

LUCIANA BARROS SANT'ANNA

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

***EFEITOS DO ÁLCOOL ETÍLICO SOBRE A
AMELOGÊNESE DE MOLARES INFERIORES DE RATOS,
DURANTE O PERÍODO GESTACIONAL.***

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Biologia e Patologia Buco-Dental.

PIRACICABA
2001

666770C

LUCIANA BARROS SANT'ANNA

**EFEITOS DO ÁLCOOL ETÍLICO SOBRE A
AMELOGÊNESE DE MOLARES INFERIORES DE RATOS,
DURANTE O PERÍODO GESTACIONAL**

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CPG-036/83
CPG, 19/04/01
Assinatura do Orientador

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Biologia e patologia Buco-Dental.

Orientadora: Profa.Dra.Darcy de Oliveira Tosello

Banca Examinadora:
Profa. Dra. Darcy de Oliveira Tosello
Prof. Dr. Miguel Angel Castillo Salgado
Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line

PIRACICABA
2001

Ficha Catalográfica

Sa59e Sant'anna, Luciana Barros.
Efeitos do álcool etílico sobre a amelogênese de molares inferiores de ratos, durante o período gestacional. / Luciana Barros Sant'anna. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2001.
xxiv, 108p. : il.

Orientadora : Prof^a Dr^a Darcy de Oliveira Tosello.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Histologia dentária. 2. Microscopia. 3. Esmalte. 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 MESTRADO, em sessão pública realizada em 06 de Fevereiro de 2001, considerou a candidata LUCIANA BARROS SANT'ANNA aprovada.

1. Profa. Dra. DARCY DE OLIVEIRA TOSELLO

Handwritten signature of Darcy de Oliveira Tosello in cursive script, written over a horizontal line.

2. Prof. Dr. MIGUEL ANGEL CASTILLO SALGADO

Handwritten signature of Miguel Angel Castillo Salgado in cursive script, written over a horizontal line.

3. Prof. Dr. SERGIO ROBERTO PERES LINE

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho,

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

Ao Nilson meu esposo, companheiro constante, cuja paciência, compreensão e estímulo foram imprescindíveis para a realização desse trabalho.

À minha sogra Shirley Mussupapa Sant'Anna, pelo esforço e amor sem medidas nos momentos mais difíceis.

Aos meus filhos Pedro Miguel e Felipe, razão da minha vida e fruto do amor puro e verdadeiro.

À Profa. Dra. Darcy de Oliveira Tosello

“Na atividade da vida que mais importa não são o valor e a perfeição material das obras, mas a grandeza do amor com que as realizamos.”

Frei Anselmo

O meu sincero agradecimento pela oportunidade, pela confiança em mim depositada, pela compreensão das minhas dificuldades principalmente no início do curso, pelos conhecimentos transmitidos com inteligência e decisão, contribuindo sobremaneira para a minha iniciação científica. Muito obrigada, também pela amizade.

Ao Prof. Dr. Miguel Angel Castillo Salgado

“A terra não é uma simples passagem para o céu, mas a arena onde, através da luta, se conquista a eternidade feliz.”

Frei Anselmo

Pela sua grande capacidade de transmissão de conhecimentos científicos e de vida, pela atenção dispensada durante o decorrer do trabalho, pelo incentivo constante na minha carreira e ingresso no magistério, meu sincero agradecimento.

A DEUS, pela fé e coragem, provendo-me forças para superar todos os obstáculos.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP, na pessoa de seu DD. Diretor Professor Doutor ANTÔNIO WILSON SALLUM, pelas condições oferecidas para a realização desse curso de pós-graduação.

Aos professores do curso de mestrado, sou grata pelos ensinamentos preciosos e bons exemplos durante essa caminhada.

Ao Professor Doutor JOSÉ MERZEL, professor titular convidado da área de histologia do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, pela atenção e sugestões apresentadas e pela orientação durante a realização da análise histomorfométrica.

Ao Professor Doutor PEDRO DUARTE NOVAES, professor doutor assistente da área de histologia do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba -UNICAMP, por dedicar parte do seu tempo precioso durante o preparo cirúrgico dos animais e pelas orientações fornecidas na realização das fotografias das lâminas histológicas desse trabalho.

Ao Professor Doutor LUIS CARLOS JUNQUEIRA, professor emérito da Universidade de São Paulo, por ter compartilhado seus valiosos conhecimentos

científicos na área da histologia, os quais foram decisivos para a continuidade desse trabalho.

À Professora Doutora GLAUCIA M. BOVI AMBROSANO, professora assistente doutora 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 preparo dos cortes histológicos.

Às técnicas IVANI ODAS DEMÉTRIO e MARIA APARECIDA SANTIAGO VARELLA do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, que foram muito atenciosas e prestativas durante o desenvolvimento da fase laboratorial.

À bibliotecária MARILENE GIRELLO, funcionária da biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, pelo valioso auxílio na elaboração desse trabalho.

Aos amigos e colegas do curso de mestrado, pela amizade e companheirismo que tivemos durante esse período de formação, principalmente à ESTELA e ao MESSIAS, os quais proporcionaram-me uma agradável estadia em suas residências no período que fiquei em Piracicaba.

À VALÉRIA ABRANTES PINHEIRO CAVALHO, pelas alegrias e dificuldades vividas juntas nesses anos de convivência.

Ao departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia do campus de São José dos Campos – UNESP “Júlio de Mesquita Filho”, pela utilização do laboratório de histologia e pelo carinho com que sempre fui recebida nessa unidade.

Ao técnico WALTER CRUZ do laboratório de histologia do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia do campus de São José dos Campos – UNESP “Júlio de Mesquita Filho”, pela ajuda prestada no preparo dos animais.

Aos funcionários do biotério da Faculdade de Odontologia do campus de São José dos Campos – UNESP “Júlio de Mesquita Filho”, Sr LOURIVAL JACOB e Sr. ANTÔNIO DOMINGOS SÁVIO BARBOSA MAIA VASCONCELLOS, pela ajuda na manipulação e tratamento dos animais.

À todas as pessoas que contribuíram para a realização desse trabalho, direta ou indiretamente, meu sincero agradecimento.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro indispensável à realização das atividades científicas (Processo nº830516/98-0).

*Há um tempo para tudo e um momento
sob o céu para fazer cada coisa:
há um tempo para nascer e outro para morrer;
um tempo para plantar
e um tempo para colher.
Um tempo para matar e outro para curar,
um tempo para destruir
e um tempo para construir.
Um tempo para chorar e outro para rir;
um tempo para os lamentos
e um tempo para as danças.
Um tempo para espalhar pedras
e outro para recolhê-las;
um tempo para abraçar-se e outro para separar-se.
Um tempo para ganhar e outro para perder;
um tempo para calar e outro para falar.
Um tempo para amar e outro para odiar;
um tempo para a guerra e um tempo para a paz.*

Eclesiastes 3, 1-8

SUMÁRIO

LISTAS	1
RESUMO	6
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 Estudos clínicos	15
2.2 Estudos experimentais.....	20
2.2.1 Efeitos do álcool sobre as células.....	20
2.2.2 Efeitos do álcool sobre o germe dentário.....	29
3. PROPOSIÇÃO	33
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
5. RESULTADOS	45
5.1 Parâmetros do desenvolvimento	45
5.1.1 Desenvolvimento das ratas no período de tratamento.....	45
5.1.2 Desenvolvimento dos filhotes.....	50
5.2 Desenvolvimento dental.....	53
5.2.1 Aspectos histológicos.....	53
5.2.2 Aspectos histomorfométricos	62

6. DISCUSSÃO	65
7. CONCLUSÕES	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
ANEXO.....	87

LISTAS

1. Lista de Abreviaturas

ad libitum = à vontade

et al = e outros

in vitro = em laboratório

in vivo = em tecido vivo

ADH= álcool desidrogenase

ALDH= acetil desidrogenase

ATM = Articulação têmporo-mandibular

ATP= Adenosina trifosfato

ARBD = Defeitos congênitos relacionados à exposição pré-natal ao álcool

DNA = Ácido desoxiribonucleico

EDTA = Ácido etileno diamino tetracético

EGF = Fator de crescimento epidermal

FAE= Efeitos alcoólicos fetais

Fig = Figura

IGF-I = Fator de crescimento semelhante à insulina-I

RNA = Ácido ribonucleico

SFA= Síndrome fetal alcoólica

SNC = Sistema nervoso central

Tab = Tabela

V_{vi} = densidade de volume de uma determinada estrutura no tecido

V_{ve} = densidade de volume da matriz de esmalte em relação ao germe dentário

V_{vg} = densidade de volume do germe dentário em relação à área teste

x = vezes (aumento)

2. Lista de Figuras

- Figura 1 – Hemimandíbula com germe dentário do 1º molar de ratos no 5º dia de vida mostrando a direção e localização dos cortes (a e b). 47
- Figura 2 – Germe dentário do 1º molar inferior sobreposto pelo retículo usado para morfometria. A área teste é composta de 70 pontos, cada um equivalendo na ampliação utilizada a $8 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ 48
- Figura 3 – Médias do consumo de água (ml) e da solução alcoólica (ml) de ratas adultas jovens dos grupos controle e tratado em cada semana do período de tratamento..... 52
- Figura 4 – Médias do peso corpóreo (g) de ratas adultas jovens dos grupos controle e tratado em cada semana do período de tratamento 53
- Figura 5 – Médias do peso corpóreo (g) de filhotes de ratas dos grupos controle e tratado..... 56
- Figura 6 – Médias do comprimento (mm) crânio-caudal de filhotes de ratas dos grupos controle e tratado 57
- Figura 7 – Fotomicrografia do germe dentário do 1º molar inferior de ratos no 5º dia de vida com todos seus elementos característicos da fase inicial de coroa. A - Grupo controle B – Grupo tratado. Esmalte (E); dentina (D) e polpa (P). Azul de toluidina. Aumento original: 63x..... 60
- Figura 8 – Fotomicrografia da região da vertente lingual do germe dentário. A - Grupo controle B – Grupo tratado. Ameloblastos (AM); esmalte (E); dentina (D); pré dentina (PD); odontoblastos (O); polpa (P) com vasos sanguíneos (setas). Azul de toluidina. Aumento original: 100x..... 61

