforilação do receptor e a fosforilação da PLC γ 1. Assim também, foi reduzida a ligação do Grb2 ao EGFR. Entretanto, a fosforilação do Shc e a associação do Grb2 com o Shc não foram

significativamente alteradas. Isso evidencia uma inibição diferencial do álcool sobre as proteínas sinalizadoras intracelulares. Aquelas que têm maior afinidade pelo EGFR, como por exemplo, a PLC γ 1 e Grb2 foram mais afetadas pelo álcool. A alteração no processo de sinalização intracelular pode contribuir para a regeneração deficiente no fígado dos indivíduos expostos ao alcoolismo crônico.

Em 1994 Wimalasena *et al.*⁸⁴ estudaram, *in vitro*, os efeitos do álcool sobre a ação do EGF durante a secreção hormonal nas células placentárias. Verificaram, que o álcool altera os efeitos do EGF sobre a função da placenta e, que esta alteração é dependente do tempo de exposição e da concentração do álcool.

Wang *et al.*⁷⁶ (1992) investigaram, *in vitro*, o mecanismo deletério do álcool sobre o EGF na mucosa bucal de ratos. Verificaram que a diminuição na expressão do EGFR foi devida à redução na quantidade de receptores ativos. É possível que o álcool tenha alterado a estrutura e fluidez da membrana celular, levando à redução na viabilidade dos receptores. Segundo Wang *et al.*⁷⁷ (1991), esses resultados interferiram com o processo de renovação epitelial da mucosa bucal dos ratos.

2.5 Efeitos do álcool sobre o EGF no germe dentário

Guerrero *et al.*²⁵ (1996) estudaram os efeitos da ingestão materna de álcool sobre a expressão do EGF durante a odontogênese de camundongos com 1,5^o dia de vida que receberam, via oral, 20% de álcool antes e durante a gestação. No grupo tratado o álcool foi administrado à água dos animais em concentrações crescentes de 1%, 5%, 10%, 15% e 20%, enquanto que os animais controles receberam água *ad libitum*. Descreveram, que a imunoexpressão do EGF na cúspide média do 1^o molar inferior era forte e homogênea no grupo controle, porém fraca e heterogênea no tratado. Também verificaram, que os germes dentais dos animais tratados eram morfometricamente menores. Os autores concluíram que a ingestão materna de álcool reduz a expressão do EGF no folículo dentário, o que sugere que a diminuição no tamanho do germe dentário dos animais tratados pode ter sido devida à inibição do EGF pelo álcool.

3. PROPOSIÇÃO

Este estudo pretendeu, usando o dente molar de rato como modelo, por ter o mesmo padrão de crescimento do dente humano, avaliar a imunoexpressão do EGF durante a amelogênese e dentinogênese em filhotes de ratas que ingeriram álcool em concentrações teratogênicas antes e durante a gestação, empregando para isso, o método indireto com sistema de amplificação (peroxidase, biotina e estreptavidina), bem como avaliar alguns parâmetros do desenvolvimento das ratas e dos filhotes aos 0^o, 4^o e 9^o dias pós-natal.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1- ANIMAIS

Para este estudo foram utilizadas 28 ratas albinas Wistar, adultas jovens, pesando aproximadamente 185g (9 semanas). Após uma semana de adaptação ao local do experimento, as ratas foram aleatoriamente distribuídas em dois grupos experimentais: controle (n=10) e tratado (n=18). Todos os animais foram mantidos em gaiolas individuais, em ambiente com ciclo circadiano controlado (12h luz e 12h escuro). Ambos os grupos receberam dieta sólida (Nuvilab CR1) *ad libitum*.

Ao grupo tratado foi administrado etanol (Merck) adicionado à água em concentrações crescentes de 1%, 5%, 10%, 15%, 20% e 25%, alteradas semanalmente. O aumento gradual na concentração de etanol permitiu que as ratas se acostumassem à bebida, evitando assim a abstinência ou perda de interesse pela solução administrada. Sendo que 1g de etanol é equivalente a 7,1cal/g (1ml de álcool absoluto contém 0,798g de etanol e fornece 5,67 calorias), as calorias fornecidas por 1ml das diferentes soluções foram: 1% (0,056 cal/g); 5% (0,28 cal/g); 10% (0,56 cal/g); 15% (0,84 cal/g); 20% (1,12 cal/g); 25% (1,4 cal/g). O grupo controle recebeu somente água.

Após o período de pré-gestação as ratas em atividade de estro foram colocadas junto com machos da mesma idade e espécie, não alcoólatras, na proporção de duas fêmeas para um macho, durante o período noturno (overnight). Durante o acasalamento, todos os animais receberam água. A constatação da gravidez foi obtida por meio da observação do tampão vaginal e presença de esperma no esfregaço vaginal na manhã seguinte ao acasalamento. Este dia foi definido como dia zero de gestação.

Em seguida, as ratas prenhas, controles (n=6) e tratadas (n=10) foram colocadas de volta às suas gaiolas e mantidas com suas respectivas dietas. As ratas do grupo tratado continuaram a receber 25% de solução alcoólica e as do grupo controle, água *ad libitum*. Ambos os grupos continuaram recebendo a mesma dieta sólida *ad libitum* (Nuvilab CR 1). Tanto no grupo controle, quanto no grupo tratado, a ingestão de líquido e comida foi registrada separadamente. Esta informação foi essencial para calcular a ingestão diária de calorias totais nos diferentes grupos de estudo, já o peso foi registrado semanalmente. Os cálculos foram realizados a partir da energia média metabolizável da ração (para os dois grupos) e da mistura etanol + água (para o grupo tratado). A ração Nuvilab CR1 tem energia média metabolizável de 2,80kcal/g. A solução alcoólica a 25% tem energia metabolizável de 1,4kcal/g. O peso dos animais foi registrado semanalmente.

Das 10 ratas tratadas, durante a gestação, somente 7 chegaram a termo, enquanto que no grupo controle todas as 6 ratas concluíram a prenhez. Por ocasião do nascimento foi obtido o número total de filhotes por ninhada. A fim de dispor de prole homogênea em desenvolvimento, foi mantido oito filhotes em cada ninhada. Como parâmetros do desenvolvimento embrionário e pós-natal, foram obtidos o peso e comprimento crânio-caudal, ao 0^o, 4^o e 9^o dia pós-natal.

4.2 – PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Nos dias 0, 4^o e 9^o pós-natal, dois filhotes de cada ninhada foram anestesiados com éter etílico e sacrificados por deslocamento cervical; suas mandíbulas removidas, cuidadosamente dissecadas e separadas em hemimandíbulas esquerda e direita para facilitar a orientação no momento da inclusão. As hemi-mandíbulas foram imersas em uma solução fixadora de Karnovsky, com concentração modificada do glutaraldeído para 0,5%, pois a concentração preconizada por Karnovsky³² (1965) pode interferir na reação imunohistoquímica. O tempo da fixação foi em média 12h.

Em seguida, as hemi-mandíbulas foram lavadas com tampão PBS (3x por 10min), desidratadas e incluídas em paraplast. As hemi-mandíbulas dos filhotes de 4 e 9 dias pós-natal foram descalcificadas com EDTA 4,13% (Warshawsky & Moore⁷⁹, 1967) sob agitação constante à temperatura ambiente, com trocas diárias do líquido, durante 7 e 16 dias, respectivamente. O grau de descalcificação foi testado na região de incisivo, por meio de cortes realizados com uma lâmina de barbear nova. Consideramos que a desmineralização estava completa quando a região não oferecia resistência ao corte. Ao término da descalcificação as peças foram lavadas em tampão PBS (3x por 10min) e reduzidas por dois cortes transversais, em relação ao longo eixo da hemi-mandíbula. O primeiro corte passou distalmente ao 1º molar e o segundo, mesialmente ao 1º molar, de modo que permaneceu somente o germe dentário do 1º molar (Figura 1). Em seguida, foram realizadas a desidratação e inclusão das peças em paraplast. As mesmas foram incluídas, de modo que o germe dentário fosse cortado no sentido mesio-distal.

4.3- PREPARO DAS LÂMINAS

1. As lâminas (Knitel Glasser, fosca) foram mergulhadas em água contendo detergente por 1h, em seguida lavadas exaustivamente com água corrente e secas na estufa a 60°C;

2. Depois de secas foram mergulhadas numa solução de HCl (Merck) 1N durante 20min; lavadas rapidamente com água corrente, água destilada (3 trocas) e novamente secas na estufa.

3. Após a secagem, ficaram imersas numa solução 3:1 de álcool absoluto e ácido acético (Merck) por 20min e levadas à estufa para secar.

4.3.1 Solução de organossilano

Esta solução serviu como cola para aderir os cortes nas lâminas impedindo que saíssem durante a reação imunohistoquímica e sem provocar reações de fundo. A preparação constou de:

1. Quatro mergulhos rápidos uma a uma em uma solução a 2% de Organossilano em acetona (3 Aminopropyltriethoxy-silano-Sigma Chemical CO. St.Louis, USA).
2. Dois mergulhos rápidos em Acetona pura (Merck).
3. Água destilada, 2 mergulhos rápidos.
4. Secagem em estufa à 60°C.

4.4- MICROTOMIA

As hemi-mandíbulas incluídas em paraplast, foram seccionadas num micrótomo automático (RM 2155 – Leica) para obtenção de cortes com 4µm de espessura que foram coletados em lâminas previamente preparadas com organossilano.

4.5- IMUNOHISTOQUÍMICA

Para a imunohistoquímica utilizamos o método indireto com sistema de amplificação (Peroxidase, Biotina e Estreptavidina), que é extremamente sensível, podendo ser utilizadas concentrações muito baixas do anticorpo primário. Previamente os cortes foram desparafinizados com xilol 30min à 37°C e 20min à temperatura ambiente, hidratados com álcool absoluto, 90%, 70%, 50% e água destilada, 2min cada, mergulhados em H₂O₂ a 3% - 10v (Peróxido de Hidrogênio), 5 trocas de 5min cada para inativar a peroxidase endógena do tecido. Os cortes foram lavados em água corrente por 2min, mergulhados numa solução de tripsina

e cloreto de cálcio à 37°C para que se processasse a digestão enzimática do tecido, digestão esta que expõem os sítios de ligação que podem ficar “mascarados” durante a fixação e inclusão das peças e nos quais o anticorpo primário se ligará e em seguida lavadas em água por 2min. Posteriormente os cortes foram incubados com anticorpo primário policlonal (anti-EGF desenvolvido em coelho) (Sigma Chemical CO. St.Louis, USA), 1:2000 em PBS/BSA1% “overnigth”.

Após este período, as lâminas foram lavadas com PBS (pH 7,4) 3 trocas de 5min. Como anticorpo secundário foi utilizado o Kit LSAB + Kit peroxidase, Large Volume, Universal mouse/ rabbit/ goat (Dako Corporation). Primeiramente foi empregado o anticorpo biotinado por 30min à 37°C, em seguida as lâminas foram lavadas com PBS, 3 trocas de 5min, e incubadas com anticorpo conjugado com estreptavidina e peroxidase por 30min à 37°C. Novamente as lâminas foram lavadas com PBS 3 trocas de 5min, em seguida reveladas com uma solução de DAB (3,3' Diaminobenzidina – Sigma) com peróxido de hidrogênio e DMSO por 2min à 37°C. A coloração de fundo foi feita com Hematoxilina de Mayer, e as lâminas montadas com bálsamo do Canadá. Como controle positivo da reação imunohistoquímica foram utilizados o epitélio oral do mesmo corte em que está o germe dentário, pela certeza de EGF naquele tecido. O controle negativo foi realizado em algumas lâminas, pela substituição do anticorpo primário pelo tampão PBS.

A avaliação dos cortes foi feita ao microscópio de luz (Zeiss-Axioplan 2) observando-se as diferentes intensidades de marcação (coloração) das estruturas do germe dentário, nos grupos, controle e tratado. Inicialmente foram avaliados 5 cortes, a fim de calibrar as intensidades de marcação e em seguida, dois examinadores observaram as lâminas, separadamente, avaliando cada item, em diferentes aumentos (20 e 40x), adotando o critério utilizado por Wise *et al*⁸⁶ (1992): 0 = Ausência de marcação; 1 = marcação fraca; 2 = marcação moderada; 3 = marcação forte.

Essa técnica de imunohistoquímica permitiu em um único preparado observar a marcação e morfologia com o emprego de microscopia de luz convencional. Estas lâminas poderão ser arquivadas para estudos retrospectivos, pois o produto da reação antígeno-anticorpo é bastante estável podendo ser mantido permanentemente nos preparados.

4.6- ANÁLISE ESTATÍSTICA

O estudo da comparação entre grupos segundo as variáveis: 1) ganho de peso (g); 2) consumo sólido diário (g); 3) consumo líquido diário (ml) das ratas durante a pré-gestação e gestação; 4) peso (g) e 5) comprimento crânio-caudal dos filhotes aos dias 0, 4^o e 9^o pós-natal, foi realizado pela Estatística Paramétrica (Teste t para observações independentes), com $p \leq 0,05$ indicando o nível mínimo de significância; 6) para a análise da efetividade da gestação, foi utilizado o Teste Exato de Fisher; 7) para intensidade de marcação (coloração) de cada estrutura nos períodos de 0, 4^o e 9^o dias de vida, foi realizado pela Estatística Não Paramétrica, Teste de Mann Withney, o qual utiliza a mediana, como medida central da amostra.

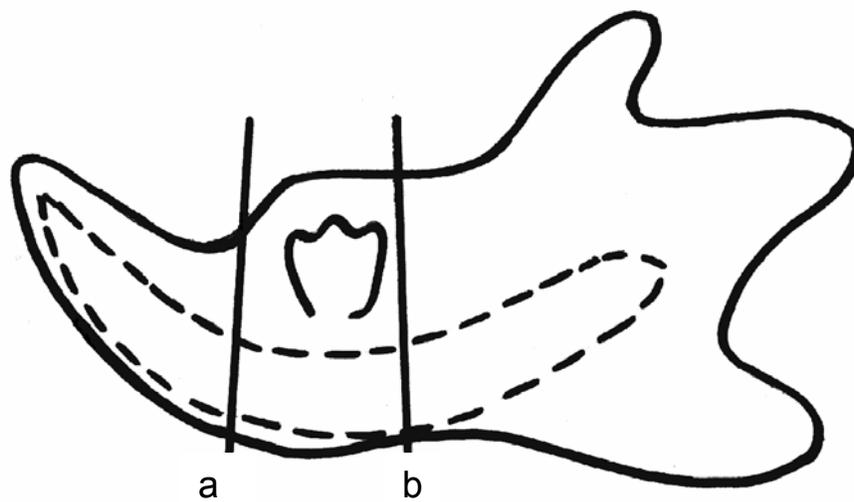


Figura 1 – Desenho esquemático da hemimandíbula com germe dentário do 1^o molar de ratos no 4^o dia de vida mostrando a direção e localização dos cortes (a e b).

5. RESULTADOS

5.1 DESENVOLVIMENTO DAS RATAS NO PERÍODO DE TRATAMENTO

Os resultados obtidos referentes ao desenvolvimento das ratas no período de tratamento com álcool antes e durante a gestação estão relacionados nas Tabelas 1 a 6 e Figura 2.

A Tabela 1 mostra os dados do consumo de ração e líquido, nos grupos controle e tratado. Observamos que a ingestão de comida foi similar nas 4 primeiras semanas do período de pré-gestação. Entretanto, nas 5^a e 6^a semanas desse período ocorreu diferença significativa entre os grupos controle e tratado. Assim, as ratas tratadas consumiram menor quantidade de ração, quando comparadas às ratas controles. Com relação ao consumo de líquido, este foi ingerido em menor quantidade pelas ratas tratadas com álcool, porém, sem mostrar diferença significativa, quando comparado ao grupo controle, exceto na 1^a semana, onde o consumo da solução alcoólica a 1% foi até mesmo maior, do que no grupo controle.

Durante a gestação, tanto o consumo de ração, quanto o de líquido aumentaram nos grupos controle e tratado, sendo este aumento significativamente maior no grupo controle (Tabela 2). Na última semana de gestação as ratas do grupo controle ingeriram 29,7% mais líquido e 23% mais ração do que as ratas do grupo tratado com álcool. O consumo de ração foi responsável, no grupo controle, por 100% do conteúdo calórico ingerido, visto que a água não contribui com calorias. Entretanto, no grupo tratado o consumo de ração contribuiu com 48,25%, sendo os outros 51,75% correspondentes às calorias vindas do álcool (Tabela 4).

A Figura 2 mostra as médias do peso corpóreo das ratas dos grupos controle e tratado, antes e durante a gestação e, também no período de lactação. Pode-se observar que houve progressão no peso das ratas, nos dois grupos, ou seja, não ocorreu perda de peso ao longo das semanas, nos períodos estudados. Ao compararmos os grupos controle e tratado observamos, que o peso das ratas tratadas com álcool foi menor nas 5^a e 6^a semanas do período de pré-gestação, porém sem mostrar diferença estatisticamente significativa. Entretanto, durante o período de gestação o peso corpóreo das ratas tratadas foi significativamente menor.