- Figura 9 – Fotomicrografia da região da vertente lingual do germe dentário.
 A - Grupo controle B – Grupo tratado. Esmalte (E); ameloblastos (AM);
 prolongamentos dos ameloblastos (P) irregulares (P) e barras
 terminais (setas). Azul de toluidina. Aumento original 1000x..... 62
- Figura 10 – Fotomicrografia da região da vertente lingual do germe dentário.
 A - Grupo controle B – Grupo tratado. Ameloblastos (AM);
 prolongamentos dos ameloblastos (P) irregulares dos; grânulos no
 citoplasma apical (cabeça de setas); vacúolos (*) e barras terminais
 (setas). Azul de toluidina. Aumento original: 1000x 63
- Figura 11 – Fotomicrografia da região intercuspídia do germe dentário.
 A - Grupo controle B – Grupo tratado. Esmalte (E); ameloblastos (AM);
 prolongamentos dos ameloblastos (P) paralelos entre si. Azul de
 toluidina. Aumento original: 1000x..... 64
- Figura 12 – Fotomicrografia da região da vertente lingual do germe dentário.
 A - Grupo controle B – Grupo tratado. Esmalte (E); ameloblastos (AM);
 estrato intermédio (EI) e barras terminais (setas). Azul de toluidina.
 Aumento original: 1000x..... 65
- Figura 13 – Fotomicrografia da região oclusal do germe dentário.
 A - Grupo controle B – Grupo tratado. Retículo estrelado (RE);
 macrófagos (cabeça de setas); vasos sanguíneos (*); estrato
 intermédio (EI) e ameloblastos (AM) Azul de toluidina. Aumento
 original: 1000x..... 66
- Figura 14 – Médias e desvio padrão da densidade de volume ($\mu\text{m}^3 / \mu\text{m}^3$) da matriz
 do esmalte e do germe dentário dos filhotes com 5 dias de vida dos
 grupos controle e tratado67

3. Lista de Tabelas

Tabela 1 – Médias do consumo de água (ml) e da solução alcoólica(ml) de ratas adultas jovens dos grupos controle e tratado em cada semana do período de tratamento.....	51
Tabela 2 – Médias do peso corpóreo (g) de ratas adultas jovens dos grupos controle e tratado em cada semana do período de tratamento.....	53
Tabela 3 – Resultados do período de pós fertilização.....	54
Tabela 4 – Médias e desvio padrão do peso (g) de filhotes de ratas dos grupos controle e tratado.....	55
Tabela 5 – Médias e desvio padrão do comprimento (mm) de filhotes de ratas dos grupos controle e tratado.....	57
Tabela 6 – Médias e desvio padrão da densidade de volume ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$) da matriz de esmalte e germe dentário dos filhotes com 5 dias de vida dos grupos controle e tratado.....	68

RESUMO

O álcool, quando consumido em doses elevadas durante a gestação pode causar malformações congênitas no feto, dentre as quais defeitos craniofaciais e orodentais, decorrentes de interferências no desenvolvimento embrionário normal. Várias formas de perturbações celulares têm sido associadas com a ingestão de álcool durante a gravidez, porém poucos estudos têm se voltado para as alterações que podem ocorrer nas células secretoras do esmalte durante o período da odontogênese. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi analisar os efeitos do álcool etílico sobre o desenvolvimento do germe dentário e da amelogênese do 1º molar, de filhotes de ratas, cujas mães receberam álcool antes e durante a gestação. No grupo tratado o álcool foi administrado à água das ratas em concentrações crescentes de 1%, 5%, 10%, 15%, 20% e 25%, alteradas semanalmente. Durante o período de gestação, as ratas do grupo tratado (6) foram mantidas com a solução de 25% de álcool, enquanto as do grupo controle (6) sempre receberam água. No 5º dia de vida foram sacrificados 3 filhotes de cada ninhada para remoção das hemimandíbulas, as quais foram processadas e incluídas em araldite. Os cortes histológicos semi finos foram corados com azul de toluidina 1% e submetidos à análise histológica com microscopia de luz e à análise histomorfométrica do germe dentário e matriz de esmalte. Os dados obtidos foram tratados estatisticamente pelo teste t de Student ($p \leq 0,05$) e os resultados indicaram, que as médias do volume relativo do germe dentário e da

matriz do esmalte foram sempre menores nos filhotes das ratas tratadas com álcool. Os resultados histológicos não demonstraram alterações morfológicas ou estruturais nos tecidos dentários dos animais do grupo tratado. Porém, a histomorfometria demonstrou que, a interferência do álcool durante a gravidez reduziu o desenvolvimento do germe dentário e a secreção da matriz do esmalte, sendo mais acentuada na última.

ABSTRACT

The alcohol, when consumed in elevated doses during the pregnancy, can cause congenital malformations in the fetus, such as defects craniofacials and orodontals, due to interferences in the normal embryonic development. Several forms of cell disturbs have been associated to alcohol ingestion during pregnancy, but just a few bibliographic references reported the alterations that can occur in the enamel secretory cells during the period of odontogenesis. The objective of this work was to analyze the effects of the alcohol on development of the dental germ and of the amelogenesis of the first molar on offspring of female rats that received alcohol before and during the pregnancy. In the treated group the alcohol was administered to the water of female rats in concentrations of 1%, 5%, 10%, 15%, 20% and 25% weeckly altered. During the pregnancy, the female rats of the treated group (6) were kept drinking the a 25% alcoholic solution, while the control group (6) received water. On the 5th day of life, 3 offspring of each brood was sacrificed for removal of the jaws, which were histologically processed and included in araldyte. The sections were cut 1 μ m thin and stained with 1% toluidine blue and submitted to histomorphometric analysis of the dental germ and enamel matrix. The data obtained were statistically analyzed by t student test ($P \leq 0,05$) and the results showed that the means of the relative volumes of the dental germ and the enamel matrix, were always smaller in the offspring of the female rats treated with alcohol. Therefore, it was conclude that

the alcohol effects during pregnancy, cause a reduction in the development of the dental germ and the secretion of the enamel matrix, being more accentuated in the last than in the former.

1. INTRODUÇÃO

Já está bem estabelecido, que o álcool é uma droga considerada um fator de risco à saúde. Quando consumido em doses elevadas durante a gestação, pode causar malformações congênitas no feto, dentre as quais defeitos craniofaciais e orodentais, decorrentes de interferências no desenvolvimento embrionário normal (SLAVKIN, 1999). Durante o desenvolvimento pré natal ocorre uma série de eventos ou processos fisiológicos (indução, proliferação, diferenciação, morfogênese e maturação), que levam à formação da maioria dos tecidos e órgãos do embrião, inclusive daqueles, que contribuem para o desenvolvimento dos dentes (TEN CATE, 1994; BALOGH & FEHRENBACH, 1997).

LEMOINE et al., em 1968 descreveram alguns defeitos característicos na prole de alcoólatras. Entretanto, somente em 1973, JONES et al. 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 indistinguível ou pequeno sulco vertical), lábio superior estreito, fissura palpebral curta, retrognatismo na infância e relativo prognatismo na adolescência, porção média

da face pequena e achatada, hipoplasia maxilar, nariz pequeno e arrebitado e orelhas malformadas. Ocasionalmente, pode-se observar fenda labial e fenda palatina (CLARREN & SMITH, 1978).

Com relação à influencia do álcool no desenvolvimento crânio facial e dental, CHURCH et al. (1997); CLARREN & SMITH (1978), observaram dentes pequenos e hipoplasia do esmalte. Entretanto, CHURCH et al. (1997); JACKSON et al. (1990) relataram também a presença de palato ogival e anomalias do esmalte. Outros estudos em ratos, demonstraram um retardo na erupção dental e no crescimento pós eruptivo dos dentes incisivos (TOMAZELA et al., 1997; SILVA et al., 1999) e redução das medidas do crânio e da mandíbula (EDWARDS et al., 1991; GUERRERO et al., 1998; GUERRERO, 1990).

Outras interferências do álcool foram observadas na formação do tecido nervoso do cérebro, tais como, redução na taxa de migração dos neurônios e das células da glia descritas por CLARREN et al. (1978); MILLER (1987); MILLER (1993). Por outro lado SINGH et al. (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 do cérebro.

Estudos em fetos de ratas tratadas com álcool permitiram observar o efeito inibitório sobre o processo de síntese proteica em células do cérebro (HENDERSON et al., 1980), do fígado (RAWAT, 1976; HENDERSON et al., 1980), do coração e rim (HENDERSON et al., 1980). Adicionalmente, PHILLIPS &

KRUEGER (1992) verificaram uma diminuição da maturação dos oligodendrócitos do nervo óptico.

Com relação à influência do álcool na odontogênese, CAMPOS & DURANZA (1988) descreveram alterações celulares na camada basal do epitélio do germe dentário na fase de botão e nos epitélios do esmalte na fase de capuz, sendo que as alterações mais relevantes foram visualizadas no epitélio interno do órgão do esmalte.

GUERRERO et al. (1996), estudaram a imunoexpressão do fator de crescimento epidermal (EGF) no folículo dentário dos molares de camundongos, observando que a expressão do EGF nos animais tratados com álcool foi fraca e heterogênea. A análise histomorfométrica demonstrou uma diminuição no tamanho dos germes dentários.

Por outro lado, RÖMERT & MATTHIESSEN (1988) em estudos com fetos de miniporcos, descreveram alterações de forma e tamanho das mitocôndrias dos ameloblastos secretores e localização anormal de um material granular e elétron denso no espaço intercelular, concluindo que estas alterações podem indicar uma interferência do álcool quando administrado durante a gravidez.

Dessa maneira, os estudos demonstraram que tecidos e órgãos em desenvolvimento são susceptíveis aos efeitos do álcool etílico durante a gestação e que estes variam de acordo com a dose, tempo e período de exposição ao álcool. Durante todo o período da odontogênese e especificamente na amelogênese, ocorrem processos de indução entre o mesênquima e o ectoderma, proliferação e posterior diferenciação das células que são necessários para a

síntese e secreção da matriz do esmalte (TEN CATE, 1994; BALOGH & FEHRENBACH, 1997). Portanto, a interferência do álcool em um ou em todos esses processos poderia ocasionar distúrbios na formação do esmalte.

Assim, o propósito deste trabalho, será observar os efeitos do álcool etílico, especificamente, sobre o germe dentário e o desenvolvimento da matriz do esmalte.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A teratogenicidade do álcool foi demonstrada nos humanos através dos estudos clínicos e nos animais através de experimentos laboratoriais controlados. O álcool é uma droga muito estudada, devido à sua ampla utilização na população e à grande quantidade de efeitos causados nos filhos de mães que ingeriram álcool durante a gravidez. Tanto os estudos clínicos, como os experimentais com animais de laboratório, demonstraram malformações congênitas, morte intrauterina, deficiência no crescimento, anormalidades no sistema nervoso central (SNC) e alterações comportamentais (STREISSGUTH et al, 1980).

2.1. ESTUDOS CLÍNICOS

Entre os pesquisadores e na prática clínica , há dúvidas de como melhor caracterizar e identificar a Síndrome Fetal Alcoólica (SFA) e outros defeitos congênitos relacionados à exposição pré-natal ao álcool (ARBD).

A SFA é a forma mais severa de defeitos ao nascimento produzidos no embrião exposto ao álcool e três critérios clínicos são usados para diagnosticar a síndrome (SOKOL & CLARREN, 1989). São eles:

- a) deficiência no desenvolvimento pré e pós-natal (peso e/ou comprimento 10% abaixo do normal para idade gestacional).

- b) deficiências no SNC (anomalias do tecido nervoso, baixo desenvolvimento intelectual e anomalias estruturais).
- c) distinto padrão de anomalias faciais: fissura palpebral curta (olhos arregalados), lábio superior fino, porção média da face pequena e achatada, filtro labial indistinto ou filtro hipoplásico.