No período de lactação o peso das ratas mostrou uma diminuição na 1^a semana aumentando logo em seguida, em ambos os grupos. As ratas tratadas continuaram apresentando peso menor que as ratas controles sem, no entanto mostrar diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

A Tabela 5 mostra o ganho de peso (peso final – peso inicial) das ratas dos dois grupos nos períodos de pré-gestação e gestação. Verificamos que o ganho de peso das ratas apresentou diferença significativa entre os grupos controle e tratado, apenas durante o período de gestação.

A Tabela 6 mostra os resultados referentes à efetividade de gestação, nos dois grupos. No grupo controle, todas as 6 ratas que ficaram prenhas tiveram a prenhez concluída (100%). Já no grupo tratado, das 10 ratas prenhas apenas 7 chegaram a termo (70%). Entretanto, o teste Exato de Fisher mostrou que as diferenças entre os grupos não foram estatisticamente significantes. O tempo de gestação das ratas tratadas (22,50 dias) foi similar ao das ratas controles (22 dias). Com relação ao tamanho da ninhada as ratas tratadas com álcool deram cria a um número menor de filhotes, quando comparado às ratas controles ($4,20 \pm 3,85$ vs $9,83 \pm 3,31$), sendo esta diferença estatisticamente significativa.

Tabela 1

Média e desvio padrão da ingestão diária de ração (g) e líquido (ml) de ratas adultas jovens dos grupos controle e tratado em cada semana do período de pré-gestação.

Semana	Controle (n=10)		Tratado (n=18)	
	Ração (g/dia)	Água (ml/dia)	Ração (g/dia)	Álcool (ml/dia)
1 ^a - 1%	16,87±1,51	36,35±3,69	17,79±1,65	38±6,63
2 ^a - 5%	15,36±1,49	45,78±9,72	16,36±1,15	41,52±7,76
3 ^a - 10%	15,98±1,80	37,03±8,17	15,53±1,26	30,97±4,53
4 ^a - 15%	13,13±1,35	33,75±4,82	13,10±0,92	25,45±7,65*
5 ^a - 20%	13,86±1,49	29,05±4,38	11,67±0,91*	25,95±6,56
6 ^a - 25%	13,55±1,48	28,38±3,77	10,12±1,52*	27,95±7,24

* Significante $p \leq 0,05$

Tabela 2

Média e desvio padrão da ingestão diária de ração (g) e líquido (ml) de ratas adultas jovens dos grupos controle e tratado em cada semana do período de gestação.

Semana	Controle (n=6)		Tratado (n=10)	
	Ração (g/dia)	Água (ml/dia)	Ração (g/dia)	Álcool (ml/dia)
1 ^a - 25%	16,71±4,27	30,05±1,04	12,02±1,91*	24,74±2,89*
2 ^a - 25%	17,71±2,64	34,60±2,27	13,04±1,02*	28,43±4,67*
3 ^a - 25%	18,57±2,07	44,0±1,93	13,85±0,71*	30,89±4,41*

*Significante $p \leq 0,05$

Tabela 3

Média e desvio padrão da ingestão calórica diária de ração (kcal/dia), solução (kcal/dia) e calorias totais de ratas adultas jovens dos grupos controle e tratado em cada semana do período de pré-gestação.

Semana	Controle (n=10)		Tratado (n=18)		
	Ração Kcal/dia	Kcal/dia total	Ração Kcal/dia	Álcool Kcal/dia	Kcal/dia total
1 ^a - 1%	47,23±4,24 (100)	47,23±4,24 (100)	49,82±4,61 (95,88)	2,13±0,37 (4,12)	51,95±4,65* (100)
2 ^a - 5%	43,01±4,18 (100)	43,01±4,18 (100)	45,82±3,23 (79,77)	11,63±2,1 (20,23)	57,44±3,36* (100)
3 ^a - 10%	44,77±5,05 (100)	44,77±5,05 (100)	43,49±3,52 (71,52)	17,34±2,54 (29,92)	60,8±4,74* (100)
4 ^a - 15%	36,76±3,78 (100)	36,76±3,78 (100)	36,67±2,58 (63,70)	21,38±6,42 (36,30)	58,05±7,25* (100)
5 ^a - 20%	38,79±4,17 (100)	38,79±4,17 (100)	32,69±2,54* (53,46)	29,07±7,34 (46,54)	61,75±7,21* (100)
6 ^a - 25%	37,94±3,92 (100)	37,94±3,92 (100)	28,35±4,27* (42,49)	39,13±10,14 (57,51)	67,48±12,62* (100)

() proporções, em porcentagens, das calorias diárias

* Significante $p \leq 0,05$

Tabela 4

Média e desvio padrão da ingestão calórica diária de ração (kcal/dia), solução (kcal/dia) e calorias totais de ratas adultas jovens dos grupos controle e tratado em cada semana do período de gestação.

Semana	Controle (n=6)		Tratado (n=10)		
	Ração Kcal/dia	Kcal/dia total	Ração Kcal/dia	Álcool Kcal/dia	Kcal/dia total
1 ^a - 25%	46,80±11,96 (100)	46,80±11,96 (100)	33,67±5,35* (49,17)	34,64±4,05 (50,83)	68,31±7,12* (100)
2 ^a - 25%	49,59±7,39 (100)	49,59±7,39 (100)	36,51±2,86 (48,09)	39,80±6,5 (51,91)	76,31±6,08* (100)
3 ^a - 25%	52±5,80 (100)	52±5,80 (100)	38,79±1,99* (47,50)	43,24±6,18 (52,50)	82,03±6,0* (100)

() proporções, em porcentagens, das calorias diárias

* Significante $p \leq 0,05$

Tabela 5

Média do ganho de peso corpóreo (g) de ratas adultas jovens dos grupos controle e tratado nos períodos de tratamento.

	Controle	Tratado	Redução
Pré-gestação	40,22	33,24	17,35%
Gestação	85,2	47,09*	44,73%

* Significante $p \leq 0,05$

Tabela 6

Resultados do período de gestação em porcentagens, nos grupos controle e tratado

	Controle (n=6)	Tratado (n=10)	p
N° total de ratas	10	18	
Ratas prenhas	6 (60%)	10 (55,55%)	1,0000*
Prenhez concluída	6 (100%)	7 (70%)	0,2500**

* ** Teste Exato de Fisher

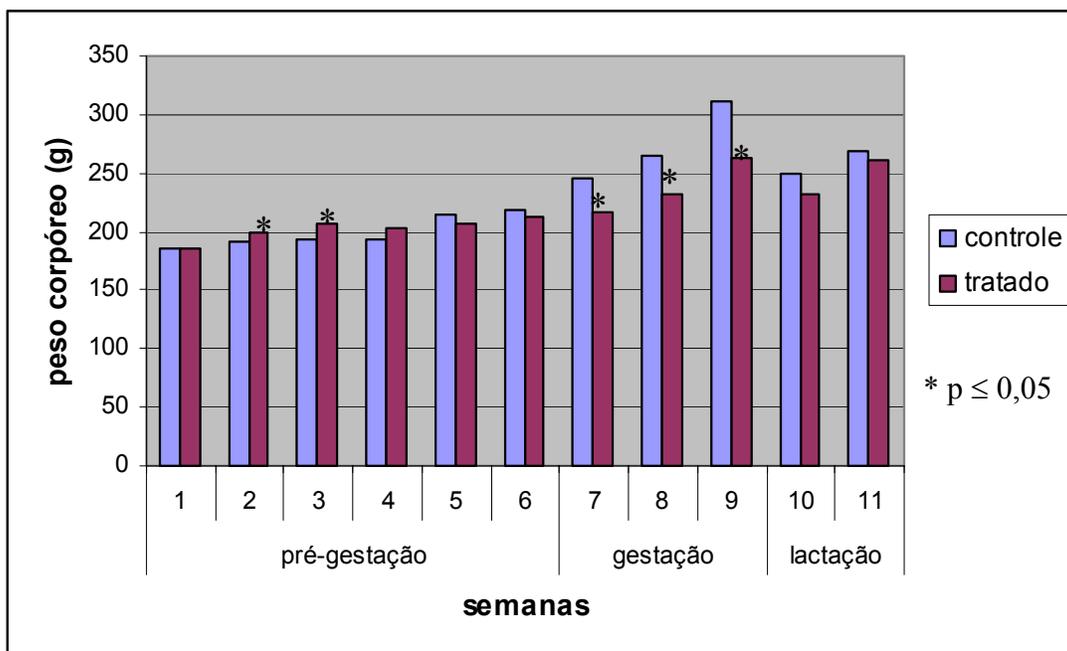


Figura 2 - Médias do peso corpóreo (g) de ratas adultas jovens dos grupos controle e tratado em cada semana do período de tratamento.

5.2 DESENVOLVIMENTO DOS FILHOTES

A Tabela 7 e Figura 3, mostram os resultados obtidos do comprimento crânio-caudal dos filhotes de ratas aos 0, 4^o e 9^o dia pós-natal. A Tabela 8 e Figura 4, demonstram os resultados obtidos do peso corpóreo nas mesmas condições anteriores.

A Tabela 7 mostra que, com exceção do nascimento, as médias do comprimento crânio-caudal foram menores nos filhotes do grupo tratado nos 4^o e 9^o dias pós-natal. O peso corpóreo dos filhotes deste grupo mostrou diferença significativa desde o nascimento até o 9^o dia pós-natal, quando comparado ao grupo controle (Tabela 8). Nas Figuras 3 e 4 observa-se que o peso dos filhotes do grupo tratado apresentou uma redução maior do que o comprimento crânio-caudal, durante todo o período pós-natal.

Tabela 7

Médias e desvio padrão do comprimento crânio-caudal (mm) de filhotes de ratas dos grupos controle e tratado.

	Comprimento crânio-caudal		Redução
	Controle	Tratado	
0 dia pós-natal	6,86±0,50 (48)	6,34±0,35 (48)	7,5%
4 ^o dia pós-natal	9,19±0,18 (39)	8,55±0,38* (29)	6,9%
9 ^o dia pós-natal	11,98±0,38 (24)	10,31±1,12* (18)	13,9%

()=Número de filhotes

* Significante $p \leq 0,05$

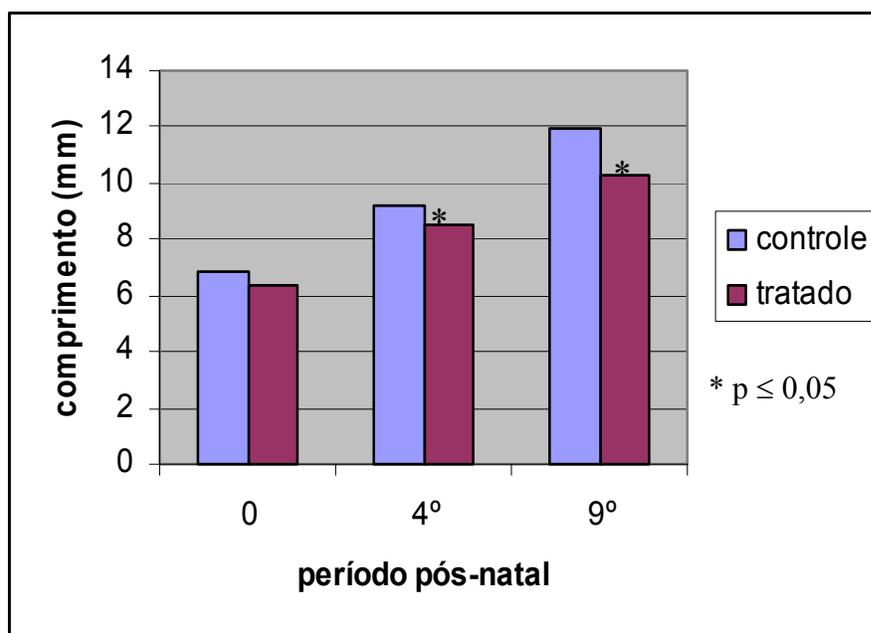


Figura 2: Médias do comprimento crânio-caudal (mm) de filhotes de ratas dos grupos controle e tratado, nos 0, 4^o e 9^o dias pós-natal.

Tabela 8

Médias e desvio padrão do peso corpóreo (g) de filhotes de ratas dos grupos controle e tratado.

	Peso corpóreo		Redução
	Controle	Tratado	
0 dia pós-natal	6,62±0,63 (48)	5,65±0,45*	14,6%
4º dia pós-natal	12,25±1,33 (39)	8,61±1,10*	29,7%
9º dia pós-natal	22,39±1,55 (24)	13,27±3,87*	40,7%

()=Número de filhotes

* Significante $p \leq 0,05$

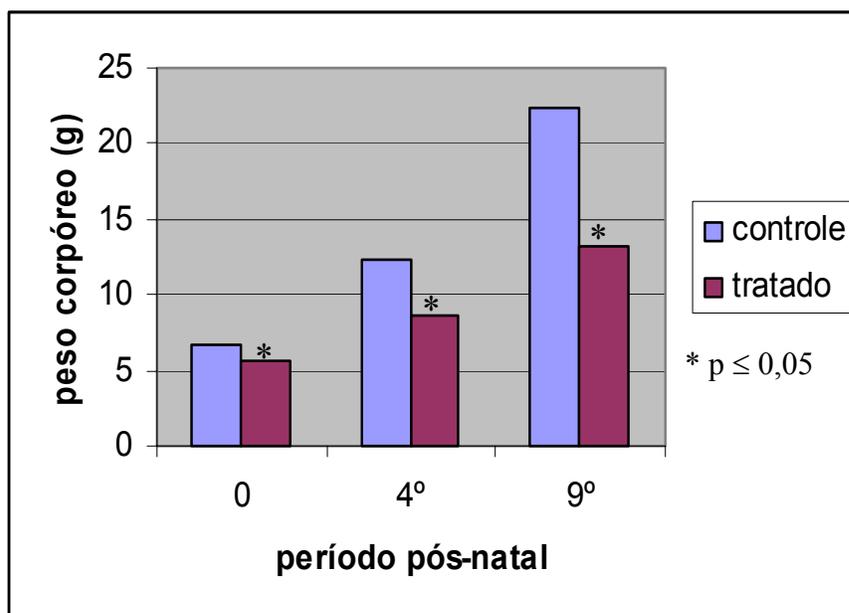


Figura 3: Médias do peso corpóreo (g) de filhotes de ratas dos grupos controle e tratado, nos 0, 4º e 9º dias pós-natal.

5.3 IMUNOEXPRESSÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL

A localização do EGF foi claramente delineada pela coloração (precipitado insolúvel) marrom da associação entre a peroxidase que foi conjugada ao anticorpo, o peróxido de hidrogênio e o revelador diaminobenzidina. A tabela 9 mostra as diferenças no padrão de distribuição e na intensidade (isto significa maior ou menor concentração do EGF) de marcação do EGF nas diversas estruturas do germe dental em todos os períodos estudados dos grupos, controle e tratado. Como controle positivo da reação imunohistoquímica, o EGF foi observado em outros tecidos (epitélio oral e células ósseas), no mesmo corte do germe dental em estudo, onde o antígeno foi previamente localizado (Figura 5a). Os cortes de controle negativo, onde o anticorpo primário foi omitido, mostraram total ausência de marcação (Figura 5b).

Tabela 9

Imunoexpressão do EGF no 1º molar inferior de filhotes de ratas nos 0, 4º, 9º dias pós-natal, dos grupos controle (C) e tratado (T).