Segundo STREISSGUTH et al. (1991), a maioria das anomalias faciais identificadas em 80% ou mais dos indivíduos com SFA incluem, anormalidades no filtro labial, nos lábios, distúrbios e/ou maloclusão dental.

Em adição às características faciais, outras anomalias físicas podem ser encontradas como: cardiopatias (WEBSTER et al., 1984; CLARREN & SMITH, 1978), anormalidades esqueléticas, do sistema cardiovascular, genito-urinário, respiratório e imune. Estas anomalias podem ou não estarem presentes na manifestação completa da síndrome. Se apenas algumas dessas características forem observadas, tais crianças podem ser classificadas como tendo Efeitos Alcoólicos Fetais (FAE) (STREISSGUTH et al, 1991; CLARREN & SMITH, 1978), ou defeitos ao nascimento relacionados com o álcool (ARBD) (SOKOL & CLARREN, 1989).

A manifestação das características da síndrome parece ser variável. Alguns autores consideram que somente 1/3 dos recém-nascidos de mães alcoólatras, evidenciam nitidamente o conjunto de sinais que caracterizam a Síndrome Fetal Alcoólica (SULIK et al., 1986).

Por várias razões, pesquisadores e clínicos continuam a ter dificuldade para identificar indivíduos com a SFA. Por exemplo, as anomalias faciais podem ser sutis e difíceis de reconhecer, suas expressões mudam com a idade e a severidade varia entre indivíduos e entre diferentes grupos étnicos e raciais. Segundo SOKOL & CLARREN, (1989), a SFA é prontamente diagnosticada ao nascimento, somente nos casos mais severos. A aparência facial começa a se normalizar com a idade . O contínuo e lento crescimento do queixo e do nariz na adolescência compensa o baixo desenvolvimento da porção média da face.

STREISSGUTH et al. (1991), em um estudo com 61 adolescentes filhos de mães alcoólatras observaram que após a puberdade, as faces dos pacientes com SFA ou FAE não se distinguem. Os pacientes têm a tendência de permanecerem com estatura baixa e com microcefalia, embora o peso acaba se aproximando da média.

STREISSGUTH et al. (1980), em um estudo de perspectiva, encontraram que o aumento abusivo de álcool está relacionado com a diminuição do peso, da estatura e da circunferência da cabeça ao nascimento. Posteriormente em um estudo com 6 crianças (idades entre 3 e 13 anos) que apresentaram a SFA, JACKSON et al. (1990) relataram que houve um aumento compensatório em alguns instantes no peso, estatura e circunferência da cabeça. A proporção estatura /peso varia, mas a longo prazo há uma tendência para um aumento maior no peso, do que um aumento na estatura e circunferência da cabeça.

ABEL (1982), relatou que o peso ao nascimento é um índice razoável da mortalidade e morbidade pré-natal. Assim, afirma que a taxa de mortalidade pré-natal em crianças com baixo peso ao nascer (<2500g) é cerca de 30 vezes maior que o normal.

AUTTI-RÄMÖ et al. (1992), estudaram 52 crianças expostas ao álcool durante o 1º, 2º trimestre e durante toda a gravidez. Concluíram que, tanto o peso quanto o comprimento eram significativamente menores no grupo das crianças expostas ao álcool durante a gravidez inteira.

Outra característica freqüentemente encontrada é a microcefalia (COLES, 1993; AUTTI-RÄMÖ et al., 1992; STREISSGUTH et al., 1980; CLARREN & SMITH, 1978). CLARREN et al. (1978) examinando cérebros obtidos na autópsia de 4 neonatos, verificou anormalidades estruturais no desenvolvimento dos mesmos, dentre as quais redução no peso, hidrocefalia e tronco cerebral rudimentar. De todas as malformações cerebrais, a mais freqüente foi a formação de uma camada constituída por um tecido nervoso alterado, resultante da migração anormal dos neurônios e células da glia.

JACKSON et al. (1990), estudaram o desenvolvimento crânio facial e dental de pacientes que apresentaram a SFA, através 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 nasal, osso nasal e abertura nasal) e incisivos superiores inclinados para compensar a retrusão maxilar.

Com relação à cavidade oral esses autores observaram palato ogival, oclusão dental normal e anomalias do esmalte (esmalte opaco na incisal e oclusal dos dentes decíduos). Dos 6 casos estudados, dois apresentaram moderada queda no desenvolvimento dental (de 6 a 10 meses). Uma análise posterior deste desenvolvimento demonstrou em um dos casos que aos 13 anos de idade o hipodesenvolvimento dental permaneceu aproximadamente o mesmo, indicando uma constância naquele. Entretanto não foram observadas alterações na posição e tamanho dos dentes.

Por outro lado, CHURCH et al. (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 dental, 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.

2.2 ESTUDOS EXPERIMENTAIS

2.2.1 Efeitos do álcool sobre as células

As pesquisas com animais de laboratório apresentam algumas vantagens para o estudo da ação teratogênica do álcool sobre o desenvolvimento fetal. Com esses modelos podem-se estudar os efeitos do álcool ao nível morfológico, farmacológico, bioquímico, fisiológico e a interação com os fatores genéticos, sociais e comportamentais, além de permitir aos pesquisadores controlar, excluir e mensurar adequadamente alguns fatores que confundem o diagnóstico da SFA e do ARBD nas pesquisas clínicas. Ao contrário destas, os estudos experimentais possibilitam ainda que as análises possam ser conduzidas em centenas de animais aumentando assim, o “poder” das observações e a confiabilidade do estudo (Ninth Special Report to the U.S Congress on Alcohol and Health 1997).

Desta maneira, estudos em camundongos demonstraram que a administração intraperitoneal de 25% de álcool no 7º dia de gravidez (estágio de gástrula do embrião) está associada com malformações faciais e cardíacas similares àquelas encontradas nas crianças com SFA. A análise da 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. Outra análise, em um estágio embrionário mais avançado evidenciou 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 & JOHNSTON, 1983).

O estágio de gástrula do desenvolvimento embrionário é um período de intensa proliferação celular, importante na formação do mesoderma (SULIK, 1984). Este autor constatou que o álcool administrado no 7º dia de gestação de camundongos inibiu a taxa de divisão celular das células mesodérmicas, as quais são responsáveis pela indução da diferenciação do neuroepitélio. Portanto deficiências na região anterior do disco embrionário durante o período de gástrula levam às malformações crânio faciais características da SFA.

Anteriormente SULIK et al. (1981) observaram que a redução no desenvolvimento da placa neural foi acompanhada pela presença de vesículas no epitélio neural do cérebro. Já, SULIK et al. (1986) estudaram embriões de camundongos expostos ao álcool no 8 ½ dia de gestação verificando um baixo desenvolvimento do prosencéfalo e mesencéfalo, resultante da interferência daquele na migração das células da crista neural. Os cortes histológicos dos embriões, demonstraram células picnóticas no mesênquima cranial e morte celular no neuroepitélio.

CLARREN et al. (1978), afirmam que o córtex cerebral é particularmente susceptível aos efeitos da exposição pré natal ao álcool. Sendo assim, MILLER (1993) submeteu ratas a uma dieta líquida com 6,7%(v/v) de álcool etílico, entre o

6º e 21º dias de gravidez. As ratas prenhas foram sacrificadas 1hr, 2, 4, 6, 8, 10 ou 12 dias após a injeção de timidina tritiada. O autor concluiu, que a exposição crônica ao álcool retardava a migração dos neurônios em 2 a 6 dias e freqüentemente estes terminavam em locais ectópicos.

Em 1987, MILLER estudou filhotes de ratas, 3 a 4 meses após o nascimento e verificou que o álcool administrado durante a gestação, também influenciava a formação dos neurônios corticais.

Com o intuito de analisar os efeitos da ingestão materna de álcool sobre as células da glia do nervo óptico, PHILLIPS & KRUEGER (1992) administraram à dieta de ratas grávidas, 6,7 % de álcool, considerando aproximadamente 37% do total de calorias. Após o nascimento os filhotes foram expostos adicionalmente ao álcool via oral por 10 dias de vida pós natal. Em seguida, permaneceram com uma dieta livre de álcool. O aparecimento de oligodendrócitos imaturos e a diminuição no número destas células nos 15º e 20º dias de vida pós natal evidenciaram um retardo na maturação das mesmas.

A fim de investigar o efeito teratogênico da exposição aguda ao álcool, WEBSTER et al. (1983) pesquisou camundongos expostos, durante o período organogênico, a 25% de álcool etílico, por via intraperitoneal ou por via oral (intubação gástrica). O tratamento nos 7º ou 8º dias de gravidez produziu exclusivamente defeitos na cabeça, dentre eles hipoplasia maxilar e mandibular, fenda labial mediana, fenda palatina e redução nos hemisférios cerebrais. Já a exposição ao álcool nos 9º e 10º, resultou em defeitos nos membros. Assim as doses de álcool administradas por via oral foram menos teratogênicas, do que as

mesmas injetadas intraperitonealmente. Segundo WEBSTER et al. (1984) um consumo curto em níveis elevados, em períodos críticos da gestação pode causar danos a um embrião susceptível.

Outros estudos relacionaram o efeito inibitório do álcool sobre a síntese proteica. RAWAT (1976) verificou que o consumo de 6% (v/v) de etanol por ratas prenhas resulta na diminuição da síntese proteica em células do fígado fetal, evidenciada pela menor incorporação de leucina-C¹⁴ pelos ribossomos hepáticos. Além disso, foi observada uma diminuição do conteúdo total de RNA e na proporção RNA/DNA, embora a quantidade de DNA não foi significativamente afetada.

HENDERSON et al. (1980) estudaram os efeitos da ingestão aguda e crônica de álcool e o papel da hipotermia induzida por esse, sobre a síntese proteica em células do cérebro, coração, rim e fígado de ratas prenhas e de seus fetos. Não foram encontrados efeitos significativos sobre a síntese proteica nas ratas expostas à ingestão crônica de álcool no momento em que o nível de álcool no sangue era de 0,76 mg/ml e a temperatura corporal materna normal (38°C). Quando as ratas expostas a este regime de ingestão receberam uma dose adicional de álcool, o nível sanguíneo do mesmo foi para 3mg/ml, a temperatura corporal teve uma queda de 2,3°C e a síntese proteica foi significativamente reduzida em todos os tecidos da mãe e do feto. Efeito inibitório sobre a síntese proteica nos mesmos tecidos também foi observado nas ratas expostas somente à ingestão aguda de álcool, onde o nível sanguíneo foi de 2,7mg/ml e a temperatura corporal materna reduzida em 2°C. Em ambos os grupos, a hipotermia foi

eliminada com o objetivo de verificar os efeitos do álcool sobre a síntese proteica. Dessa maneira verificaram que a hipotermia induzida pelo álcool foi o maior contribuinte para a depressão na síntese proteica encontrada no cérebro e coração maternos e no cérebro fetal. Entretanto com altos níveis de álcool no sangue (mais que 1mg/ml) o etanol independente da hipotermia teve efeitos diretos na redução da síntese proteica na placenta, rim e fígado maternos e também no coração, rim e fígado fetais.

Segundo EDWARDS (1991) a ingestão de 6,7% (v/v) de álcool por ratas entre o 6º e 21º dias da gestação produziu, também, 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. (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 gravidez. 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 experimentais. Além disto, foi observado também uma diminuição no ganho de peso materno durante a gravidez e no peso dos filhotes ao nascimento.

O etanol é metabolizado no fígado a acetaldeído pela enzima álcool desidrogenase (ADH) e oxidado a ácido acético pela enzima acetil desidrogenase (ALDH). Segundo SANCHIS & GUERRI (1986), ambos, etanol e acetaldeído são transferidos do sangue materno para a circulação fetal através da placenta. Estes autores estudaram o efeito da ingestão crônica de álcool sobre a atividade das enzimas ADH e ALDH no fígado fetal e na placenta no 15º e 21º dias de gestação, em ratas. Não foi detectada a atividade da ADH na placenta nos 2 períodos estudados, nem no fígado fetal no 15º dia de gestação, entretanto uma baixa atividade foi encontrada no 21º dia. Estes achados foram semelhantes nos grupos controle e tratado. Com relação a ALDH foi detectada uma baixa atividade na placenta e no fígado fetal no 15º dia de gestação. Embora, no 21º dia sua atividade começou a ser reduzida na placenta e aumentada no fígado fetal, os resultados demonstraram que em ambos os períodos o álcool diminuiu a atividade da ALDH, tanto na placenta, como no fígado dos fetos. Dessa maneira os autores concluíram que durante a gestação a placenta e o fígado fetal têm uma habilidade muito baixa para metabolizar o álcool e o acetaldeído e conseqüentemente a presença de ambos no feto depende não somente da quantidade do álcool consumida pela mãe, mas também das taxas relativas de produção e eliminação do acetaldeído pelo metabolismo materno.

GARCIA et al. (1996) verificaram os efeitos do álcool ingerido durante a gestação sobre a atividade das enzimas mitocondriais dos tecidos do coração, do cérebro e do fígado em ratos com 1 dia de vida. Os resultados evidenciaram uma redução de 20% no peso corporal dos animais tratados, assim como uma

diminuição no peso do coração, cérebro e fígado, quando comparado com os animais controles. Foi observado, também, uma baixa atividade da ATP sintetase no cérebro e do complexo III no fígado dos filhotes do grupo tratado. Entretanto, as enzimas mitocondriais no cérebro não foram significativamente afetadas. Sendo assim, o estudo constatou que a exposição fetal ao álcool produziu um efeito específico sobre a atividade de determinadas enzimas das mitocôndrias no fígado e cérebro, porém um pequeno ou nenhum efeito sobre o coração.

Outros estudos, realizados por RÖMERT & MATTHIESSEN (1984) relacionaram os efeitos do álcool sobre os hepatócitos, em fetos de mini porcas, quando administrado por 20 dias durante a gravidez. Os hepatócitos foram avaliados ultraestruturalmente e comparados entre os animais controles e tratados. Nos hepatócitos das mães foram observados, um extenso retículo endoplasmático liso contendo túbulos dilatados e vesículas com material floculento no interior, um aumento no tamanho das mitocôndrias, de microcorpos e de vacúolos autofágicos, um extenso complexo de Golgi com acúmulo de secreção e redução no conteúdo de glicogênio. Nos fetos, os hepatócitos exibiram profundas alterações nas mitocôndrias e no retículo endoplasmático granular após a exposição ao álcool. A maioria das mitocôndrias apresentaram forma anormal e aumento no número, com desorientação das cristas e acúmulo de material paracristalino na matriz. Um aumento no número de vacúolos autofágicos contendo remanescentes de mitocôndrias foram observados e o retículo endoplasmático rugoso exibiu agregação das cisternas. As alterações descritas acima foram mais pronunciadas nos fetos de mães que consumiram a maior

quantidade de etanol (3.75g etanol/kg de peso) e menos pronunciadas naqueles, cujas as mães consumiram a menor quantidade de etanol (1.1g etanol/kg de peso). Assim, os autores afirmam que as alterações ultraestruturais observadas nos hepatócitos das mães indicaram uma adaptação destas células ao etanol, enquanto os hepatócitos dos fetos mostraram sinais óbvios de injúria celular.

Outros estudos *in vitro* também relacionam os efeitos do álcool sobre a proliferação, morfologia e estrutura celular. RANDALL et al. (1990) realizaram uma revisão da literatura sobre os possíveis mecanismos de ação do álcool. Segundo os autores estudos *in vitro* são úteis para distinguir a toxicidade direta do álcool, dos efeitos indiretos mediados via materna, por exemplo a má nutrição.

Sendo assim, BROWN (1979) verificou que embriões de ratos em meio de cultura contendo álcool apresentavam um retardo no mecanismo indutivo da diferenciação e desenvolvimento dos tecidos. A análise bioquímica demonstrou uma diminuição do conteúdo de DNA e de proteína, sendo estes efeitos dependentes da dose administrada. Outros estudos semelhantes, FADEL & PERSAUD (1992) observaram que a redução no desenvolvimento do embrião ocorria na região craniofacial, no prosencéfalo, no número de somitos e nos arcos branquiais.

Ainda, PENNINGTON & KALMUS (1987) estudando embriões de galinha em meio de cultura, demonstraram que o álcool provocava uma redução generalizada do desenvolvimento embrionário. Os embriões tratados mostraram uma redução no conteúdo de DNA, na síntese proteica e retardo do crescimento cerebral.

Na SFA a morfogênese normal das estruturas derivadas das células da crista neural é perturbada (SULIK et al., 1981). Sendo assim, DAVIS et al. (1990) estudaram *in vitro* células da crista neural de embriões de galinhas expostas à concentração de 0,2% de etanol. Após 12hs de incubação as células foram analisadas através da microscopia eletrônica de varredura. Verificaram-se alterações no número de células e na morfologia da superfície celular. Esta apresentou-se achatada e lisa, com ausência de microvilos. As células eram menores, desprovidas de extensões citoplasmáticas e mais aglomeradas. Também foram vistas na superfície celular pequenas vesículas ovóides. Segundo os autores estas alterações celulares foram causadas pela formação de radicais livres resultantes do metabolismo do álcool. Estes radicais livres atravessam a barreira placentária e entram na circulação fetal causando alterações bioquímicas e fisiológicas da membrana plasmática das células da crista neural comprometendo, assim, os processos de cito e histodiferenciação associados com a morfogênese de vários tecidos primordiais, dentre eles os da região crânio facial.

Segundo PÁR (1992) os radicais livres formados no metabolismo do álcool, principalmente as hidroxilas, formam complexos com os lipídios. Esta peroxidação lipídica afeta a estrutura biológica da membrana plasmática, causando perda da integridade da mesma, injúria celular e finalmente morte celular.

2.2.2 Efeitos do álcool sobre o germe dentário

Quanto às influências do álcool sobre o desenvolvimento dental poucas pesquisas têm sido descritas na literatura.

Em 1988, CAMPOS & DURANZA, estudaram os efeitos do consumo prolongado de álcool sobre o desenvolvimento dentário. Para isto administraram 25% de álcool à água de ratas prenhas. Ao 14º 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 & MATTHIESSEN pesquisaram os germes dentários de fetos de mini porcos de mães que receberam doses diferentes 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. Dentre essas, forma e tamanho anormal das mitocôndrias e deposição de um material granular elétron denso no espaço intercelular foram descritas. 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

encontradas evidenciam a influência do álcool na função secretora do ameloblasto e conseqüentemente na formação do esmalte.

GUERRERO (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°, 3.5, 7.5, 14.5, 21.5 e 28.5 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 gravidez foi significativamente menor no grupo tratado. c) o germe dentário do 1º molar inferior do grupo tratado apresentou-se ao 14,5º dia de gestação em fase de botão, porém com menor desenvolvimento que no grupo controle. d) ao 1,5º 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 1º molar inferior ao 14,5º dia pós natal mostrou retardo na erupção dental 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 dental de filhotes de camundongos.

Posteriormente GUERRERO et al. (1996) em um estudo semelhante, porém analisando o efeito do álcool sobre o fator de crescimento epidermal (EGF) na odontogênese de camundongos com 1.5º dia de vida, descreveram que a

imunoexpressão daquele, observada na cúspide média do 1º molar inferior era forte e homogênea no grupo controle, porém fraca e heterogênea no tratado. Também verificaram que os germes dentários dos animais tratados eram morfométricamente menores. Portanto, os autores concluíram que a ingestão materna de álcool reduz o fator de crescimento epidermal no folículo dentário em camundongos de 1,5 dias de vida.

TOMAZELA et al. (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 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 que, embora os animais apresentassem peso e comprimento crânio-caudal semelhantes no 1º dia de vida, em ambos os grupos, tratados e controles, estes parâmetros foram menores nos animais do grupo tratado ao 6º e 10º dias de vida, sendo neste último as diferenças estatisticamente significantes. Com relação à cronologia de erupção, cabe destacar que 88,5% dos filhotes do grupo controle apresentaram seus incisivos superiores erupcionados até o 10º 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 13º dia. As medidas pós eruptivas dos incisivos apresentaram valores semelhantes no 16º, 20º e 24º dias em ambos os grupos, entretanto no

28º dia de vida os incisivos superiores do grupo tratado apresentaram um crescimento pós eruptivo menor do que aqueles do grupo controle.

SILVA et al. (1999) descreveram as alterações no desenvolvimento pós eruptivo de incisivos de filhotes de ratas, que durante a gestação e amamentação foram expostas à uma dieta contendo 25% de álcool etílico na água de beber. As ratas do grupo controle receberam água *ad libitum*. O crescimento pós eruptivo dos incisivos superiores e inferiores foi mensurado nos 20º, 24º e 28º dias de vida dos filhotes. Como parâmetros de desenvolvimento embrionário e pós natal foram obtidos o peso e o comprimento crânio-caudal dos filhotes nos 5º, 10º, 15º, 20º, 25º e 30º dias de vida dos mesmos. Os resultados obtidos foram os seguintes: as médias do peso e comprimento crânio-caudal foram sempre menores nos filhotes do grupo experimental, sendo as diferenças estatisticamente significantes em todos os períodos; as médias do comprimento cérvico-incisal dos incisivos inferiores e superiores, também foram menores nos filhotes do grupo experimental, sendo as diferenças estatisticamente significantes em todos os períodos tanto nos incisivos inferiores como nos superiores. Desta maneira, concluíram que o álcool etílico administrado durante a gestação e período de lactação retarda o desenvolvimento corporal e o crescimento pós eruptivo dos dentes incisivos de ratos.