	0 dia			4º dia			9º dia		
	C	T	p	C	T	p	C	T	p
Epitélio interno	3	0	0,0039*	-	-	-	-	-	-
Pré-ameloblastos	3	0	0,0039*	1	0	0,0104*	-	-	-
Ameloblastos secretores	-	-	-	3	2	0,0039*	3	2	0,0039*
Ameloblastos na fase de maturação	-	-	-	-	-	-	3	0	0,0039*
Estrato intermédio	2	1	0,0131*	-	-	-	-	-	-
Retículo estrelado	2	0	0,0039*	2	2	0,2002	-	-	-
Camada papilar	-	-	-	-	-	-	1	0	0,0547*
Odontoblasto	3	2	0,0039*	3	2	0,0039*	3	2	0,0163*
Papila dental / Polpa	1	0	0,0082*	2	1	0,0039*	1	1	0,3785

* Significante $p \leq 0,05$ (Teste de Mann Whitney)

Intensidade de marcação: (0) ausente; (1) fraca; (2) moderada; (3) forte

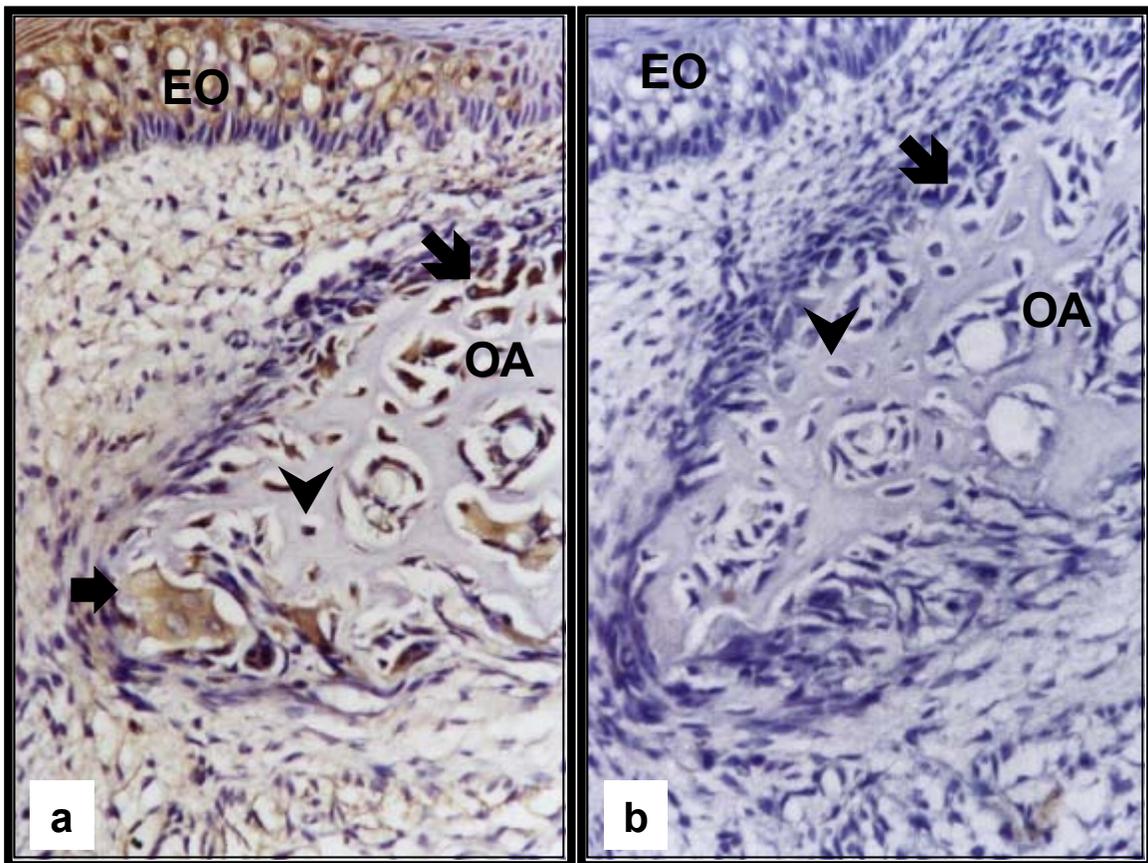


Figura 5 – Fotomicrografia do germe dentário: **a)** Controle positivo: epitélio oral (EO); osteoblastos (↘); osteócitos (∇) e osteoclastos (→) mostram forte marcação para EGF. **b)** Controle negativo: epitélio oral (EO); osteoblastos (↘); osteócitos (∇) mostram total ausência de marcação para EGF; osso alveolar (OA). Aumento original: 400x.

5.3.1 PERÍODO DE - 0 - DIA PÓS-NATAL

Grupo controle

Neste período o germe dentário encontrou-se no início da fase de coroa a qual foi caracterizada pela deposição de dentina no vértice da futura cúspide do dente (Figura 6).

A Figura 6 mostra a vertente lingual da coroa do germe dentário, a qual pode ser dividida em região oclusal (próxima ao vértice da cúspide) e região cervical (próxima à alça cervical). Próximo à alça cervical foram encontradas células cilíndricas baixas do epitélio interno do órgão do esmalte, adjacentes às células ectomesenquimais indiferenciadas da papila dentária. Já na região próxima ao vértice da cúspide as células do epitélio interno tornaram-se cilíndricas altas com núcleo próximo à lâmina basal, passando a serem denominadas de pré-ameloblastos. Nesse momento, as células da região periférica da papila dentária se encontraram diferenciadas em odontoblastos os quais ficam adjacentes a uma fina camada de matriz dentinária. Sendo assim encontramos estágios cada vez mais avançados, quanto mais próximo do vértice da cúspide for a região examinada.

Com relação ao EGF, este foi localizado com forte marcação nos pré-ameloblastos e odontoblastos, enquanto que na papila dentária, a marcação foi de intensidade fraca (Figuras 7a e 8a). Na região próxima à alça cervical as células do epitélio interno e epitélio externo do órgão do esmalte apresentaram forte marcação (Figuras 7a e 9a).

Grupo tratado

Neste período o germe dentário do grupo tratado encontrou-se com a dentinogênese apenas iniciando no vértice da futura cúspide. Nesta região os odontoblastos se encontraram em início de diferenciação. Os pré-ameloblastos, também estavam menos diferenciados, com os núcleos localizados em diferentes níveis, indicando ausência de polarização (Figura 7b).

Com relação ao EGF, este foi localizado com moderada marcação nos odontoblastos, enquanto que os pré-ameloblastos e a papila dentária não mostraram marcação (Figuras 7b e 8b). Na região próxima à alça cervical as células dos epitélios interno e externo do órgão do esmalte apresentaram ausência de marcação (Figuras 7b e 9b).

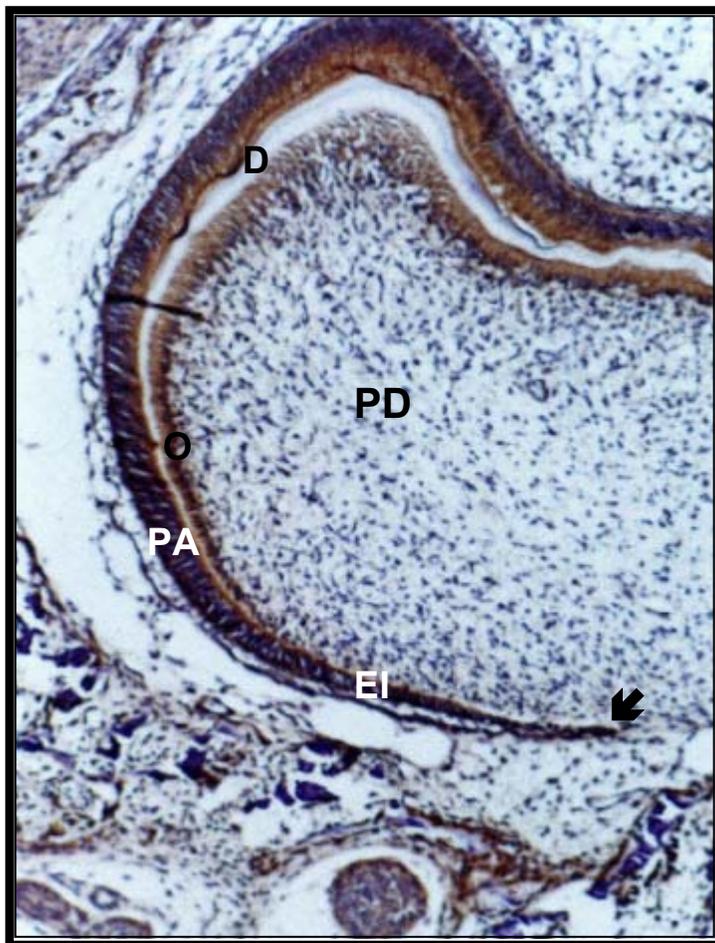


Figura 6 – Fotomicrografia da vertente lingual da coroa do germe dentário do grupo controle ao 0 dia pós-natal: alça cervical (seta); epitélio interno do órgão do esmalte (EI); pré-ameloblastos (PA); odontoblastos (O); dentina (D); papila dental (PD). Aumento original: 100x.

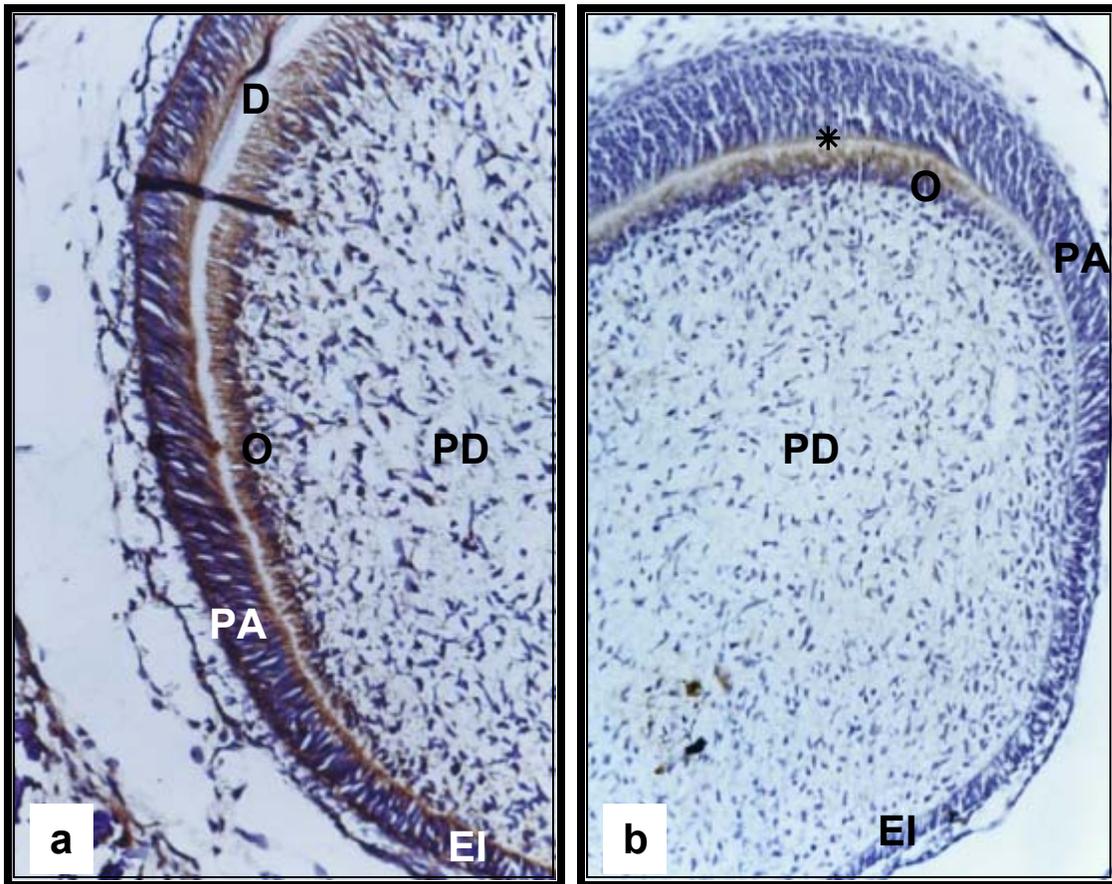


Figura 7 – Fotomicrografia da vertente lingual da coroa do germe dentário ao 0 dia pós-natal. Grupos: **a) Controle** **b) Tratado**. Epitélio interno do órgão do esmalte (EI); pré-ameloblastos (PA); odontoblastos (O); dentina (D); papila dental (PD); dentinogênese em fase inicial (*). Aumento original: 200x.

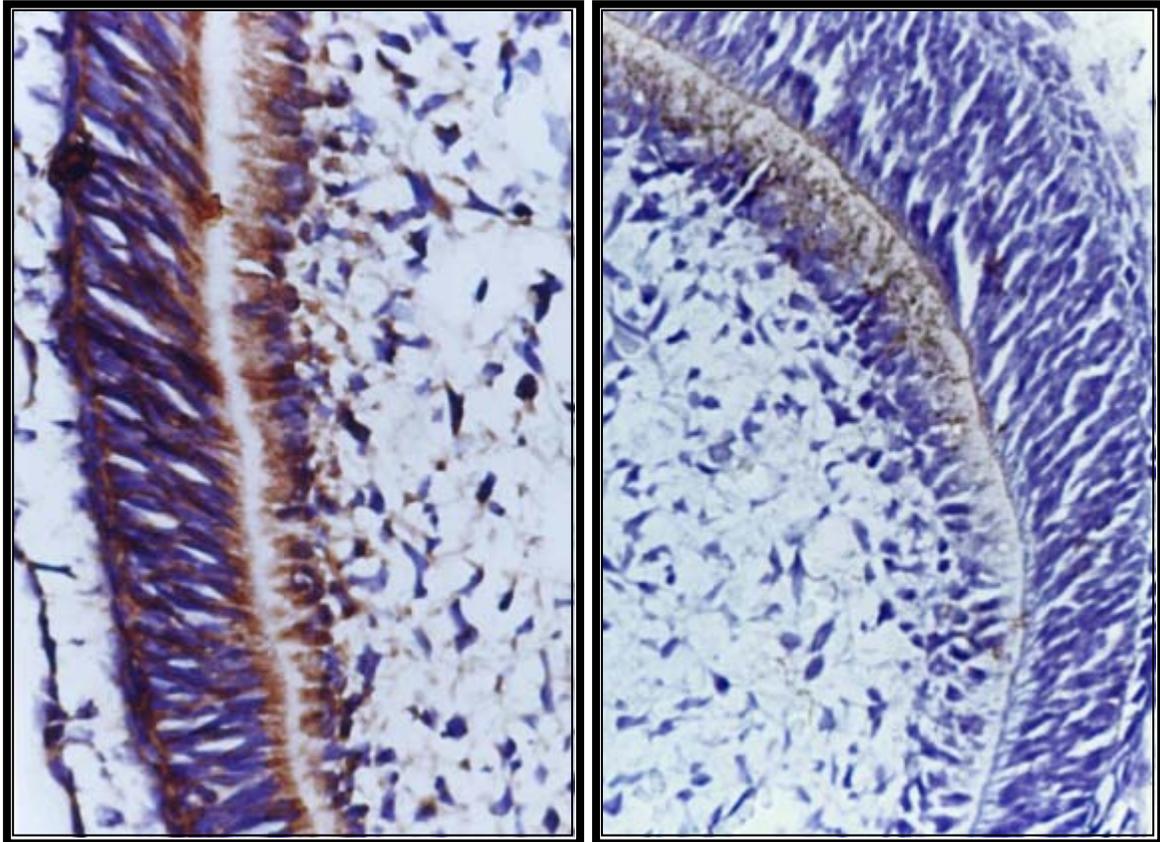


Figura 8 – Fotomicrografia da região oclusal da vertente lingual da coroa do germe dentário ao 0 dia pós-natal, mostrando a imunoexpressão do EGF. Grupos: **a) Controle** - pré-ameloblastos (PA) e odontoblastos (O) apresentaram marcação forte; papila dental (PD) apresentou marcação fraca. **b) Tratado** - odontoblastos (O) apresentaram marcação moderada; pré-ameloblastos (PA) e papila dental (PD) não apresentaram marcação. Aumento original: 500x.