3. PROPOSIÇÃO

O presente estudo tem como objetivo avaliar histomorfologica e histomorfométricamente o desenvolvimento da matriz do esmalte e do germe dentário do 1º molar inferior, em filhotes de ratas, as quais ingeriram álcool etílico em doses consideradas teratogênicas, durante a gravidez, bem como alguns parâmetros do desenvolvimento embrionário e pós natal.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Para este estudo foram utilizados inicialmente, 42 ratos albinos Wistar, fêmeas adultas jovens, pesando aproximadamente 200g (2 meses). As ratas foram distribuídas em 2 grupos: controle (17) e tratado (25) e os animais mantidos em gaiolas individuais. Em ambos os grupos, os nutrientes da dieta foram obtidos a partir da ração comercial Labina (Purina). Todos os animais receberam a mesma ração. A ingestão de água ou solução (água/álcool) foi controlada de acordo com o seguinte protocolo:

No grupo tratado, o etanol (MERCK) foi administrado à água em concentrações crescentes de 1%, 5%, 10%, 15%, 20% e 25%. Esta solução era substituída a cada período de 7 dias. O aumento gradual na concentração de álcool permitiu que as ratas se acostumassem à bebida, evitando assim a abstinência ou perda do interesse pela solução administrada.

No 1º dia de cada período foi administrada a mesma quantidade de solução para os animais tratados, verificando-se o consumo ao 4º e último dia da semana com auxílio de uma proveta. Ao término de cada período semanal foram registrados os dados referentes ao peso e consumo dessa solução. O mesmo procedimento foi realizado no grupo controle, porém este recebeu água sem álcool em quantidade aproximadamente igual à média do volume ingerido pelas ratas tratadas.

O período de tratamento pré fertilização durou 42 dias e foi considerado como período de adaptação ao álcool. Após este período as fêmeas foram colocadas junto com machos não alcoólatras, durante o período noturno, a fim de que ocorresse o acasalamento.

A constatação da gravidez foi obtida por meio da observação do tampão vaginal e presença de esperma no esfregaço vaginal. Este dia foi definido como dia 0 de gestação.

Em seguida, as ratas prenhas, controles (6) e tratadas (6), foram colocadas de volta às suas gaiolas e mantidas com suas correspondentes dietas, ou seja, água pura e água com álcool etílico 25% respectivamente, durante todo o período de tratamento pós fertilização (gestação e amamentação). O consumo da solução e o peso corpóreo eram registrados semanalmente.

No 5º dia de vida extra-uterina, 3 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.

Para este experimento foram utilizadas 18 hemi-mandíbulas controles e 18 tratadas, sendo uma de cada filhote, respectivamente.

A fixação se deu pela imersão das hemi-mandíbulas em solução de glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 2,0% (KARNOVSKY, 1965) em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3 por 6 hs. Em seguida, foram lavadas na mesma solução de tampão fosfato durante 30 min., com trocas a cada 10 min. de intervalo.

A descalcificação das peças, foi realizada em EDTA tamponado a 5%, pH 7,3 (WARSHAWSKY & MOORE, 1967) com trocas diárias do líquido, durante 7 dias. O grau de descalcificação foi testado na região de incisivo, através de cortes realizados com uma lâmina de barbear nova. Consideramos que a desmineralização estava completa quando a região não oferecia resistência ao corte.

Após este procedimento, as peças foram lavadas em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3 durante 30 min., com trocas a cada 10 min. de intervalo. As hemimandíbulas foram reduzidas através de dois cortes transversais no sentido vestibulo-lingual. O primeiro corte passou distalmente ao 1º molar e o segundo, mesialmente ao 1º molar, de modo que permanecesse somente o germe dentário do 1º molar (Fig. 1).

As peças reduzidas e lavadas foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 2% 0,1M, pH 7,2, por uma hora, lavadas novamente em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3 durante 10 minutos, com trocas a cada 5 minutos de intervalo.

A desidratação dos espécimes foi realizada em concentrações crescentes de acetona, sendo que na última concentração (acetona a 100%) foram feitas 3 trocas de 20 minutos cada.

Em seguida, foi realizada a infiltração e inclusão das peças em Araldite. As mesmas foram incluídas, de modo que o germe dental fosse cortado no sentido mesio-distal. Os cortes semi-finos (1µm de espessura) e semi-seriados foram

obtidos com auxílio do ultra-micrótomo Porter Blum MT 2C, na porção média do germe do 1º molar inferior.

No presente trabalho as áreas livres de esmalte não foram incluídas no plano de corte. Os cortes foram corados com Azul de Toluidina a 1% e o germe dentário submetido a estudo histológico em microscopia de luz e histomorfométrico no analisador de imagem, KS 400 (Kontron Elektronik, Germany).

1. Estudo Histomorfométrico

O parâmetro utilizado para a análise histomorfométrica foi a densidade de volume (V_{vi}).

A densidade de volume (V_{vi}) ou fração de volume do germe dentário ocupada por uma determinada estrutura foi estimada através da volumetria de pontos (WEIBEL, 1969).

Este método está baseado em princípios básicos enunciados pelos geologistas DELESSE (1847) e GLAGOLEFF (1933). De acordo com DELESSE, a fração de volume ocupada por uma estrutura i é proporcional à fração de área ocupada por perfis do mesmo objeto: $V_{vi}=A_{ai}$. Por outro lado, GLAGOLEFF demonstrou que a fração de área poderia ser determinada colocando sobre a amostra uma grade de pontos arranjados regularmente, e contando o número de pontos que se sobrepunham à estrutura. Este geólogo verificou que $A_{ai}=P_{pi}$.

Desse modo, a determinação da densidade de volume pode ser realizada avaliando-se a fração de pontos que caem sobre perfis da estrutura em estudo, ou seja, $V_{vi}=P_{pi}$.

O sistema teste usado foi um retículo dividido em 70 quadrados, que no aumento utilizado (objetiva 4x) cada quadrado mediu $4 \times 10^4 \mu\text{m}^2$. Este sistema teste permitiu abranger o corte histológico do germe dentário por inteiro (Fig.2).

O número de pontos necessários para a análise histomorfométrica, foi obtido através do método das frequências acumuladas (CHALKEY, 1943). Este é um método para a determinação empírica do nº de observações necessárias para construir uma amostra adequada para as medições histométricas. O número de observações utilizadas nesta contagem teste foi de 4 animais controles (filhotes). De acordo com o método, foi calculada a densidade de volume da matriz do esmalte em 10 cortes semi seriados de cada um dos 4 animais. Para isto contamos o número de pontos que estavam sobre a matriz do esmalte e o dividimos pelo número de pontos da área teste. Nos cortes seguintes acumulou-se o valor da 1ª contagem ao valor da próxima, e assim por diante , até finalizar 10 cortes. Os valores obtidos da densidade de volume da matriz do esmalte foram colocados num gráfico, onde o eixo x representou os números de pontos da área teste acumulados e o eixo y, a densidade de volume expressa em porcentagem. Inicialmente a curva traçada no gráfico apresenta pequenas variações e depois tende a se estabilizar. Isto ocorreu no valor correspondente no eixo x a 420

pontos. Em seguida foi dividido este número pelo número de pontos da área teste (70 pontos).

Portanto 420 pontos corresponde a 6 áreas testes por germe dentário de cada animal. Assim, para a análise histomorfométrica, foram usados 6 cortes semi-seriados de 10 μm de intervalo.

1.1 Densidade de volume do germe dentário em relação à área teste (Vvg).

$$Vvg = \frac{Pg}{70}$$

Onde, Pg é o número de pontos coincidentes com o germe dentário e 70 é o número de pontos da área teste.

1.2 Densidade de volume da matriz de esmalte em relação ao volume do germe dentário (Vve).

$$Vve = \frac{Pe}{\text{n}^\circ \text{ de pontos sobre o germe dentário}}$$

Onde, Pe é o número de pontos coincidentes com a matriz de esmalte.

A densidade de volume (Vv) foi expressa em $\mu\text{m}^3 / \mu\text{m}^3$.

Os resultados da densidade de volume da matriz do esmalte (Vve) e do germe dentário (Vvg) dos 3 animais de cada ninhada foram agrupados obtendo-se, assim, a média das Vv por ninhada.

Foram, também obtidos o peso corpóreo e o comprimento crânio-caudal dos filhotes como parâmetros do desenvolvimento embrionário e pós natal, ao nascimento e 5º dia de vida, em ambos os grupos, controle e tratado.

Todos os dados obtidos foram analisados e tratados estatisticamente a fim de determinar se as diferenças entre os grupos eram estatisticamente significantes. Para isto foi utilizado a estatística paramétrica (Teste t para observações independentes), com $p \leq 0.05$ indicando o nível mínimo de significância, ou seja, usamos para nível de rejeição da hipótese da nulidade, o valor igual, ou menor do que 0,05 (5%). Quando a estatística calculada apresentou um valor significativo, usamos letras para caracterizá-la.

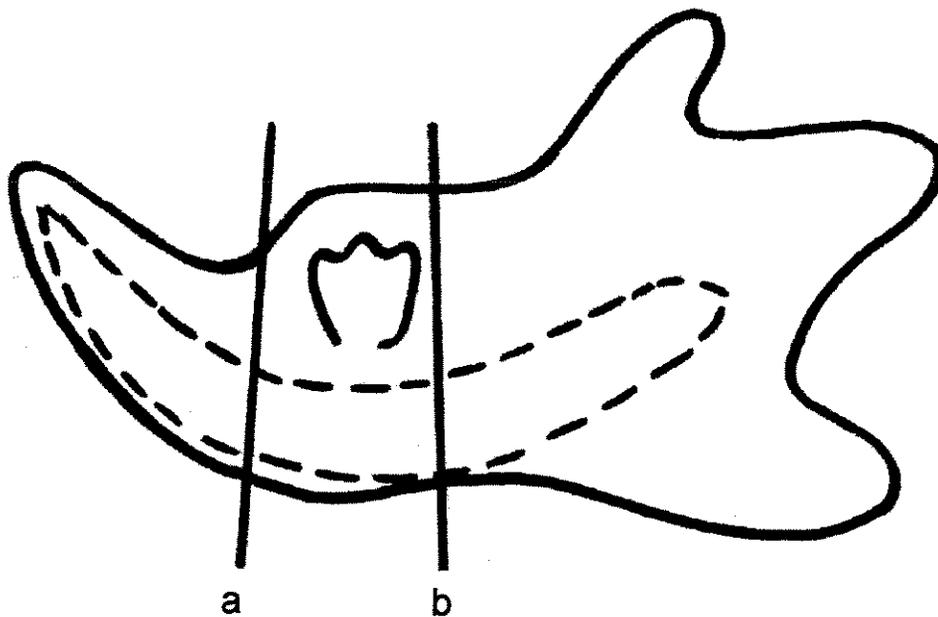


Figura 1 – Desenho esquemático da hemimandíbula com germe dentário do 1º molar de ratos no 5º dia de vida mostrando a direção e localização dos cortes (a e b).