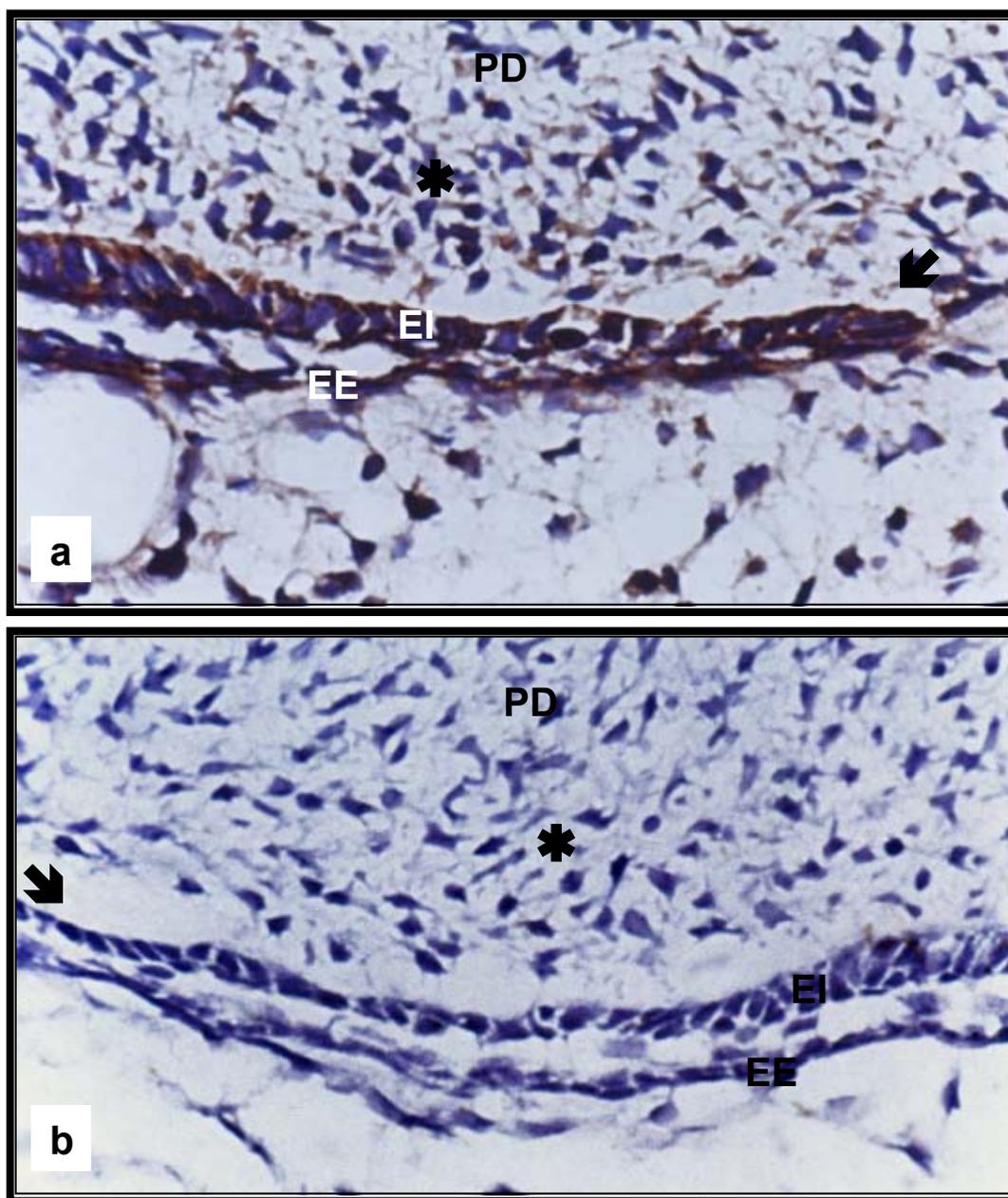


Figura 9 – Fotomicrografia da região cervical da vertente lingual da coroa do germe dentário ao 0 dia pós-natal , mostrando a imunoposição do EGF. Grupos: **a)** Controle - alça cervical (seta); epitélio interno (EI) e epitélio externo do órgão do esmalte (EE) apresentaram marcação forte; maior condensação de células ectomesenquimais (*) da papila dental (PD). **b)** Tratado - alça cervical (seta); epitélio interno (EI) e epitélio externo do órgão do esmalte (EE) não apresentaram marcação ; menor condensação de células ectomesenquimais (*) da papila dental (PD). Aumento original: 500x.

5.3.2 PERÍODO DE 4º DIA PÓS-NATAL

Grupo controle

Neste período o germe dentário encontrava-se na fase de coroa, caracterizada pela presença das camadas de dentina e esmalte (Figura 10a). Esta fase se desenvolve desde os locais correspondentes às cúspides em direção cervical, portanto, na região próxima à alça cervical, observou-se zonas nas quais o epitélio interno do órgão do esmalte ainda não sofreu inversão da sua polaridade. Pré-ameloblastos podem ser vistos na região adjacente ao epitélio interno do órgão do esmalte. Já na papila dentária os pré-odontoblastos estão se diferenciando em odontoblastos. Os odontoblastos diferenciados se encontram adjacentes à uma camada de dentina relativamente desenvolvida. A camada de esmalte com espessura semelhante à da dentina, depositada por ameloblastos secretores, se mostrou presente. Na superfície desta camada, estes ameloblastos se apresentavam como células altas, justapostas umas às outras com núcleos alongados e localizados no pólo basal.

Com relação ao EGF, este se localizava nas células do órgão do esmalte e papila dentário durante a formação do esmalte (Figuras 10a, 11a e 12a).

Na região próxima à alça cervical, as células da papila dentária apresentaram moderada marcação, porém os pré-ameloblastos estavam marcados fracamente (Figura 11a).

Na Figura 12a observa-se os odontoblastos e ameloblastos já diferenciados, envolvidos agora na secreção da matriz dentinária e do esmalte, respectivamente. Nesta região foi observada forte marcação no citoplasma da região apical e da região basal do ameloblasto secretor, assim como no citoplasma dos odontoblastos. As células da papila dentária mostraram marcação moderada. Já nas matrizes dentinária e do esmalte não ocorreu marcação em

nenhuma região da vertente da coroa dentária. A região do folículo dentário apresentou fraca marcação e as células osteogênicas mostraram marcação muito forte. A matriz óssea não apresentou marcação em nenhuma região.

Grupo tratado

Neste período o germe dentário apresentou as características morfológicas da fase de coroa semelhantes ao grupo controle, porém algumas diferenças foram notadas. A cúspide apresentou redução na altura, assim como na espessura das camadas de dentina e esmalte (Figura 10b).

Com relação ao EGF este, também foi localizado nas células do órgão do esmalte e papila dentária, porém com intensidade de marcação reduzida (Figuras 10b, 11b e 12b).

Na região próxima à alça cervical, as células da papila dentária apresentaram fraca marcação, enquanto que os pré-ameloblastos não mostraram marcação (Figura 11b). Os odontoblastos e ameloblastos já diferenciados, são vistos adjacentes às matrizes dentinária e do esmalte (Figura 12b). Foi observada moderada marcação no citoplasma do ameloblasto secretor somente na região apical, enquanto que no citoplasma da região basal não houve marcação. Os odontoblastos apresentaram marcação moderada. As células da papila dentária marcaram fracamente. A região do folículo dentário e as células osteogênicas não apresentaram marcação. O retículo estrelado, presente em toda extensão da coroa, mostrou moderada marcação (Tabela 9).

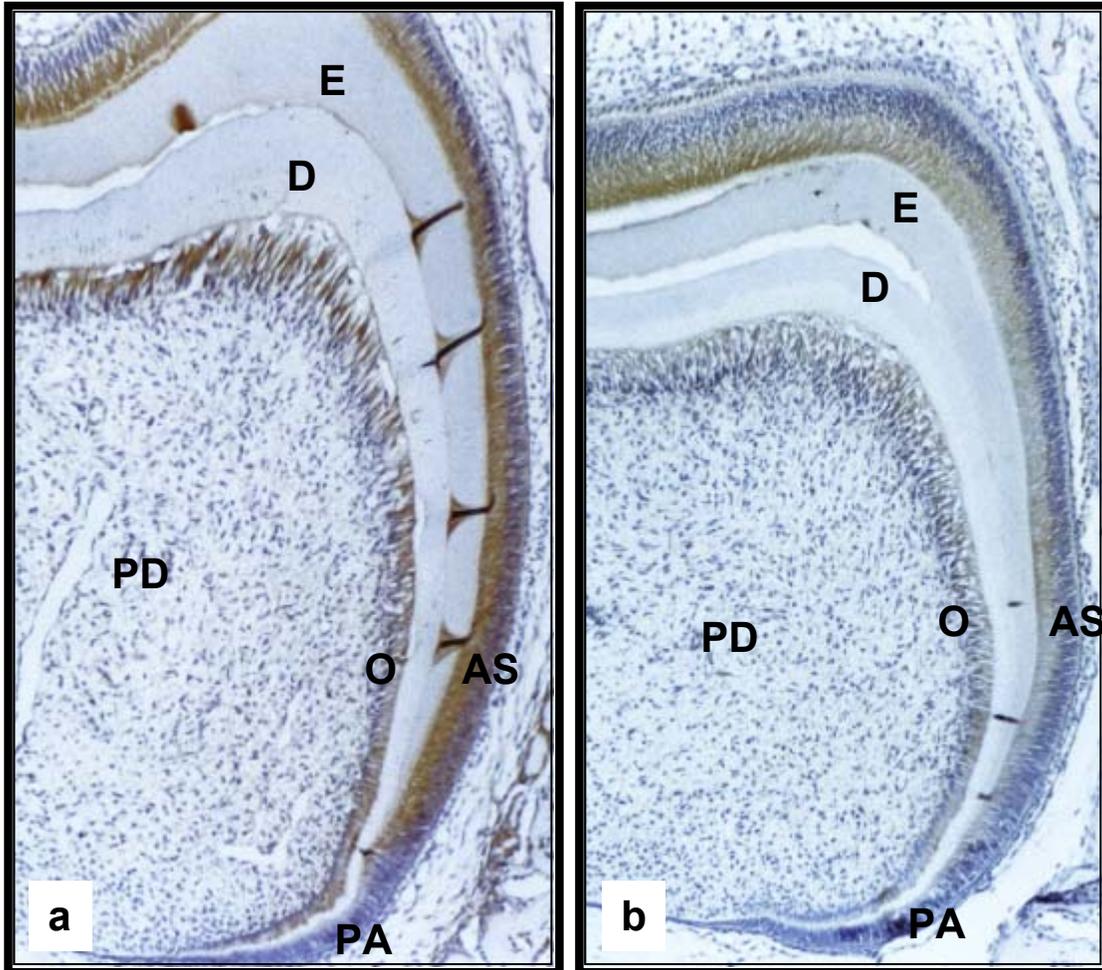


Figura 10 – Fotomicrografia da vertente lingual da coroa do germe dentário ao 4º dia pós-natal. Grupos: **a)** Controle **b)** Tratado. Pré-ameloblastos (PA); odontoblastos (O); papila dental (PD); ameloblastos secretores (AS); dentina (D); esmalte (E). Aumento original: 100x.

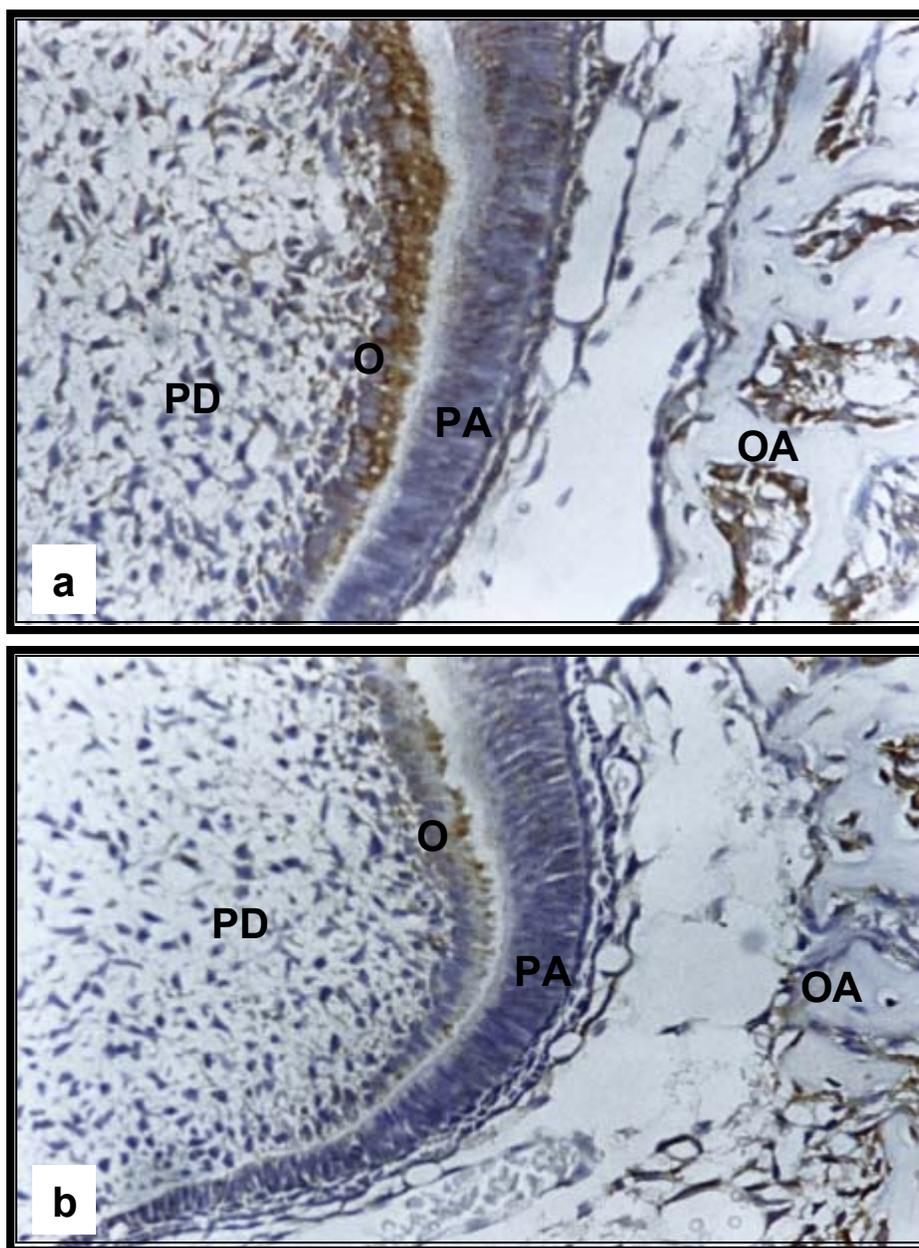


Figura 11 – Fotomicrografia da região cervical da vertente lingual da coroa do germe dentário ao 4º dia pós-natal, mostrando a imunoexpressão do EGF. Grupos: **a)** Controle - pré-ameloblastos (PA) marcaram fracamente; odontoblastos (O) apresentaram marcação forte; papila dental (PD) apresentou marcação moderada; dentina (D) ausência de marcação. **b)** Tratado - pré-ameloblastos (PA) ausência de marcação; odontoblastos (O) apresentaram marcação moderada; papila dental (PD) apresentou marcação fraca; dentina (D) ausência de marcação; osso alveolar (OA). Aumento original: 400x.

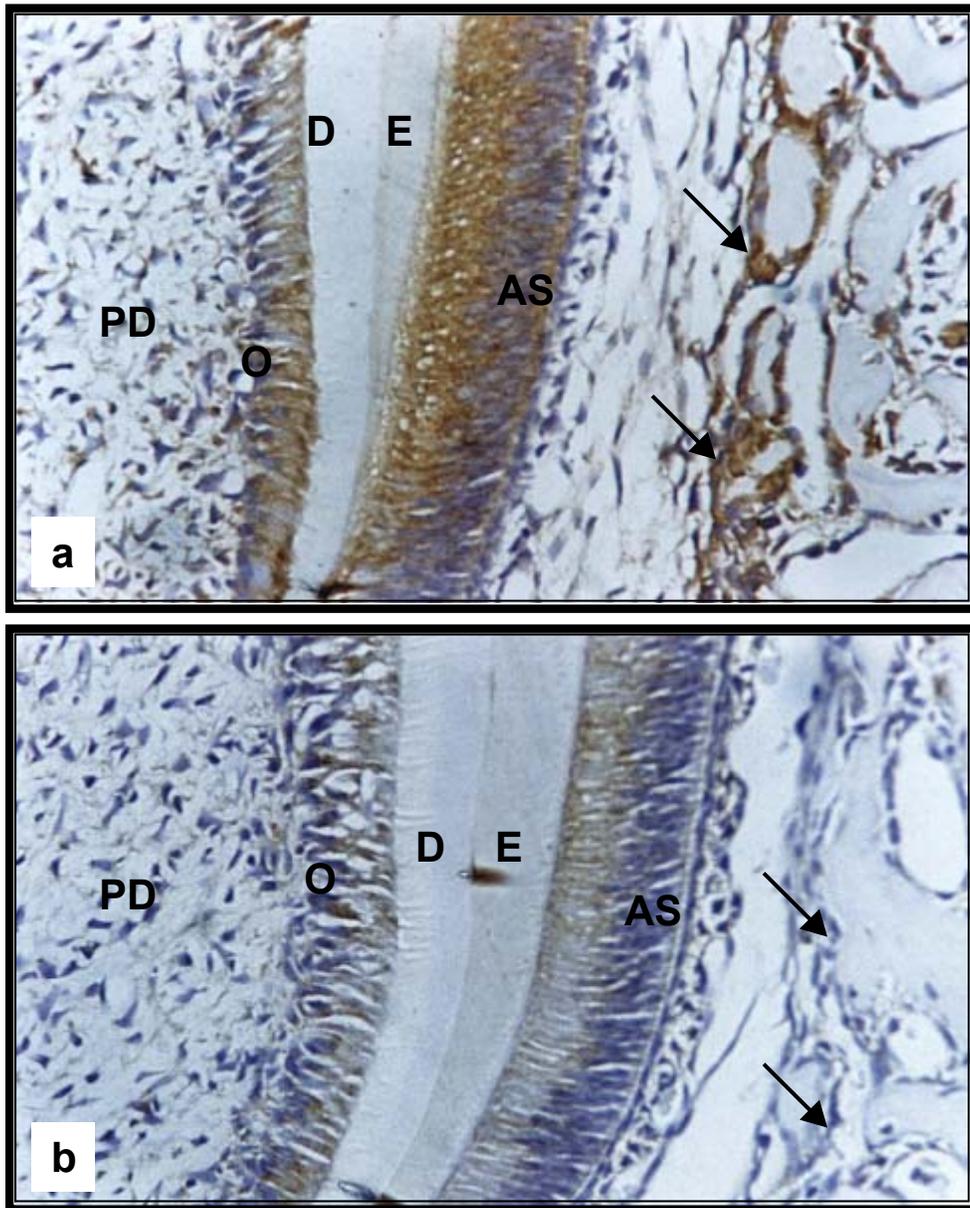


Figura 12 – Fotomicrografia da região oclusal da vertente lingual da coroa do germe dentário ao 4º dia pós-natal, mostrando a imunoexpressão do EGF. Grupos: **a) Controle** - ameloblastos secretores (AS) e odontoblastos (O) marcaram com intensidade forte; papila dental (PD) marcação moderada; células osteogênicas (setas) apresentaram marcação muito forte; dentina (D) e esmalte (E) não mostraram marcação. **b) Tratado** - ameloblastos secretores (AS) e odontoblastos (O) marcaram com intensidade moderada; papila dental (PD) apresentou fraca marcação; células osteogênicas (setas), dentina (D) e esmalte (E) não mostraram marcação. Aumento original: 400x.

5.3.3 PERÍODO DE 9º DIA PÓS-NATAL

Grupo controle

O germe dentário apresenta-se com a coroa já formada e em processo de maturação do esmalte. A Figura 13a mostra a vertente lingual do germe dentário onde se pode observar as camadas de dentina e esmalte bem desenvolvidas, assim como uma parte da raiz já formada o que pode ser evidenciado pela presença de dentina radicular.

A Figura 15a mostra a região cervical da vertente do germe dentário onde observa-se ainda ameloblastos e células do estrato intermédio com características morfológicas da fase de secreção de esmalte. Estes ameloblastos bem como os odontoblastos adjacentes à dentina radicular e à dentina coronária apresentaram forte intensidade de marcação para o EGF (Figura 17a).

A Figura 14 mostra a região de transição entre o final da secreção e o início da maturação do esmalte. Pode-se observar uma separação entre a camada de ameloblasto e a matriz do esmalte. Nesta área os ameloblastos perderam seus processos de Tomes, fato este responsável pela redução no grau de união entre a região distal dos ameloblastos e a matriz do esmalte. Acima desta área, esse espaço desaparece e os ameloblastos, agora reduzidos em altura, apresentavam-se novamente aderidos à superfície do esmalte.

Examinando uma região mais oclusal da vertente, os ameloblastos se mostram como células cilíndricas baixas. As células do estrato intermédio tornam-se cuboidais e são indistinguíveis das células do epitélio externo do órgão do esmalte, participando agora, da formação da camada papilar, a qual fica em contato com a região basal dos ameloblastos em fase de maturação e com os capilares do folículo dentário. Sendo assim não se observa mais a nítida separação entre a camada de ameloblastos e a camada do estrato intermédio. As células da camada papilar são as únicas que estão na região antes ocupada pelo

estrato intermédio e retículo estrelado (Figura 16a). Quanto ao EGF este foi localizado com forte intensidade nos ameloblastos em fase de maturação e na camada papilar com fraca marcação (Figura 16a).

Grupo tratado

A Figura 13b mostra a vertente lingual do germe dentário onde se pode observar as camadas de dentina e esmalte menos desenvolvidas, assim como a menor altura da cúspide, quando comparadas no mesmo período, ao grupo controle. Os ameloblastos secretores foram encontrados, na região cervical e na maior parte da vertente lingual do germe dentário.

Na região cervical da vertente do germe dentário, os ameloblastos secretores apresentaram marcação moderada declinando para fraca conforme foram se aproximando da região oclusal da vertente. Os odontoblastos adjacentes à dentina radicular não apresentaram marcação (Figura 15b).

Os ameloblastos em maturação também se apresentaram como células cilíndricas baixas, porém estavam localizados apenas na região da vertente próxima à ponta da cúspide. A camada papilar estava adjacente à região basal dos ameloblastos em maturação, porém, se apresentou menos desenvolvida. Quanto à marcação do EGF esta se mostrou ausente, tanto nos ameloblastos em maturação, quanto na camada papilar (Figura 16b).

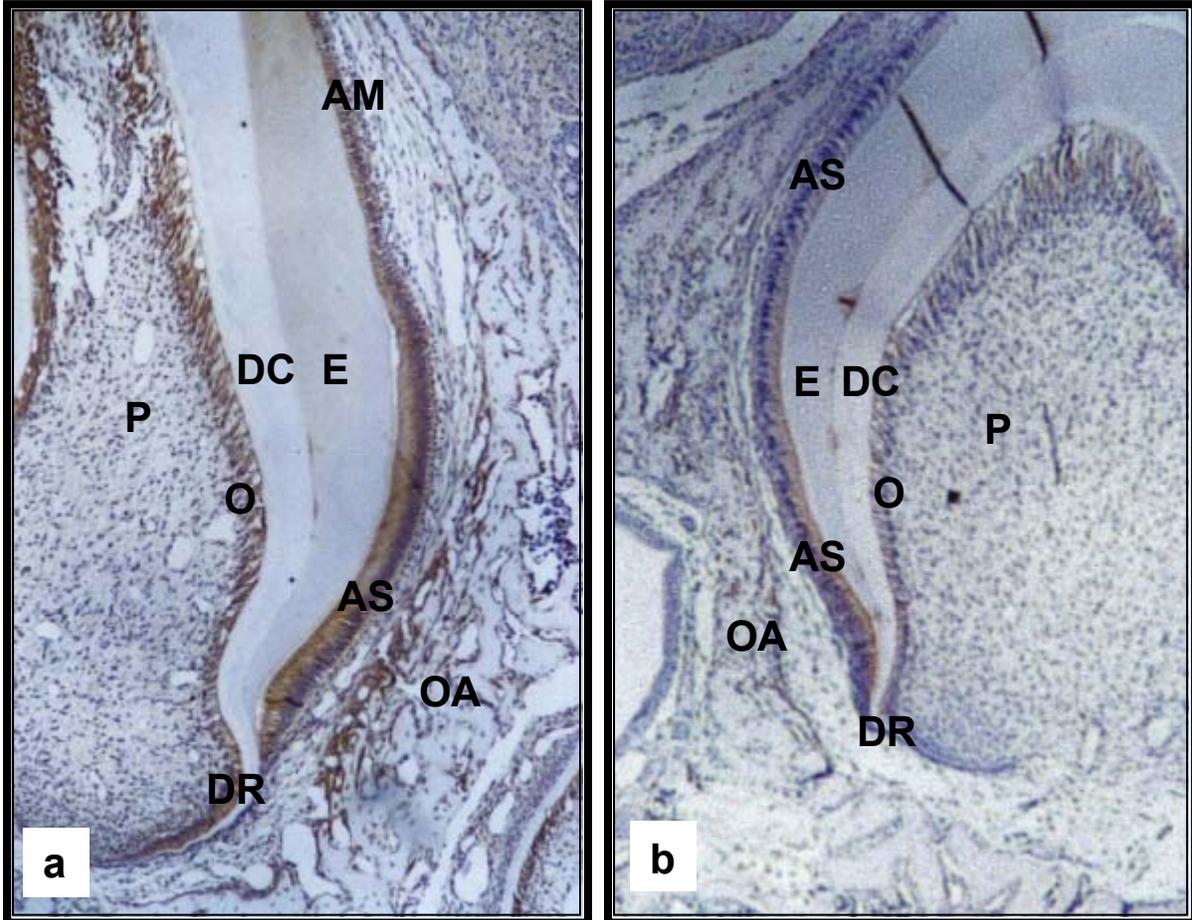


Figura 13 – Fotomicrografia da vertente lingual da coroa do germe dentário ao 9º dia pós-natal. Grupos: **a) Controle** **b) Tratado**. Dentina radicular (DR); dentina coronária (DC); esmalte (E); odontoblastos (O); polpa (P); ameloblastos secretores (AS); ameloblastos em maturação (AM). Aumento original: 100x.

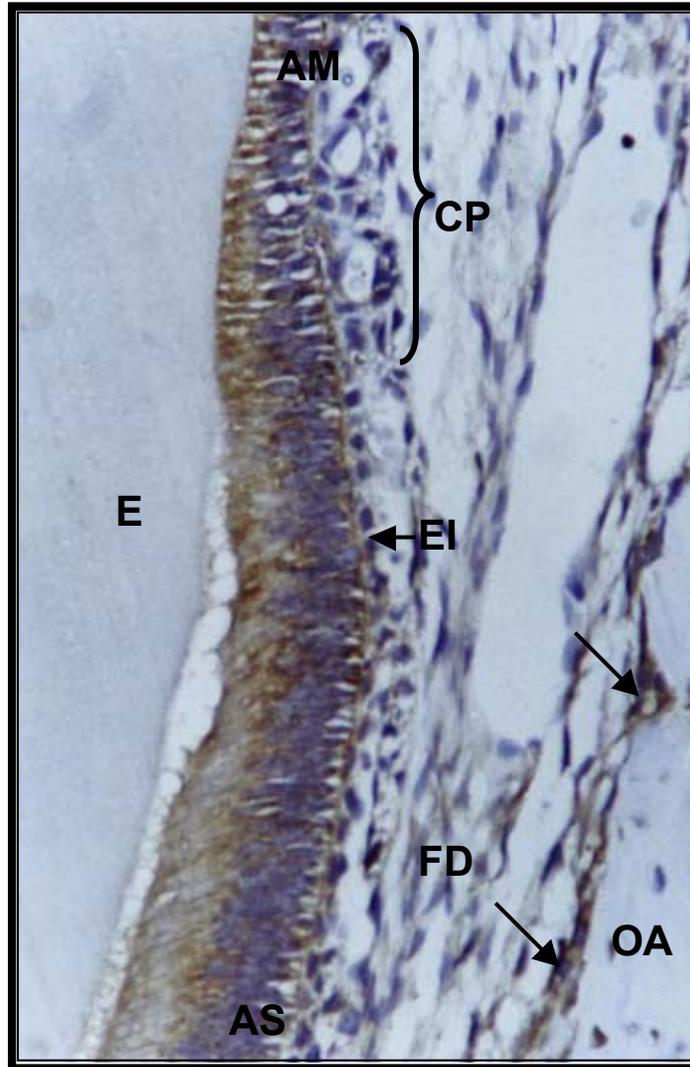


Figura 14 – Fotomicrografia da região de transição da vertente lingual da coroa do germe dentário do grupo controle ao 9^o dia pós-natal, mostrando a imunomarcagem do EGF: ameloblastos secretores ao final da secreção do esmalte (AS) e ameloblastos em maturação (AM) apresentaram forte marcação; estrato intermédio (EI), camada papilar (CP) e folículo dental (FD) mostraram fraca marcação; células osteogênicas (setas) tiveram marcação muito forte e o osso alveolar (OA) não apresentou marcação. Aumento original: 500X.

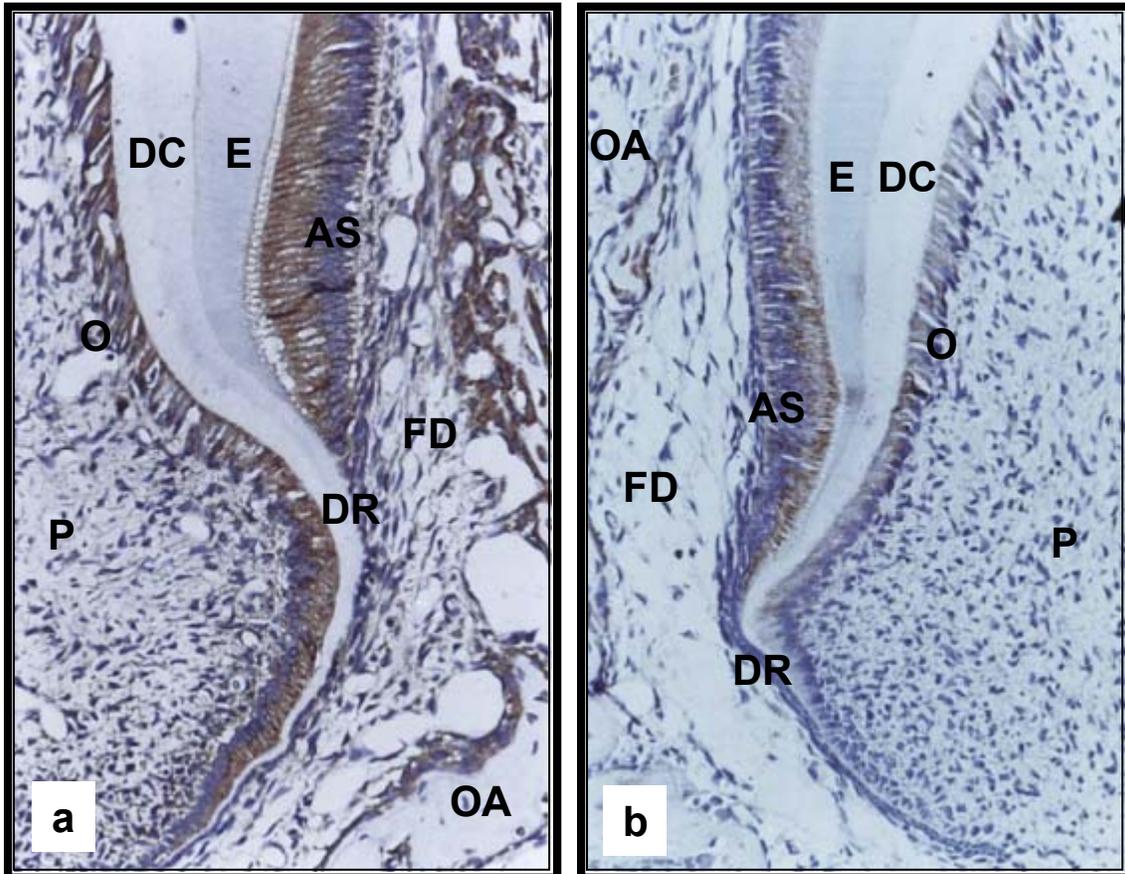


Figura 15 – Fotomicrografia da região cervical da vertente lingual da coroa do germe dentário ao 9^o dia pós-natal, mostrando a imunoexpressão do EGF. Grupos: **a)** Controle - dentina radicular (DR); dentina coronária (DC) e esmalte (E) não marcaram; odontoblastos (O) e ameloblastos secretores (AS) apresentaram marcação forte; polpa (P) mostrou fraca marcação. **b)** Tratado - dentina radicular (DR) em início de formação; dentina coronária (DC), esmalte (E), odontoblastos (O) adjacentes à dentina radicular e polpa (P) não apresentaram marcação. Aumento original: 200X.