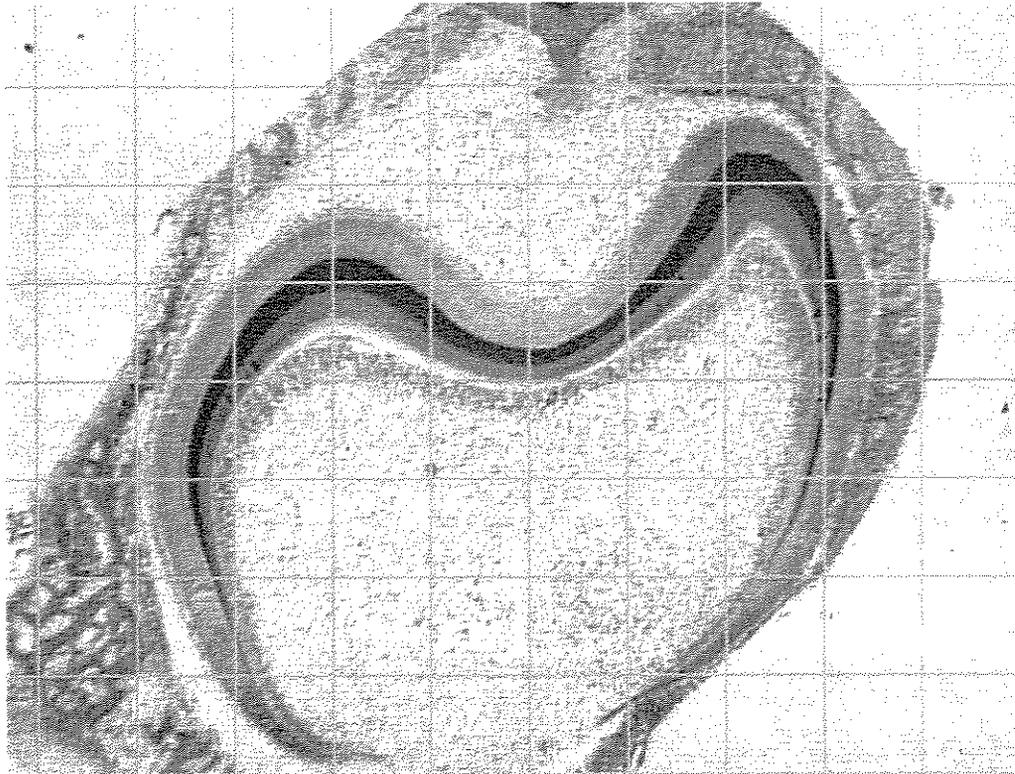


Figura 2 - Germe dentário do 1º molar inferior sobreposto pelo retículo usado para morfometria. A área teste é composta de 70 pontos, cada um equivalendo na ampliação utilizada a $8 \times 10^6 \mu\text{m}^3$.

5. RESULTADOS

5.1. Parâmetros do desenvolvimento

5.1.1 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 Tabs.1 a 3 e Figs.3 e 4.

A Tab. 1 e Fig. 3 mostram os dados do consumo de água ou solução, respectivamente, nos grupos controle e tratado. Ao compararmos os dois grupos observamos, que o consumo da solução alcoólica foi significativamente menor no grupo tratado, em todo o período de tratamento. A Fig.3 e Tab.1 mostra que, o menor consumo da solução pelos animais tratados, ocorreu na 4ª semana aumentando na 5ª semana, embora sempre menor que no grupo controle e verificamos também que o consumo de água pelas ratas controles mostrou-se com pouca variação nas seis semanas antes da gestação, aumentando significativamente durante a gravidez.

As médias do peso corpóreo (g) das ratas dos grupos controle e tratado estão resumidas na Tab.2 e Fig.4. Observamos que o peso, embora menor nas ratas do grupo tratado, em todos os períodos analisados, começou a ser estatisticamente diferente do grupo controle a partir da 4ª semana do período de

tratamento (221g vs 237g; $p \leq 0,05$). Durante a gestação verificamos que o ganho de peso das ratas tratadas com álcool foi significativamente menor (50%), quando comparado com as ratas controles.

A Tab.3 mostra os resultados referentes ao tempo de gestação das ratas, o ganho de peso neste período e o número de filhotes em ambos os grupos, controle e tratado.

Podemos verificar, que o tempo de gestação das ratas tratadas com álcool (22 dias) foi maior do que das ratas controles (21 dias). Esta diferença foi estatisticamente significante ($p \leq 0,05$). Quanto ao tamanho da ninhada e o ganho de peso das ratas observamos que houve uma redução de 49% ($p \leq 0,05$) no grupo tratado. Com relação à taxa de mortalidade, o teste de Fisher mostrou que as diferenças entre os grupos foram estatisticamente significantes.

Tabela 1 - Médias do consumo de água (ml) e da solução alcoólica (ml) de ratas adultas jovens dos grupos controle e tratado em cada semana do período de tratamento.

	Pré fertilização					Pós fertilização			
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a	7 ^a	8 ^a	9 ^a
Controle (n=17)	320 a	287 a	291 a	267 a	263 a	270 a	285 a	406 a	464 a
Tratado (n=25)	277 b	241 b	191 b	168 b	193 b	209 b	214 b	248 b	253 b

Médias seguidas de letras distintas na vertical diferem entre si pelo teste t de student ($p \leq 0,05$).

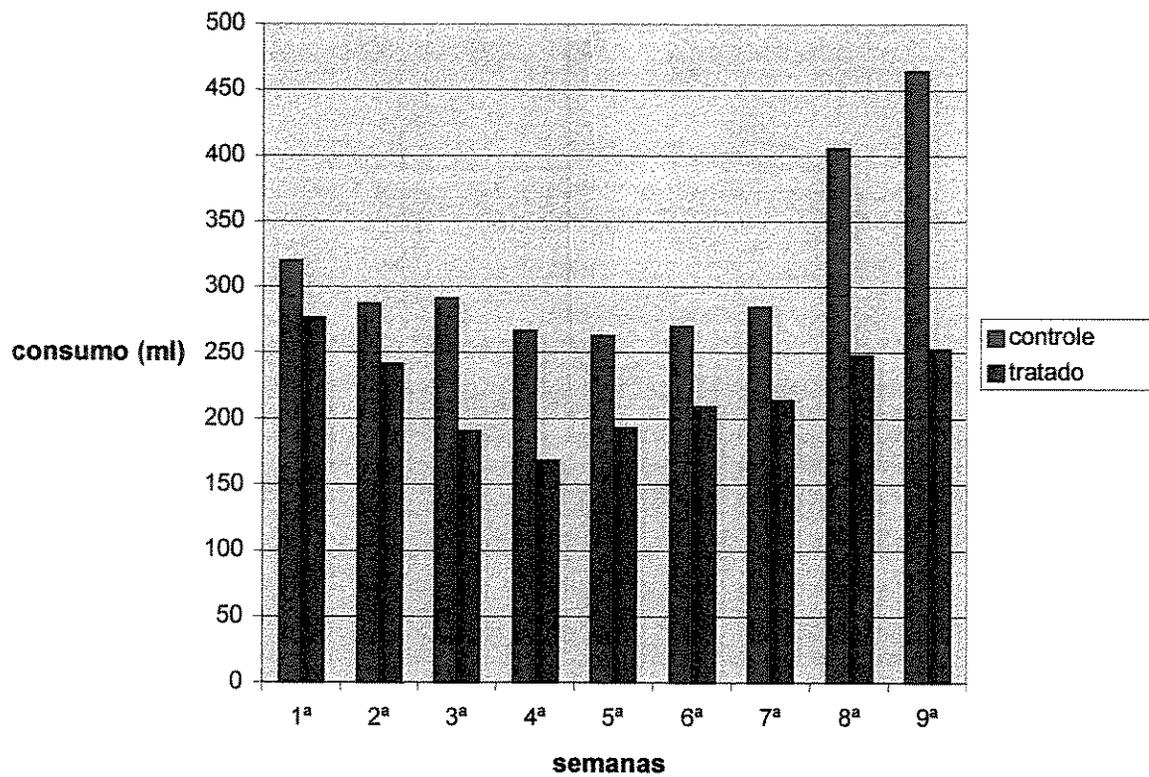


Figura 3 - Médias do consumo de água (ml) e da solução alcoólica (ml) de ratas adultas jovens dos grupos controle e tratado em cada semana do período de tratamento.

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

	Pré fertilização					Pós fertilização			
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a	7 ^a	8 ^a	9 ^a
Controle (n=17)	218	229	229	237 a	240 a	240 a	281 a	304 a	368 a
Tratado (n=25)	212	225	222	221 b	221 b	217 b	246 b	249 b	288 b

Médias seguidas de letras distintas na vertical diferem entre si pelo teste t de student ($p \leq 0,05$).

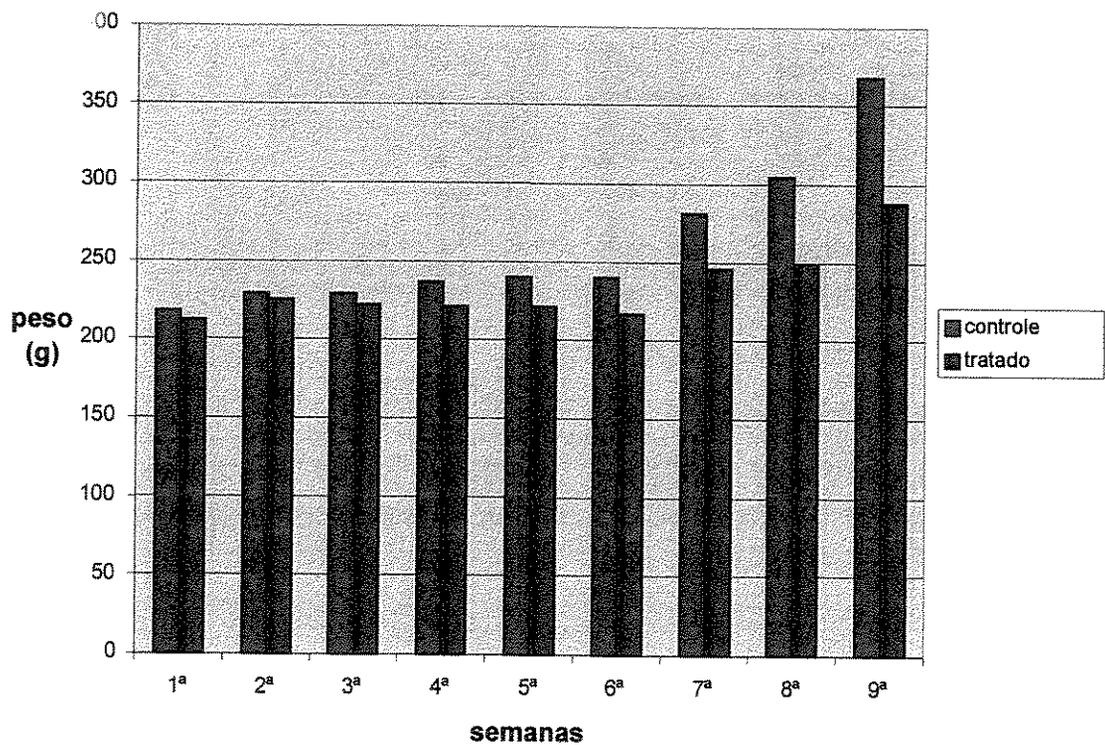


Figura 4 - Médias do peso corpóreo (g) de ratas adultas jovens dos grupos controle e tratado em cada semana do período de tratamento.