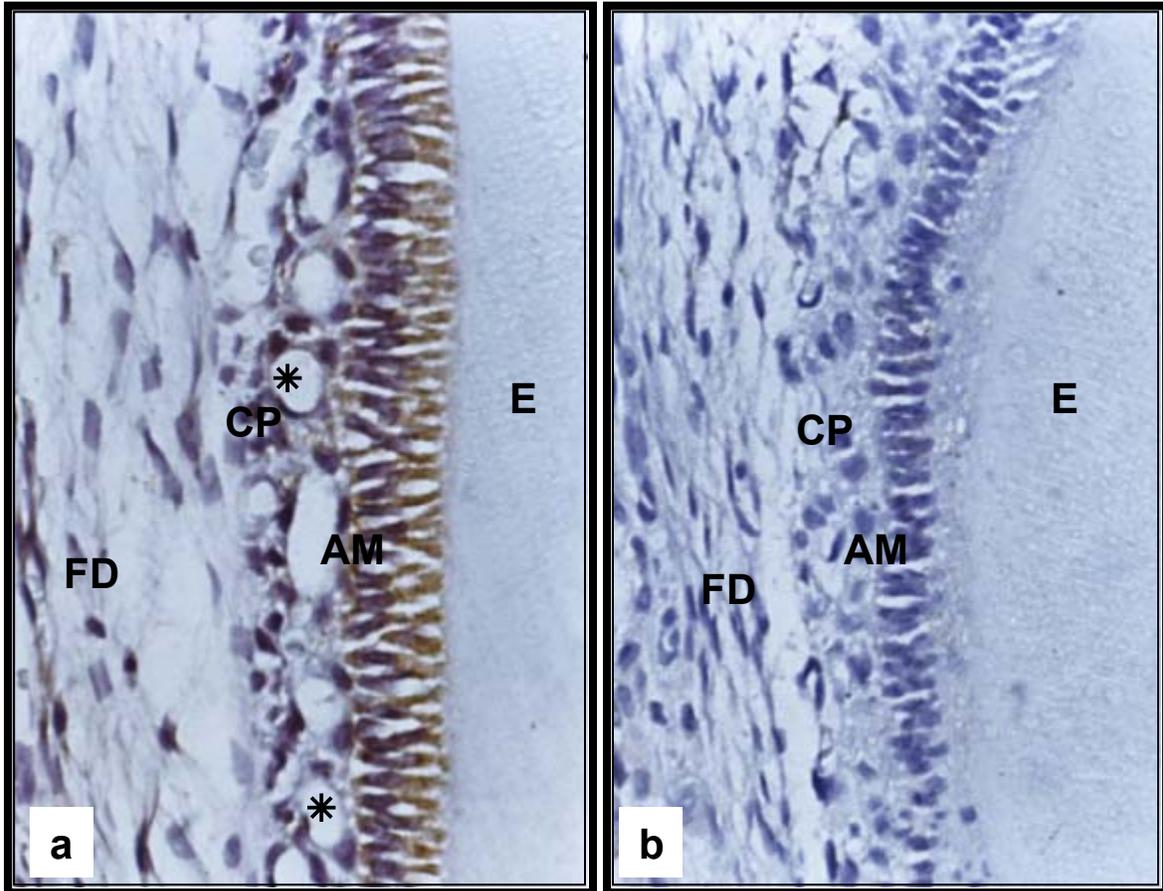


Figura 16 – Fotomicrografia da região oclusal da vertente lingual da coroa do germe dentário ao 9º dia pós-natal, mostrando a imunoexpressão do EGF. Grupos: **a) Controle** - ameloblastos reduzidos em fase de maturação do esmalte (AM) apresentaram forte marcação, camada papilar (CP) e folículo dental (FD) fraca; no esmalte (E) não houve marcação; capilares (*). **b) Tratado** - ameloblastos reduzidos em fase de maturação do esmalte (AM); camada papilar (CP) menos desenvolvida; folículo dental (FD) e esmalte (E) não apresentaram marcação. Aumento original: 500X.

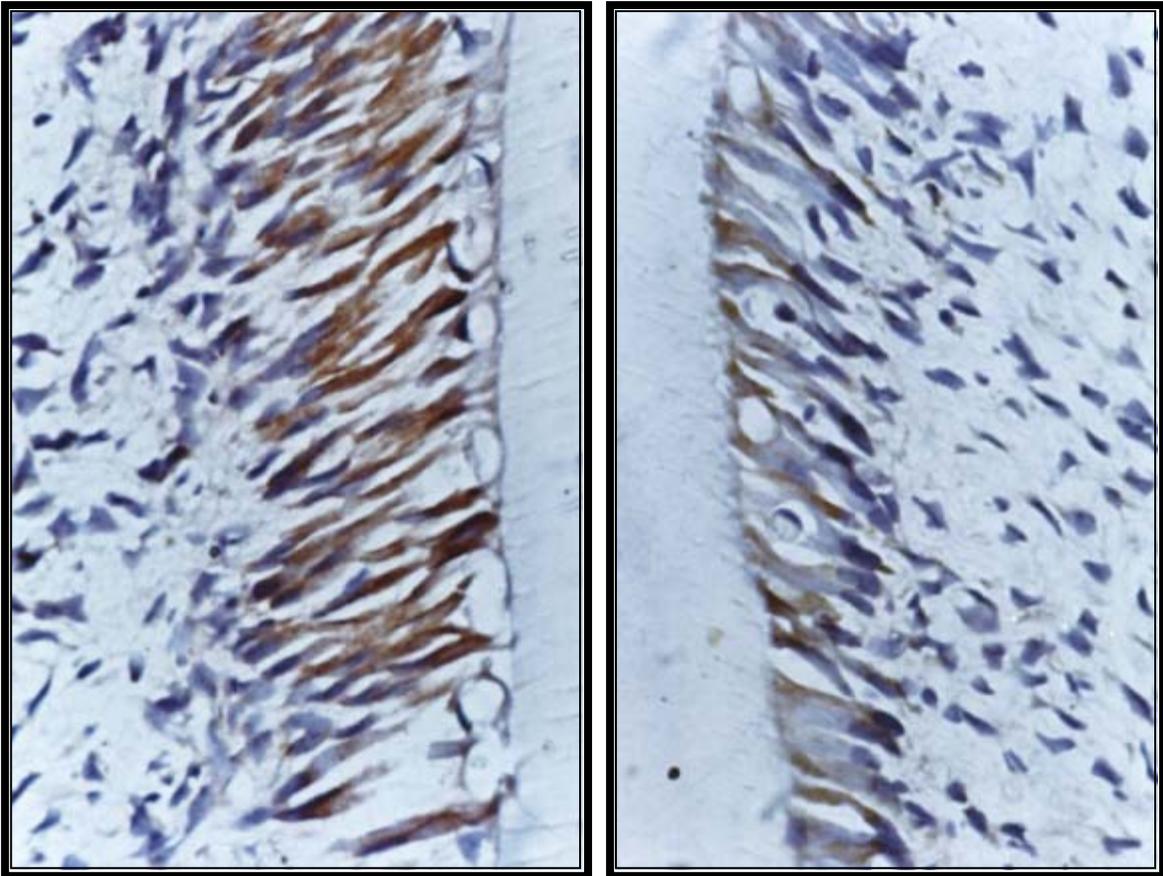


Figura 17 – Fotomicrografia da região coronária da vertente lingual da coroa do germe dentário ao 9º dia pós-natal, mostrando a imunexpressão do EGF. Grupos: **a) Controle** - dentina coronária (DC) marcação ausente; odontoblastos (O) apresentaram marcação forte; polpa (P) marcou fracamente; capilares (*). **b) Tratado** - dentina coronária (DC) ausência de marcação; odontoblastos (O) apresentaram marcação moderada; polpa (P) ausência de marcação. Aumento original: 500X.

6. DISCUSSÃO

Vários estudos sobre os efeitos do consumo materno de álcool são relatados na literatura, diferindo em termos de espécie de animal usada, grupos experimentais, concentração de álcool, duração da administração e período de exposição ao álcool. (Ludena *et al.*⁴⁰, 1983; Campos & Duranza⁷ 1988; Guerrero²³ 1990; Guerrero *et al.*²⁴, 1998).

No presente trabalho, foi usada a via oral de administração do álcool pelo fato de refletir melhor a realidade das pessoas alcoólatras. Durante a gestação, o volume de álcool ingerido em média pelos animais do grupo tratado foi de 22,84g/Kg/dia (=28,02ml/25%) por animal. Esta quantidade de álcool consumida pelas ratas, é semelhante àquela encontrada na maioria dos trabalhos onde se verificaram o potencial teratogênico do álcool (Sulik *et al.*⁶⁵, 1981; Ludena *et al.*⁴⁰, 1983; Campos & Duranza⁷ 1988; Guerrero²³ 1990; Guerrero *et al.*²⁵, 1996; Guerrero *et al.*²⁴, 1998).

Verificamos que a exposição ao álcool antes e durante a gestação afetou o tamanho da ninhada (Tabela 6). Entretanto, o tempo de gestação e a porcentagem de ratas prenhas e prenhez concluída, não mostraram diferenças significantes entre os grupos controle e tratado, estando de acordo com a literatura (Guerrero *et al.*²⁵, 1996; Guerrero *et al.*²⁴, 1998; Grinfeld *et al.*²¹, 1999).

Foram verificados diariamente os consumos de ração e de líquido e calculada a média de calorias ingeridas por animal durante os períodos de pré e pós-fertilização, a fim de controlar o estado nutricional dos animais (Tabelas 1, 2, 3 e 4). Segundo o National Research Council (1995), a quantidade de calorias que um rato adulto deve ingerir diariamente para manutenção de um estado nutricional satisfatório é de 112Kcal/Kg e durante a gestação, é de 143Kcal/Kg, de peso corporal. O indivíduo alcoólatra obtém do álcool, segundo dados estatísticos da Secretaria Nacional de Drogas (SENAD, 2000), 43 a 57% das calorias totais

ingeridas. Entre os pesquisadores existem controvérsias sobre a utilização ou não destas calorias pelo organismo para sua própria manutenção por esta razão, foram chamadas por Lehninger³⁵ (1991), citado por Coelho (2000), de “calorias vazias”. Portanto, para avaliação nutricional dos animais em nosso estudo, foram levadas em conta apenas as calorias vindas da ração.

Levando-se em consideração o peso corpóreo das ratas tratadas, a quantidade de calorias que elas deveriam ingerir com a ração para não serem consideradas desnutridas, segundo os valores do National Research Council (1995) foi em média 22,7Kcal/dia no período de pré-gestação e 33,91kcal/dia no período de gestação. As tabelas 3 e 4, mostram que esses valores foram satisfatoriamente alcançados por todos os animais do grupo tratado. Mesmo nas semanas onde foi encontrado menor consumo de ração pelos animais tratados, estes ingeriram quantidades de calorias necessárias para a manutenção e gestação (Tabelas 1, 2, 3 e 4). Os valores da ingestão calórica total, em cada semana da gestação, superaram as médias encontradas no grupo controle, devido à presença das calorias provenientes do álcool (Tabela 3 e 4).

Segundo Lieber³⁸ (1984b), o álcool é uma droga rica em energia e a ingestão prolongada do mesmo, está freqüentemente associada a hábitos de dietas pobres, tanto no ser humano quanto em animais de laboratório podendo interferir na absorção intestinal de nutrientes. Mesmo quando os nutrientes são digeridos e absorvidos, o álcool pode impedir que eles sejam completamente utilizados pela alteração nos processos de transporte, armazenamento e excreção. De acordo com Campana *et al.*⁶ (1995) 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. No presente estudo os sintomas de desnutrição acima citados não foram observados nos animais tratados com álcool apresentando todos eles, ganho de peso no decorrer do experimento (Figura 2).

Durante a gestação, o álcool promoveu, nos animais tratados, em média 51,75% do consumo total de calorias diárias. Isto foi refletido no peso

significativamente menor nas ratas tratadas quando comparado às controles (Figura 2 e Tabela 5). Isto está de acordo com Leichter & Lee³⁶ (1979) e Guerrero *et al.*²⁴ (1998), os quais observaram que as ratas tratadas, também ganharam menos peso, embora a quantidade de ingestão calórica fosse similar em ambos os grupos. A redução no peso corpóreo das ratas, aumentou com a evolução da gestação (Figura 2) e pode ser resultante de ambos: 1) redução no peso fetal, devido aos efeitos deletérios da ingestão materna de álcool sobre a velocidade de crescimento fetal. 2) dificuldade das ratas prenhas em armazenar suas reservas energéticas, como normalmente ocorre nas ratas no final da prenhez (Herrera *et al.*²⁸, 1969; Ludena *et al.*⁴⁰, 1983; Guerrero²³, 1990; Guerrero, *et al.*²⁴, 1998). No estudo de Guerrero²³ (1990) a redução na velocidade de crescimento fetal pode ser evidenciada por redução significativa no peso fetal aos 14,5^o; 16,5^o; 18,5^o dias pré-natal e no peso dos filhotes ao nascimento e período pós-natal no grupo tratado, quando comparado ao peso dos fetos e filhotes de ratas controle, as quais receberam quantidades semelhantes de calorias antes e durante a gestação. Segundo o trabalho, esses dados refletem a influência direta do álcool sobre o desenvolvimento embrionário, ao invés de fatores nutricionais.

O álcool seria a causa do retardo no crescimento, tendo seus efeitos no peso e comprimento ao nascimento e posteriormente na estatura pós-natal (Jones *et al.*³⁰, 1973; Clarren & Smith¹¹, 1978; Streissguth *et al.*⁶³, 1991; Autti-Rämö *et al.*³, 1992; Coles¹⁴, 1993). De acordo com Jackson *et al.*²⁹ (1990) as crianças afetadas com SFA têm uma redução no peso ao nascimento maior do que a estatura. Lee & Leichter³⁴ (1980) e Ludena *et al.*⁴⁰ (1983) confirmaram, em ratos, que o consumo materno de álcool antes e durante a gestação afetou os mecanismos regulatórios do crescimento durante o desenvolvimento embrionário, sendo este efeito persistente após o nascimento.

Em nossa pesquisa observamos, que a ingestão materna de álcool afetou o desenvolvimento global dos filhotes, o que foi evidenciado pela redução no peso e comprimento crânio-caudal dos filhotes do grupo tratado (Figuras 3 e 4). Observando as Tabelas 7 e 8 podemos notar, que neste grupo o peso corpóreo ao

nascimento foi 14,6% menor, enquanto que a redução no comprimento foi de 7,5%. Assim também, Garcia *et al.*¹⁸ (1996) notaram uma redução de 20% no peso dos filhotes de mães tratadas com álcool durante a prenhez. Kamei *et al.*³¹ (1993) demonstraram uma associação entre a redução no nível plasmático do EGF e o retardo no crescimento fetal de ratas prenhas sialoadenectomizadas. Sabendo, que o abuso de álcool durante a gestação está associado com alteração dos níveis de EGF na circulação materna (Vuorela *et al.*⁷⁵, 2002), podemos inferir, que o menor desenvolvimento dos filhotes do grupo tratado, em nosso estudo, pode ter sido também causado por uma provável deficiência de EGF na circulação materna e conseqüentemente na circulação fetal sendo este efeito persistente após o nascimento.

Nossos resultados diferem daqueles encontrados por Tomazela *et al.*⁷¹ (1997) onde, tanto o peso, quanto o comprimento crânio caudal dos filhotes foram equivalentes ao nascimento em ambos os grupos. Estes parâmetros foram menores nos animais do grupo tratado nos 6º e 10º dias pós-natal, sendo as diferenças neste último, estatisticamente significantes. Já em nossos animais apenas o comprimento foi semelhante entre os grupos, ao nascimento. Podemos considerar que essas diferenças foram devidas às variações nos padrões de administração do álcool e no tempo de exposição à esta droga.

De fato, a incidência das malformações nos filhotes de camundongos tratados com álcool variam de acordo com: (1) o estágio do desenvolvimento embrionário no momento da exposição (2) a via de administração do álcool e (3) tempo de exposição ao álcool (Webster *et al.*⁸¹, 1983).

Um dos mecanismos pelos quais o álcool atua sobre os tecidos em desenvolvimento, é a interferência com os fatores de crescimento (Guerrero *et al.*²⁴, 1998), entre eles o EGF, que é um fator de crescimento que está profundamente envolvido na regulação do desenvolvimento dentário e sua erupção (Thesleff *et al.*⁶⁹, 1987; Wise *et al.*⁸⁶, 1992). Originalmente o EGF estimula a proliferação de células epiteliais e mesenquimais e a diferenciação de ambas (Carpenter & Cohen⁸, 1979).

Quanto à localização do EGF, encontramos uma variação na distribuição e na intensidade da imunomarcagem nas diversas estruturas do órgão do esmalte do germe dentário em todos os períodos estudados, nos dois grupos (Tabela 9). Isto significa que diferentes populações celulares respondem diferentemente ao EGF e, que a resposta celular está relacionada ao estágio do desenvolvimento dentário, sugerindo a participação de interações celulares nesse sistema (Thesleff⁶⁸, 1987). Prévios estudos demonstraram a existência de uma associação direta entre a intensidade da imunomarcagem e o conteúdo celular do EGF (Guajardo *et al.*²², 2000). Assim, as células e/ou tecidos que apresentaram maior intensidade de marcação responderão mais ativamente ao EGF (Luo & Miller⁴¹, 1998).

Segundo Katchburian & Arana³³ (1999), a diferenciação dos odontoblastos é iniciada por influência das células alongadas do epitélio interno do órgão do esmalte, por meio da secreção direta de mensageiros químicos, a partir dos pré-ameloblastos, os quais estariam interagindo com receptores presentes na membrana plasmática das células ectomesenquimais da periferia da papila dentária.

Nossa pesquisa demonstrou, que durante o início da fase de coroa do germe dentário (período de 0^o dia pós-natal) o EGF foi localizado na papila dentária, odontoblastos, pré-ameloblastos e epitélio interno do órgão do esmalte (Figuras 6 e 7a). Estes achados estão de acordo com Cobo *et al.*¹² (1992), os quais localizaram o EGF e seu receptor no epitélio interno e nos pré-ameloblastos do germe dentário de molares no 21^o dia pré-natal. Também, estão de acordo com o estudo de Snead *et al.*⁶² (1989) que demonstraram a imunoexpressão do EGF no epitélio interno, estrato intermédio, retículo estrelado e células ectomesenquimais da papila dentária, durante a fase de histodiferenciação e formação dos tecidos dentários, evidenciando a participação do EGF na regulação das interações epitélio–mesênquima que ocorrem durante a odontogênese.