Tabela 3 - Resultados do período de pós fertilização.

	Controle (n=6)	Tratado (n=6)
Tempo de gravidez (dias)	21 b	22 a
Ganho de peso (g)	87 a	42 b
Nº total de filhotes	87	44
Nº de filhotes/rata	14,5 a	7,3 b
Taxa de mortalidade (%)	2,2	25*

Médias seguidas de letras distintas na horizontal diferem entre si pelo teste t de student ($p \leq 0,05$).

* Para a taxa de mortalidade foi usado o teste de Fisher.

5.1.2 Desenvolvimento dos filhotes

As Tabs.4 e 5 e Figs.5 e 6 demonstram os resultados obtidos do peso e comprimento crânio caudal de filhotes de ratas ao nascimento e no 5º dia de vida, em ambos os grupos, controle e tratado.

Podemos observar que, tanto as médias do peso quanto as médias do comprimento crânio caudal, foram menores nos filhotes do grupo tratado nos dois períodos estudados. Nas Figs.5 e 6 observa-se que o peso dos filhotes do grupo tratado mostrou uma redução maior do que o comprimento crânio caudal, em ambos os períodos estudados.

Tabela 4 - Médias e desvio padrão do peso corpóreo (g) de filhotes de ratas dos grupos controle e tratado.

	Peso				
	Controle		Tratado		Redução
	Média	D.padrão	Média	D.padrão	
Nascimento	6,04a	0,82	4,77b	0,23	21%
5ºdia de vida	9,58a	1,57	7,56b	0,47	21%

Médias seguidas de letras distintas na horizontal diferem entre si pelo teste t de student ($p \leq 0,05$).

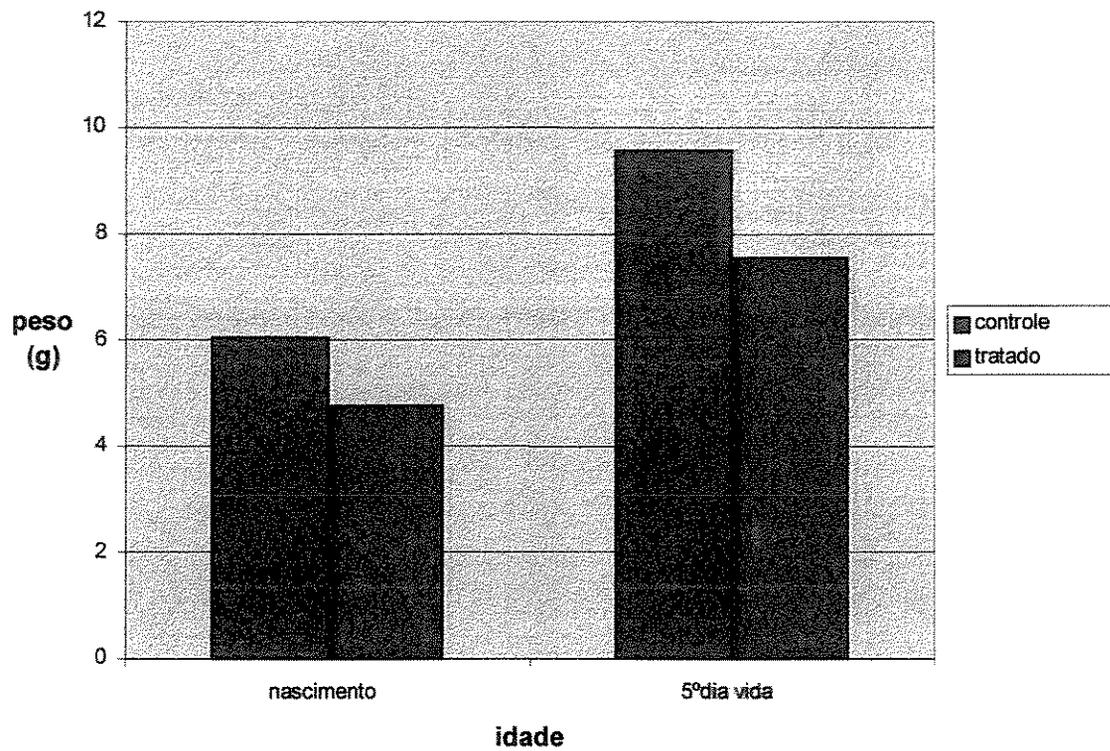


Figura 5 - Médias do peso corpóreo (g) de filhotes de ratas dos grupos controle e tratado.

Tabela 5 - Médias e desvio padrão do comprimento (mm) de filhotes de ratas dos grupos controle e tratado.

	Comprimento				
	Controle		Tratado		Redução
	Média	D.padrão	Média	D.padrão	
Nascimento	6,3a	0,33	5,82b	0,13	8%
5º dia de vida	8,58a	0,25	7,74b	0,26	10%

Médias seguidas de letras distintas na horizontal diferem entre si pelo teste t de student ($p \leq 0,05$).

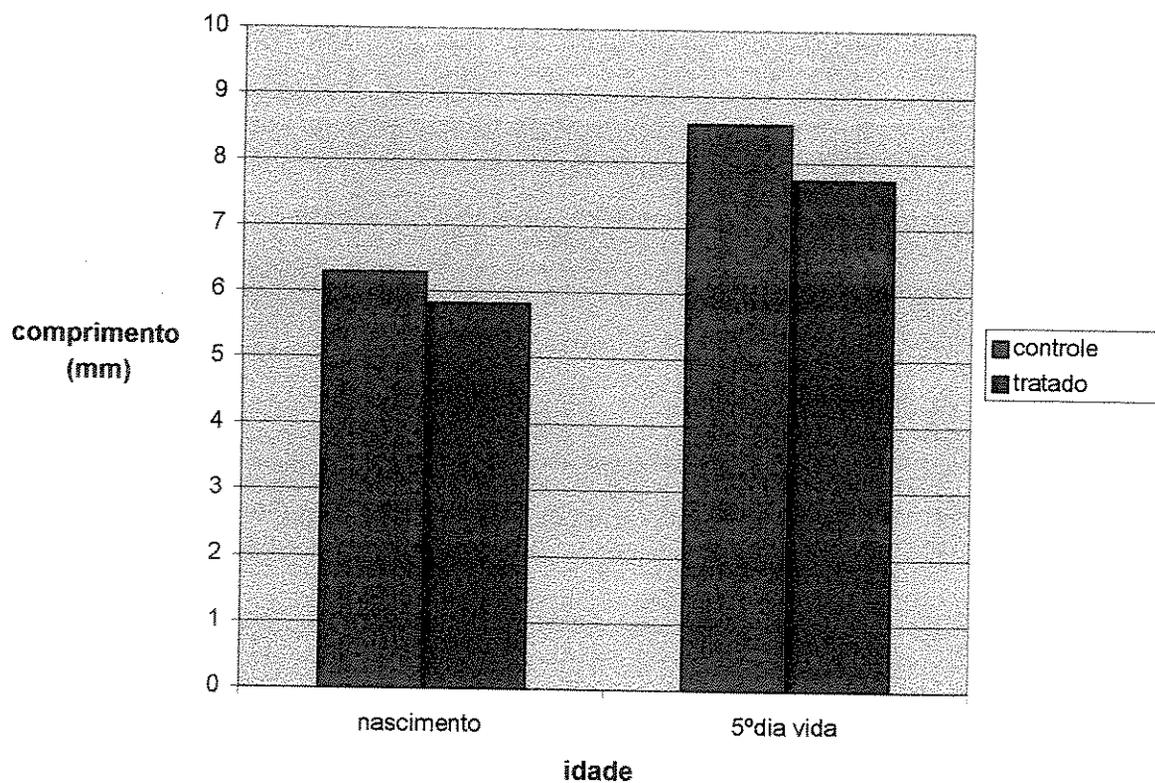


Figura 6 - Médias do comprimento (mm) crânio-caudal de filhotes de ratas dos grupos controle e tratado.

5.2. Desenvolvimento dental

5.2.1 Aspectos histológicos

Nesta etapa foram estudados os cortes histológicos dos germes dentários do 1º molar inferior de 18 espécimes de cada grupo, tratado e controle.

Durante o desenvolvimento, na fase de coroa, os germes dentários de ambos os grupos se apresentaram com todos seus elementos estruturais característicos desta etapa, ou seja, polpa dentina e esmalte (Fig.7).

Na Fig.8 observa-se a polpa ricamente celular e com grande número de vasos sanguíneos. Estes se concentravam na periferia da polpa, entre os prolongamentos odontoblásticos, entretanto na região cervical estavam distribuídos na parte central da polpa. Os odontoblastos se mostraram colunares, com aspecto normal.

A camada de dentina estava relativamente desenvolvida, sendo mais espessa na região oclusal e mais delgada na cervical. Subjacente à camada de dentina, notou-se a presença de pré-dentina com espessura semelhante à da dentina, exceto na região oclusal onde era aproximadamente metade da espessura. Uma camada de esmalte com espessura semelhante à da dentina se mostrou presente.

A Fig.9 mostra os ameloblastos como células altas, estreitas, justapostas umas às outras com núcleos alongados e localizados no pólo basal. Projetando-se

do ápice da célula, notou-se uma extensão citoplásmica inserida na matriz do esmalte. Ao longo das vertentes estes prolongamentos mostraram-se irregulares.

Nas extremidades apicais dos ameloblastos, entre os prolongamentos citoplasmáticos, observou-se a existência de barras terminais (Fig.9), assim como nas extremidades basais entre as paredes laterais dos mesmos (Fig.10). O citoplasma da região supranuclear mostrou a presença de grânulos densos, esféricos, de várias dimensões e em quantidade variável. Em alguns cortes observou-se que estes grânulos se concentravam nas proximidades do prolongamento do ameloblasto. Foram observados também vacúolos distribuídos aleatoriamente pelo citoplasma celular (Fig.10). Na região intercuspídea os prolongamentos sempre se mostraram paralelos entre si, com pouca variação no comprimento e largura dos mesmos (Fig.11).

O estrato intermédio se apresentou como uma única camada de células de forma achatada com núcleos arredondados e grandes (Fig.12). O retículo estrelado estava presente em toda extensão da coroa, sendo na região cervical menos desenvolvido do que na região oclusal. Suas células apresentavam núcleos ovóides e claros, prolongamentos citoplasmáticos longos e separados por largos espaços intercelulares. Outras células, esféricas e de tamanho maior, semelhantes a macrófagos, foram observadas. As mesmas encontravam-se nos espaços delimitados pelos prolongamentos das células estreladas. Foram ainda notados alguns vasos sanguíneos dispostos predominantemente junto ao estrato intermédio (Fig.13).