Encontramos diferenças na imunoexpressão do EGF e na morfologia do germe dentário ao 0 dia pós-natal (Tabela 9). No grupo controle foi observada

marcação forte nos pré-ameloblastos e epitélio interno do órgão do esmalte (Figuras 7a e 8a). Entretanto, no grupo tratado a marcação nestas mesmas estruturas estava ausente (Figuras 7a e 8b). Esses resultados evidenciam, que as células mais afetadas pela exposição materna ao álcool foram as células do epitélio interno e os pré-ameloblastos. Ainda no grupo tratado verificamos, que os odontoblastos apresentaram-se menos desenvolvidos e com moderada intensidade de marcação para o EGF (Figuras 7b e 8b).

Considerando que a diferenciação dos odontoblastos é influenciada pelos pré-ameloblastos, podemos deduzir, que a redução na expressão do EGF nestas células causou alteração na diferenciação dos odontoblastos (Figuras 7b e 8b). Estes resultados vêm corroborar os achados de Guerrero²³ (1990) que evidenciou um retardo na calcificação da matriz dentinária do germe dentário ao 1,5^o dia pós-natal, associando esta alteração a uma inibição do álcool sobre a atuação do EGF na diferenciação das células mesenquimais em odontoblastos.

O nosso estudo mostrou a existência de uma relação entre a redução na expressão do EGF e a proliferação celular diminuída. Durante o 0 dia pós-natal, a região da coroa do germe dentário ainda em proliferação, foi localizada no epitélio interno do órgão do esmalte próximo à alça cervical. Nesta região observamos, que além da marcação ausente para o EGF, as células do epitélio interno do órgão do esmalte se apresentaram menos desenvolvidas, quando comparadas ao grupo controle, evidenciando a interferência do álcool sobre a imunoexpressão do EGF durante a proliferação celular (Figuras 9a e b). Esses achados vão ao encontro dos de Luo & Miller⁴¹ (1998), os quais demonstraram que a diminuição na proliferação dos neurônios e células da glia no SNC foi resultante da interferência do álcool com a ação reguladora dos fatores de crescimento (EGF, IGF-I). Campos & Duranza⁷ (1988) demonstraram a interferência da exposição materna de álcool sobre a proliferação celular, evidenciada por alterações nas células do epitélio interno do órgão do esmalte, nas fases de botão e capuz.

Ainda no período de 0 dia pós-natal, nossos dados mostraram, que a ingestão materna de álcool interferiu na imunoexpressão do EGF nas células do retículo estrelado. No grupo controle, a intensidade de marcação no retículo estrelado foi moderada, enquanto que no tratado a marcação mostrou-se fraca (Tabela 9). Uma vez que, a expressão do EGF nas células do retículo estrelado está relacionada com a diferenciação e metabolismo celular (Cam *et al.*⁵, 1990) podemos inferir, que a citodiferenciação do retículo estrelado, talvez tenha sido alterada pelo álcool. A longo prazo, isto poderia causar uma interferência no processo de erupção, tendo em vista a especulação, de que o retículo estrelado e o folículo dentário interagem entre si, no fim da fase de coroa e início da fase de raiz, para controlar a erupção dentária (Wise & Lin⁸⁵, 1995; Katchburian & Arana³³, 1999).

Segundo Warshawsky & Smith⁸⁰ (1974) e Ten Cate⁶⁷ (1989), dois eventos levam à formação do esmalte durante o período de deposição dos tecidos dentários, da futura coroa do dente. O primeiro, é a indução da diferenciação de pré-ameloblastos em ameloblastos secretores associada à deposição inicial da pré-dentina. O segundo evento, é a indução da secreção da matriz do esmalte pelos ameloblastos, para isto sendo necessária a mineralização inicial da dentina.

Nossos resultados demonstraram, que durante a formação do esmalte período do 4^o dia pós-natal, o EGF foi localizado na papila dentária, odontoblastos, ameloblastos secretores e retículo estrelado (Tabela 9 e Figura 10), estando estes achados, em concordância com os estudos referidos acima, bem como, com os de Wise *et al.*⁸⁶ (1992). Porém ao compararmos os dois grupos, foram encontradas diferenças na imunoexpressão do EGF e na morfologia do germe dentário nesse período. No grupo controle foi observada marcação forte, nos odontoblastos e ameloblastos secretores (Figura 12a), entretanto, no grupo tratado a marcação nestas mesmas estruturas foi moderada (Figura 12b). Esses resultados sugerem fortemente que a exposição materna ao álcool interferiu com o papel do EGF durante a formação do esmalte do 1^o molar inferior de ratos, provavelmente causando redução na espessura da matriz do esmalte, a qual pode ser melhor

visualizada na região do vértice da futura cúspide do germe dentário, no 4º dia pós-natal (Figuras 10a e b). Tanikawa & Bawden⁶⁶ (1999) estudando molares de ratos no 5º dia pós-natal, localizaram sítios de ligação para o EGF nos ameloblastos pré-secretóres, ameloblastos secretóres e odontoblastos. Cobo *et al.*¹² (1992) mostraram, no mesmo período, uma moderada marcação nos ameloblastos e odontoblastos, porém forte da dentina. Topham *et al.*^{72,73} (1987, 1988) notaram que o EGF induz rápida diferenciação e aumento na síntese protéica dos ameloblastos e odontoblastos. Sendo assim, de acordo com esses estudos, o EGF está envolvido na diferenciação dos pré-ameloblastos, ameloblastos e na indução da matriz do esmalte e da dentina.

Podemos deduzir, a partir do nosso estudo, que o tamanho do germe dentário foi reduzido no grupo tratado, quando comparado ao grupo controle, o que foi evidenciado pela diminuição na altura da cúspide lingual da coroa do germe dentário (Figuras 10a e b). Assim, nossos achados confirmam os resultados de Guerrero *et al.*²⁵ (1996), que observaram redução na imunoexpressão do EGF nos ameloblastos e no folículo dentário dos 1º molares inferiores de camundongos tratados com álcool e que os germes dentários deste grupo eram morfometricamente menores, quando comparado ao grupo controle.

Com relação ao retículo estrelado, no 4º dia pós-natal, os resultados mostraram moderada intensidade de marcação para o EGF, tanto no grupo controle, quanto no tratado (Tabela 9). Lin & Wise³⁹ (1993) verificaram que células do retículo estrelado, de molares de ratos ao 6º dia pós-natal, quando cultivadas na presença do EGF, apresentavam um aumento na expressão do mRNA do TGF- β 1 e na síntese deste fator de crescimento, o que estaria relacionado com os eventos iniciais da erupção dentária. A imunohistoquímica mostrou, que a maioria das células do retículo estrelado apresentava, em sua superfície, o receptor do EGF com intensidade de marcação variando entre moderada e forte. Esta heterogeneidade de marcação também foi observada, *in vivo*, por Wise *et al.*⁸⁶ (1992). Segundo este trabalho apenas algumas células mostraram moderada marcação para o EGF e EGFR.

Em adição à marcação nas células do órgão do esmalte e de acordo com prévios estudos, (Cho *et al.*⁹, 1988; Cobo *et al.*¹², 1992; Davideau *et al.*¹⁶, 1995) nós observamos marcação positiva para o EGF nas células osteogênicas do osso alveolar (Figura 12a). A presença de marcação nestas células sugere um papel do EGF sobre a formação óssea (Davideau *et al.*¹⁶, 1995). Sendo assim a redução na imunomarcação do EGF nas células osteogênicas, observada por nós no grupo tratado (Figura 12b), poderia evidenciar o efeito inibitório da ingestão materna de álcool, também sobre a formação do osso alveolar.

Segundo Katchburian & Arana³³ (1999) o estágio de maturação do esmalte é caracterizado pela existência de dois tipos morfológicos de ameloblastos, os de superfície distal lisa e os de superfície distal estriada. A presença simultânea desses dois grupos de ameloblastos e sua alternância é responsável pelos eventos cíclicos de remoção de elementos orgânicos e o influxo de íons para a matriz.

No 9º dia pós-natal, consideramos todos os ameloblastos do estágio de maturação como ameloblastos maduros. Estes não foram separados em dois grupos, visto que a morfologia dessas células não permitiu que afirmássemos com total certeza quais ameloblastos eram de superfície lisa ou de superfície estriada.

Sendo assim, no grupo controle, os ameloblastos maduros apresentaram-se com forte intensidade de marcação. Já a camada papilar adjacente à região basal destes ameloblastos mostrou intensidade fraca de marcação para o EGF (Figura 16a). Estes resultados também foram encontrados por Wise *et al.*⁸⁶ (1992), os quais estudaram a imunoexpressão do EGF e EGFR, em molares de ratos no 9º dia pós-natal verificando, que os ameloblastos maduros apresentavam intensidade de marcação mais forte para o EGF do que para o EGFR. Assim os autores acreditam, que o EGF localizado nestas células poderia estar tendo um papel na maturação do esmalte e, também exercendo um efeito parácrino sobre as células do folículo dentário durante o momento da fase pré-eruptiva do germe dentário. Pasetto *et al.*^{46,47}. (2003a, 2003b) verificaram, em incisivos de ratos adultos, moderada intensidade de marcação do EGF na camada

papilar e forte nos ameloblastos maduros. Talvez a diferença em relação à intensidade de marcação na camada papilar entre o nosso estudo e o feito por Pasetto *et al.* (2003), se deva ao tipo de dentição utilizada (molar vs incisivo).

Davideau *et al.*¹⁶ (1995) observaram alta concentração de EGFR nos osteoblastos e em alguns osteócitos durante o processo de mineralização do tecido ósseo da mandíbula de fetos humanos e de ratos. Outras células, totalmente diferenciadas, tais como as células epiteliais dos túbulos contorcidos do rim (Warden,⁷⁸ 1993) e ameloblastos no estágio de maturação (Martineau-Doizé *et al.*⁴², 1991), também apresentaram marcação forte para o EGFR. Estas células estão envolvidas com trocas iônicas, as quais são moduladas pelo EGF. Sendo assim, os autores concluíram, que o EGF contribui para a mineralização do esmalte e osso.

Em nossa pesquisa, encontramos diferenças, entre os grupos, na intensidade de marcação do EGF, nos ameloblastos maduros e na camada papilar. No grupo tratado observamos, que a ingestão materna de álcool parece ter afetado mais os ameloblastos maduros, já que estes apresentaram marcação ausente quando comparados à marcação forte no grupo controle ao 9º dia pós natal. Na camada papilar não houve marcação no grupo tratado, enquanto que o grupo controle apresentou fraca marcação (Figuras 16a e b).

A intensidade dos efeitos do álcool sobre as células durante a formação dos tecidos parece não ser semelhante em todas elas. Os ameloblastos em fase de maturação do esmalte, são células, que parecem ter um metabolismo bastante complexo. Segundo Luo & Miller⁴¹ (1998) a sensibilidade diferencial das células ao álcool está relacionada com a resposta celular aos fatores de crescimento, durante determinadas funções. As células que são ativamente reguladas pelo EGF e portanto, em intensa atividade metabólica são as mais suscetíveis durante o período de exposição materna ao álcool. Sendo assim podemos considerar, que os ameloblastos maduros foram as células mais dependentes do EGF o que pode explicar o fato de terem sido mais afetadas pelo álcool ingerido na gestação. Estes autores acreditam, que a interferência do álcool com a ação dos fatores de

crescimento pode ocorrer: 1) na produção do fator de crescimento (ligante) 2) na expressão do receptor e/ou 3) no processo de transdução do sinal da superfície celular para o citosol e finalmente para o núcleo. Wang *et al.*⁷⁷ (1991) mostraram que o álcool reduziu a ligação do EGF ao seu receptor na membrana plasmática das células da mucosa bucal de ratos, via modificação na estrutura do receptor, conseqüentemente, inibindo a atividade de tirosinoquinase do receptor e continuação da “cascata” de sinais que vão induzir à uma determinada resposta celular. O'Rourke *et al.*⁴³ (1997), estudando fígado de ratos expostos cronicamente ao álcool verificaram que a ligação do EGF ao seu receptor estava reduzida, porém o conteúdo dos receptores na superfície da membrana estava normal. Isto significou que o álcool promoveu um acúmulo de receptores inativos na superfície dos hepatócitos.

Nossos resultados demonstraram que o alcoolismo na gestação, reduziu a imunoexpressão do EGF no germe dentário do 1º molar inferior durante todos os estágios da amelogênese estudados. Entretanto, não podemos afirmar, se essa alteração causada pela ingestão materna de álcool foi em nível da produção do EGF (ligante) ou na expressão do EGFR. Estudos futuros com metodologia específica para quantificação do mRNA do EGF e do EGFR poderão complementar os resultados obtidos nesta pesquisa, visando o esclarecimento de como o alcoolismo materno atua sobre a redução do EGF durante o período da amelogênese.

Entretanto, em vista do exposto acreditamos que nosso trabalho vem contribuir para a elucidação do mecanismo de ação do álcool sobre a formação do dente, especificamente sobre a amelogênese podendo ser extrapolado para a formação de outros órgãos, tais como, glândula submandibular, rim, pulmão e pele. A exemplo do dente, a formação desses órgãos, também é dependente de interações epitélio-mesênquima, as quais são mediadas, entre outros, pelo Fator de Crescimento Epidermal (EGF).

7. CONCLUSÕES

Dentro das condições experimentais deste trabalho, com base nos resultados obtidos, concluiu-se que:

1 – O consumo materno de álcool, reduziu o ganho de peso das ratas somente durante a gestação, entretanto sem alterar a efetividade da mesma e interferiu com o desenvolvimento dos filhotes, aos 0, 4° e 9° dias pós-natal.

2 – O álcool interferiu com a expressão do EGF durante os estágios iniciais da dentinogênese e amelogênese e na secreção e maturação do esmalte, provavelmente causando alteração também em suas formações.

3 – Os efeitos da exposição materna ao álcool, foram mais acentuados sobre a imunoexpressão do EGF nas células do epitélio interno do órgão do esmalte e pré-ameloblastos, no 0 dia pós-natal, e também nos ameloblastos em maturação, no 9° dia pós-natal.

REFERÊNCIAS*

1. Araújo CSA, Graner E, Almeida OP, Sauk JJ, Coletta RD. Histomorphometric characteristics and expression of epidermal growth factor and its receptor by epithelial cells of normal gingival and hereditary gingival fibromatosis. **J Periodontal Res.** 2003; 38(3): 237-41.
2. Armant DR, Saunders DE. Exposure of embryonic cells to alcohol: contrasting effects during preimplantation and postimplantation development. **Semin Perinatol.** 1996; 20(2): 127-39
3. Autti-Rämö I, Gaily E, Granström ML. Dysmorphic features in offspring of alcoholic mothers. **Arch Dis Child.** 1992; 67(6): 712-6.
4. Bennett NT, Schultz GS. Growth factors and wound healing. **Am J Surg.** 1993; 165(6): 728-37.
5. Cam Y, Neumann MR, Ruch JV. Immunolocalization of transforming growth factor β 1 and epidermal growth factor receptor epitopes in mouse incisors and molars with a demonstration of in vitro production of transforming activity. **Archs Oral Biol.** 1990; 35(10): 813-22.
6. Campana AO, Burini RC, Outa AY, Camargo JLV. Experimental protein deficiency in adult rats. **Rev Bras Pesqui Med Biol.** 1975; 8(3-4): 221-6.
7. Campos RM, Duranza MC. Efectos del consumo prolongado de etanol sobre las etapas tempranas del desarrollo dentario en ratones. **Rev Cubana Invest Biomed.** 1988; 7: 30-5.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline

8. Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *Annu Rev Biochem.* 1979; 265(14): 193-216.
9. Cho MI, Lee YL, Garant PR. Radioautographic demonstration of receptors for epidermal growth factor in various cells of the oral cavity. *Anat Rec.* 1988; 222: 191-200.
10. 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): 227-37.
11. Clarren SK, Smith DS. The fetal alcohol syndrome. *New Engl J Med.* 1978; 298(19): 1063-7.
12. Cobo J, Hernández LC, Del Valle ME, Vijande M, Vega JA. Immunohistochemical localization of epidermal growth factor and its receptor during odontogenesis in the rat. *Eur J Orthod.* 1992; 14:333-8.
13. Cohen S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the newborn animal. *J Biol Chem.* 1962; 237: 1555-62.
14. Coles, C.D. Impact of prenatal alcohol exposure on the newborn and the child. *Clin Obstet Gynecol.* 1993; 36(2): 255-66.
15. Costa LG, Guizzetti M, Lu H, Bordi F, Vitalone A, Tita B *et al.* Intracellular signal transduction pathways as targets for neurotoxicants. *Toxicology.* 2001; 160: 19-26.

16. Davideau JL, Sahlberg C, Thesleff I, Berdal A. EGF receptor expression in mineralized tissues: An in situ hybridization and immunocytochemical investigation in rat and human mandibles. **Connect Tissue Res**. 1995; 32(1-4): 47-53.
17. Edwards HG, Dow-Edwards DL. Craniofacial alterations in adult rats prenatally exposed to ethanol. **Teratology**. 1991; 44(4): 373-8.
18. Garcia JM, Ananthakrishnan R, Goldenthal MJ. Mitochondrial dysfunction after fetal alcohol exposure. **Alcohol Clin Exp Res**. 1996; 20(6): 1029-32.
19. 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: 211-6.
20. Gresik EW, Kashimata M, Kadoya Y, Yamashina S. The EGF system in fetal development. **Eur J Morphol**. 1998; 36 Suppl: 92-7.
21. Grinfeld H, Goldenberg S, Segre CAM, Chadi G. Effects of ethanol on offspring of C57BL/6J mice alcoholized during gestation. **Acta Cir Bras**. 1999 Jul-Sept; 14(3). Disponível em: URL: <http://www.scielo.br/acb>.
22. Guajardo G, Okamoto Y, Gogen H, Shanfeld JL, Dobeck J, Herring AH et al. Immunohistochemical localization of epidermal growth factor in cat parodontal tissues during tooth movement. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**. 2000; 118: 210-9.
23. Guerrero JCH. Morphologic effects of maternal alcohol intake on skull, mandible and tooth of the offspring in mice. **Jpn J Oral Biol**. 1990; 32: 460-9.

24. Guerrero JCH, Montes CL, Rodriguez PL. Effects of maternal ethanol intake on second alcoholic generation murine skull and mandibular size. **Arch Med Res**. 1998; 29(4): 297-302.
25. Guerrero JCH, Robertson JP, Montes CL, Ponce Bravo S, Gómez AM, Rivera MA. Immunoexpression of epidermal growth factor in odontogenesis of the offspring of alcoholic mice. **Bol Estud Med Biol**. 1996; 44: 25-35.
26. Henderson GI, Chen JJ, Schenker S. Ethanol, oxidative stress, reactive aldehydes, and the fetus. **Front Biosci**. 1999; 15(4): 541-50.
27. Henderson GI, Baskin GS, Horbach J, Porter P, Schenker S. Arrest of epidermal growth factor-dependent growth in fetal hepatocytes after ethanol exposure. **J Clin Invest**. 1989; 84: 1287-94
28. Herrera E, Knopp RH, Freinkel N. Carbohydrate metabolism in pregnancy. **J Clin Invest**. 1969; 48: 2260-72.
29. Jackson IT, Hussain K. Craniofacial and oral manifestations of fetal alcohol syndrome. **Plast Reconstr Surg**. 1990; 85(4): 505-12.
30. Jones KL, Smith DW, Ulleland CN, Streissguth AP. Pattern of malformations in offspring of chronic alcoholic mothers. **Lancet**. 1973; 1: 1267-71.
31. Kamei Y, Tsutsumi O, Kuwabara Y, Taketani Y. Intrauterine growth retardation and fetal losses are caused by epidermal growth factor deficiency in mice. **Am J Physiol**. 1993; 264: R594-600.

32. Karnovsky MJ. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **J Cell Biol.** 1965; 27: 137-8.
33. Katchburian E, Arana V. **Histologia e embriologia oral.** São Paulo: Panamericana, 1999.
34. Lee M, Leichter J. Effect of litter size on the physical growth and maturation of the offspring of rats given alcohol during gestation. **Growth.** 1980; 44: 327-35.
35. Lehninger AL. **Princípios de Bioquímica.** São Paulo: Sarvier; 1991. p. 543-4. *Apud* Coelho ICG. **Estrutura e ultraestrutura da próstata ventral e vesícula seminal de camundongos isogênicos (C57B16/J) submetidos a ingestão crônica de álcool** [dissertação]. Campinas: Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas; 2000.
36. Leichter J, Lee M. Effect of maternal ethanol administration on physical growth of the offspring in rats. **Growth.** 1979; 43:288-97.
37. Lemoine P, Harousseau H, Borteyru JP. Les enfants de parents alcooliques: anomalies observées. **Quest Med.** 1968; 25: 476-82.
38. Lieber CS. Alcohol-nutrition interaction. **Alcohol.** 1984; 1: 151-7.
39. Lin F, Wise GE. Effect of epidermal growth factor on expression of transforming growth factor-beta 1 mRNA in stellate reticulum cells of rat mandibular molars. **Dev Dyn.** 1993 Sep; 198(1): 22-7.

40. Ludena MC, Mena MA, Salinas M, Herrera E. Effects of alcohol ingestion in the pregnant rat on daily food intake, offspring growth and metabolic parameters. **Gen Pharmac.** 1983; 14(3): 327-32.
41. Luo J, Miller MW. Growth factor-mediated neural proliferation: target of ethanol toxicity. **Brain Res Brain Res Rev.** 1998; 27(2): 157-67.
42. Martineau-Doizé B, Warshawsky K, Dickson K, Lai WH, Bergeron JJM. Localization of epidermal growth factor receptors in cells of the enamel organ of the rat incisor. **Dev Biol.** 1991; 148: 590-601.
43. O'Rourke MF, Tuma DJ, Casey CA. Decreased binding and autophosphorylation of the epidermal growth factor receptor in ethanol-fed rats. **Biochem J.** 1997; 53: 1445-50.
44. Othman T, Legare D, Sadri P, Lutt WW, Parkinson FE. A preliminary investigation of the effects of maternal ethanol intake during gestation and lactation on brain adenosine A(1) receptor expression in rat offspring. **Neurotoxicol Teratol.** 2002; 24(2): 275-9. [abstract].
45. Partanen AM, Thesleff I. Localization and quantitation of ¹²⁵I-epidermal growth factor binding in mouse embryonic tooth and other embryonic tissues at different developmental stages. **Dev Biol.** 1987; 120(1): 186-97.
46. Pasetto S, Novaes PD, Romani EAN, Barbosa SCP, Sant'Anna LB. Immunolocalization of EGF, TGF – beta1 and CSF – 1 in the periodontum of lower incisor of rats. In: **Anais do XIX Congresso da Sociedade de Microscopia e Microanálise.** 2003, Caxambu: SBMM; 2003a. 1 CD-ROM.

47. Pasetto S, Romani EAN, Barbosa SCP, Salmon CR; Sant'Anna LB; Novaes PD. Distribuição do egf, egf-r e tgf- β 1 no periodonto de incisivos inferiores de ratos. *In: Anais da 20ª Reunião da Sociedade Brasileira de Pesquisas Odontológicas*. 2003, Águas de Lindóia: SBPqO; 2003b. p.173.
48. Raymond E, Faivre S, Armand JP. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase as a target for anticancer therapy. *Drugs*. 2000; 60 Suppl 1: 15-23.
49. Rifas L, Towler DA, Avioli LV. Gestational exposure to ethanol supresses msx 2 expression in developing mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94(14): 7549-54.
50. Römert P, Matthiessen ME. Changes of secretory ameloblasts in mini-pig fetuses exposed to ethanol in vivo. *J Den Res*. 1988; 67(11): 1402-4.
51. Saad AY. Postnatal effects of nicotine on first molar development in the CD-1 mouse. *Acta Anat*. 1991; 140:269-72.
52. Sant' Anna LB. **Efeitos do álcool etílico sobre a amelogênese de molares inferiores de ratos, durante o período gestacional** [dissertação]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade de Campinas; 2001.
53. Sant' Anna LB, Tosello DO, Salgado MAC. Efectos del alcohol etílico sobre la amelogênese del primer molar de ratones. *Gaceta Méd Bilbao*. 2001; 98: 54-4.

54. Saso K, Moehren G, Higashi K, Hoek JB. Differential inhibition of epidermal growth factor signaling pathways in rat hepatocytes by long-term ethanol treatment. **Gastroenterology**. 1997; 112(6): 2073-88.
55. Schour I, Massler M. The teeth. In Farris EJ, Griffith JQJR. **Rat in laboratory investigation**. 2.ed. New York: Hafner Publishing; 1971. p.105-35.
56. Shore RC, Kolokuris I, Robinson C, Kirkham J. Immunohistochemical investigation of epidermal growth factor receptor expression during periods of accelerated rat incisor eruption. **Arch Oral Biol**. 1992; 37(5): 389-93.
57. Shum L, Sakakura Y, Bringas P Jr, Luo W, Snead ML, Mayo M *et al*. EGF abrogation-induced fusilli-form dysmorphogenesis of Meckel's cartilage during embryonic mouse mandibular morphogenesis in vitro. **Development**. 1993; 118(3): 903-17.
58. Silva KC, Oliveira MVM, Sant' Anna LB, Salgado MAC. Efeitos do álcool sobre o desenvolvimento pós-eruptivo de dentes incisivos de ratos. *In: Anais da 13ª Jornada Acadêmica Cervantes Jardim*, 1999. São José dos Campos. São Paulo: p. 50.
59. Singh SP, Ehmann S, Snyder AK. Ethanol-induced changes in insulin-like growth factors and IGF gene expression in the fetal brain. **Proc Soc Exp Biol Med**. 1996; 212(4): 349-54.
60. Singh SP, Srivenugopal KS, Ehmann S, Yuan XH, Snyder AK. Insulin-like growth factors (IGF-I and IGF-II), IGF-binding proteins, and IGF gene expression in the offspring of ethanol-fed rats. **J Lab Clin Med**. 1994; 124(2): 183-92.

61. Singhal PC, Reddy K, Ding G, Kapasi A, Franki N, Ranjan R *et al.* Ethanol-induced macrophage apoptosis: the role of TGF-beta. **J Immunol.** 1999; 162(5): 3031-6.
62. Snead ML, Luo W, Oliver P, Nakamura M, Don-Wheeler G, Bessem C *et al.* Localization of epidermal growth factor precursor in tooth and lung during embryonic mouse development. **Dev Biol.** 1989; 134(2): 420-9.
63. Streissguth AP, Aase JM, Clarren SK, Randels SP, LaDue RA, Smith DF. Fetal alcohol syndrome in adolescents and adults. **JAMA.** 1991; 265(15): 1961-7.
64. Sulik KK, Johnston MC. Sequence of developmental alterations following acute ethanol exposure in mice: craniofacial features of the fetal alcohol syndrome. **Am J Anat.** 1983; 166(3): 257-69.
65. Sulik KK, Johnston MC, Webb MA. Fetal alcohol syndrome: embryogenesis in a mouse model. **Science.** 1981; 214(4523): 936-8.
66. Tanikawa Y, Bawden JW. The immunohistochemical localization of phospholipase Cgamma and the epidermal growth-factor, platelet-derived growth-factor and fibroblast growth-factor receptors in the cells of the rat molar enamel organ during early amelogenesis. **Arch Oral Biol.** 1999; 44(9): 771-80.
67. Ten Cate AR. **Histologia bucal: desenvolvimento, estrutura e função.** 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.
68. Thesleff I. Does epidermal growth factor control tooth eruption? **ASDC J Dent Child.** 1987; 54(5): 321-9.

69. Thesleff I, Partanen AM, Rihniemi L. Localization of epidermal growth factor receptors in mouse incisors and human premolars during eruption. ***Eur J Orthod***. 1987; 9(1): 24-32.
70. Thesleff I, Vaahtokari A, Partanen AM. Regulation of organogenesis. Common molecular mechanisms regulating the development of teeth and other organs. ***Int J Dev Biol***. 1995; 39(1): 35-50. *Apud* Partanen AM, Alaluusua S, Miettinen PJ, Thesleff I, Tuomisto J, Pohjanvirta R *et al*. Epidermal growth factor receptor as a mediator of developmental toxicity of dioxin in mouse embryonic teeth. ***Lab Invest***. 1998; 78(12): 1473-81.
71. Tomazela SA, Salgado MAC, Arãna VE. Efeitos do álcool etílico no desenvolvimento dos incisivos de ratos. *In: Anais da 14º Reunião da Sociedade Brasileira de Pesquisas Odontológicas*. 1997, Águas de São Pedro. São Paulo: SBPqO;1997. p.69. [Resumo 128].
72. Topham RT, Chiego DJ Jr, Gattone VH 2nd, Hinton DA, Klein RM. The effect of epidermal growth factor on neonatal incisor differentiation in the mouse. ***Dev Biol***. 1987; 124(2): 532-43.
73. Topham RT, Chiego DJ Jr, Smith AJ, Hinton DA, Gattone VH 2 nd, Klein RM. Effects of epidermal growth factor on tooth differentiation and eruption. *In: Davidovitch Z, editor. The Biological mechanisms of tooth eruption and root resorption*. Birmingham: ESCO Media, 1988. p.117-31.
74. Tosello DO, Sant' Anna LB, Salgado MAC. Efectos del alcohol etílico sobre la dentinogénesis del primer molar de ratones. ***Gaceta Méd Bilbao***. 2001; 98: 54-4.

75. Vuorela P, Sarkola T, Alfthan H, Halmesmaki E. Hepatocyte growth factor, epidermal growth factor and placenta growth factor concentrations in peripheral blood of pregnant women with alcohol abuse. ***Alcohol Clin Exp Res.*** 2002; 26(5): 682-7. [abstract].
76. Wang SL, Jacober L, Wu-Wang CY, Slomiany A, Slomiany BL. Ethanol-induced structural and functional alterations of epidermal growth factor receptor in buccal mucosa. ***Int J Biochem.*** 1992; 24(1): 85-90.
77. Wang SL, Jacober L, Wu-Wang CY, Liu J, Slomiany A, Slomiany BL. Effect of ethanol on epidermal growth factor receptor in buccal mucosa. ***Biomed Biochim Acta.*** 1991; 50(7): 879-84.
78. Warden DH, Stokes JB. EGF and PGE2 inhibit rabbit CCD Na⁺ transport by different mechanisms: PGE2 inhibits Na(+)-K⁺ pump. ***Am J Physiol.*** 1993; 264(4 Pt 2): F670-7.
79. Warshawsky H, Moore G. A technique for the fixation and the decalcification of rat incisors for electron microscopy. ***J Histochem Cytochem.*** 1967; 15(9): 542-9.
80. Warshawsky H, Smith CE. Morphological classification of rat incisor ameloblasts. ***The Anat Rec.*** 1974; 179(4): 424-45
81. Webster WS, Walsh DA, McEwen SE, Lipson AH. Some teratogenic properties of ethanol and acetaldehyde in C57BL/6J mice: implications for the study of the fetal alcohol syndrome. ***Teratology.*** 1983; 27(2): 231-43.
82. Weinberg J. Effects of ethanol and maternal nutritional status on fetal development. ***Alcohol Clin Exp Res.*** 1985; 9(1): 49-55.

83. Westergaard J. Structural changes induced by tetracycline in secretory ameloblasts in young rats. **Scand J Dent Res**. 1980; 88(6): 481-95.
84. Wimalasena J. Ethanol has direct effects on human choriocarcinoma cell steroid hormone secretion. **Alcohol Clin Exp Res**. 1994; 18(2): 369-74. [abstract].
85. Wise GE, Lin F. The molecular biology of initiation of tooth eruption. **J Dent Res**. 1995 Jan; 74(1): 303-6
86. Wise GE, Lin F, Fan W. Localization of epidermal growth factor and its receptor in mandibular molars of the rat prior to and during prefunctional tooth eruption. **Dev Dyn**. 1992; 195(2): 121-6.
87. Zhang BH, Farrell GC. Chronic ethanol consumption disrupts complexation between EGF receptor and phospholipase C-gamma1: relevance to impaired hepatocyte proliferation. **Biochem Biophys Res Commun**. 1999; 257(1): 89-94.
88. Zhou FC, Sari Y, Zhang JK, Goodlett CR, Li T. Prenatal alcohol exposure retards the migration and development of serotonin neurons in fetal C57BL mice. **Brain Res Dev Brain Res**. 2001; 126(2): 147-55.

ANEXO

Tabela 10

Média e desvio padrão do peso corpóreo (g) de ratas adultas jovens dos grupos controle e tratado em cada semana do período de pré-gestação.

	Controle (n=10)	Tratado (n=18)
1 ^a - 1%	185,78±11,66	186,60±13,71
2 ^a - 5%	190,50±8,07	199,56±13,73*
3 ^a - 10%	193,61±10,06	206,51±13,51*
4 ^a - 15%	194,14±12,00	203,55±14,38
5 ^a - 20%	215,02±17,69	207,77±13,85
6 ^a - 25%	219,32±18,73	212,86±15,09

Tabela 11

Média e desvio padrão do peso corpóreo (g) de ratas adultas jovens dos grupos controle e tratado em cada semana do período de gestação.

	Controle (n=6)	Tratado (n=10)
1 ^a - 25%	244,95±21,70	217,21±17,41*
2 ^a - 25%	264,48±23,11	231,46±24,94*
3 ^a - 25%	310,98±30,72	263,53±18,99*