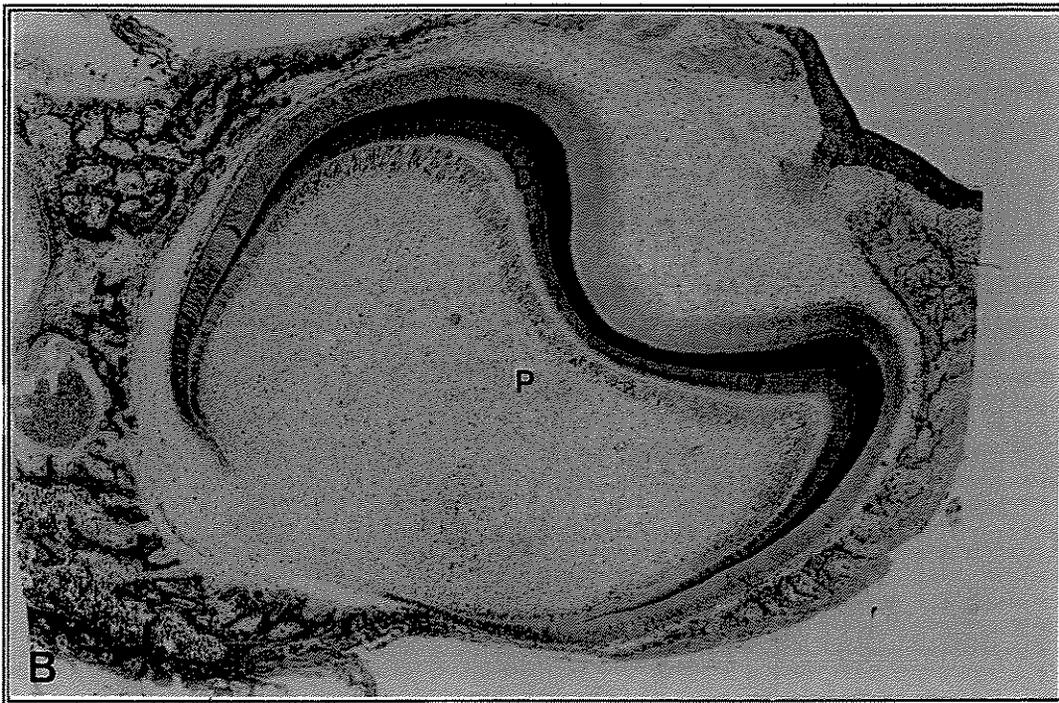


Figura 7 – Fotomicrografia do germe dentário do 1º molar inferior de ratos no 5º dia de vida com todos seus elementos característicos da fase inicial de coroa. A - Grupo controle B – Grupo tratado. Esmalte (E); dentina (D) e polpa (P). Azul de toluidina. Aumento original: 63x.

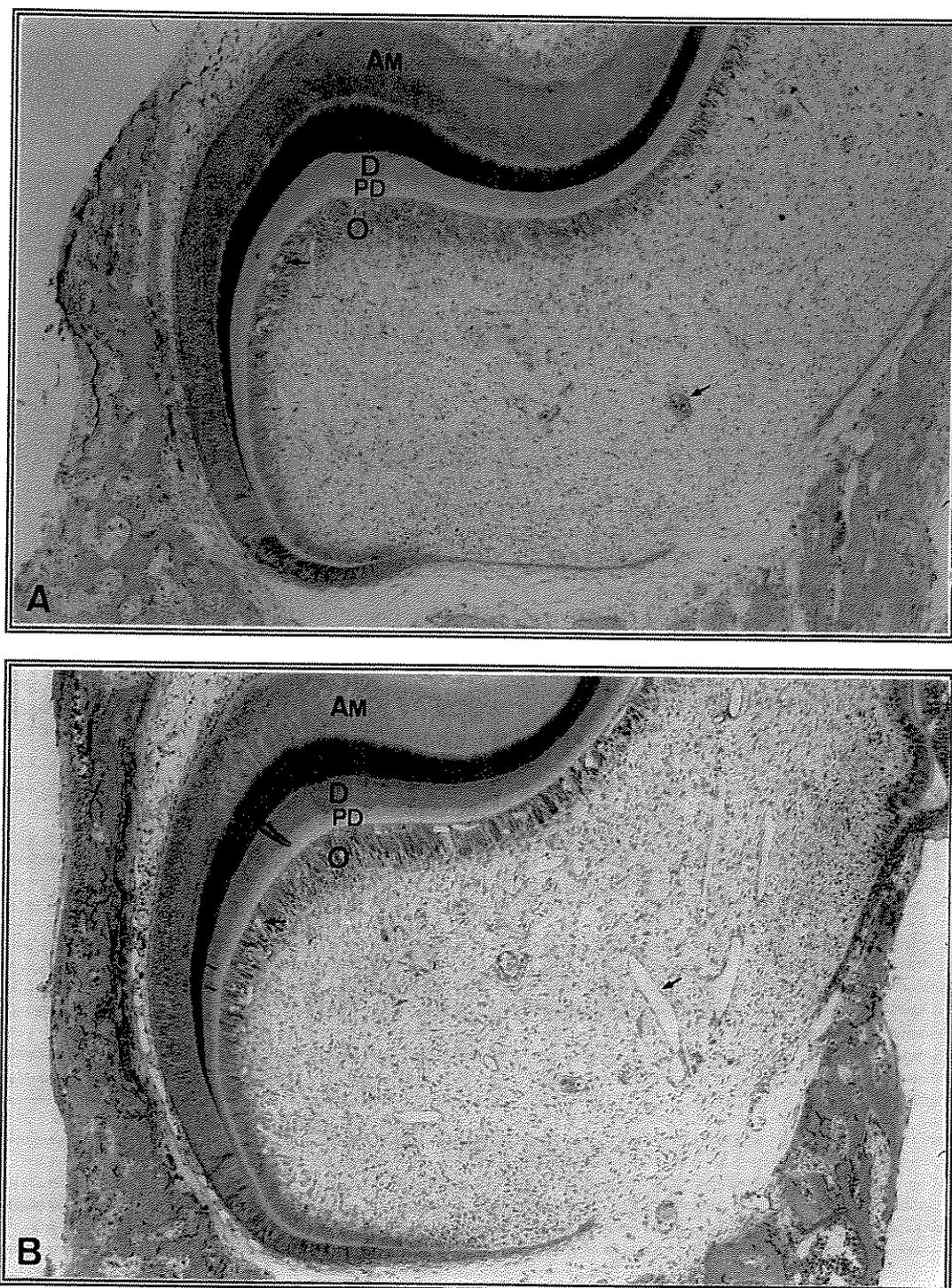


Figura 8 – Fotomicrografia da região da vertente lingual do germe dentário. A - Grupo controle B – Grupo tratado. Ameloblastos (AM); esmalte (E); dentina (D); pré dentina (PD); odontoblastos (O); polpa (P) com vasos sanguíneos (setas). Azul de toluidina. Aumento original: 100x.

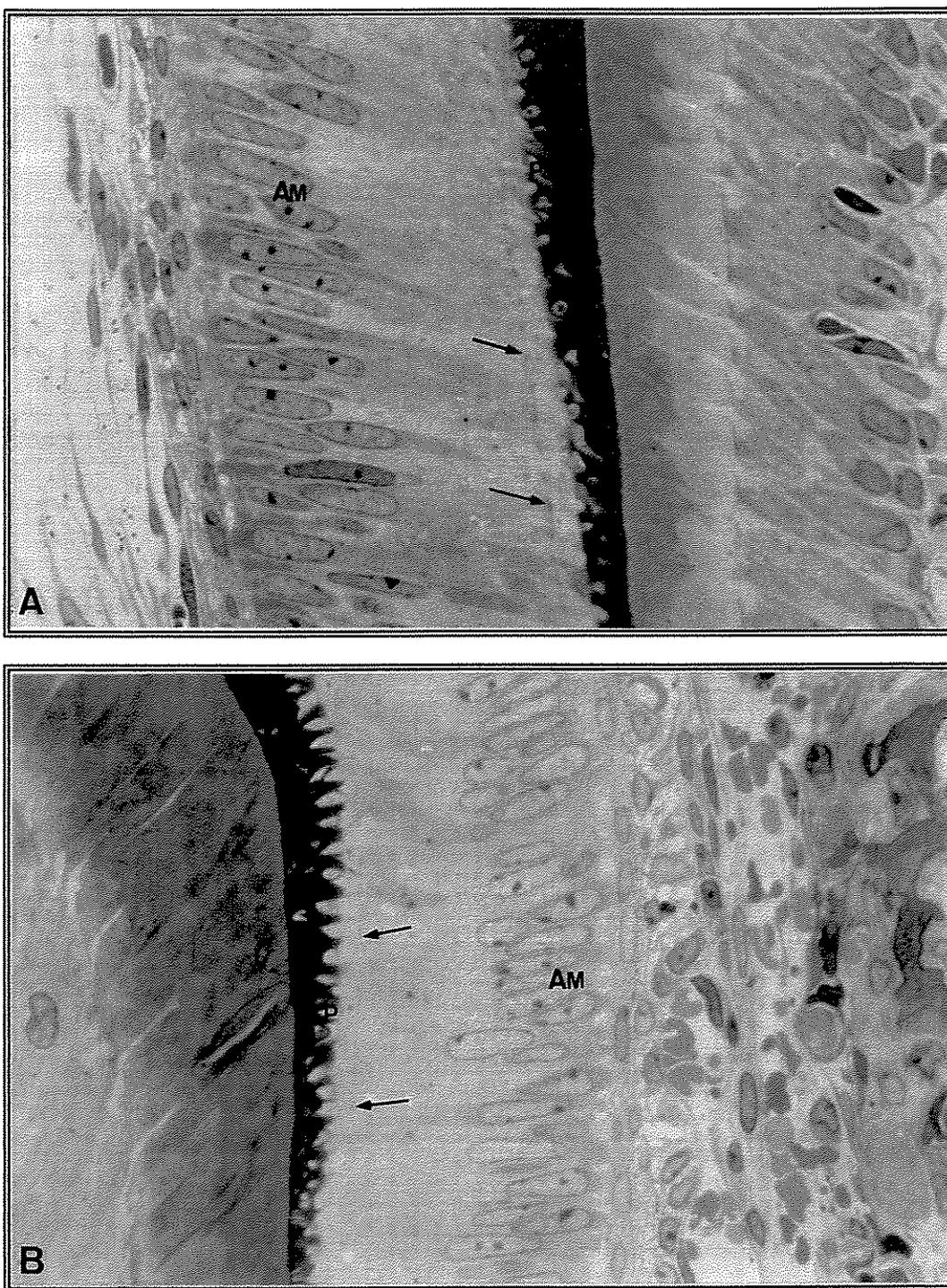


Figura 9 – Fotomicrografia da região da vertente lingual do germe dentário. A - Grupo controle B – Grupo tratado. Esmalte (E); ameloblastos (AM); prolongamentos dos ameloblastos (P) irregulares (P) e barras terminais (setas). Azul de toluidina. Aumento original 1000x.

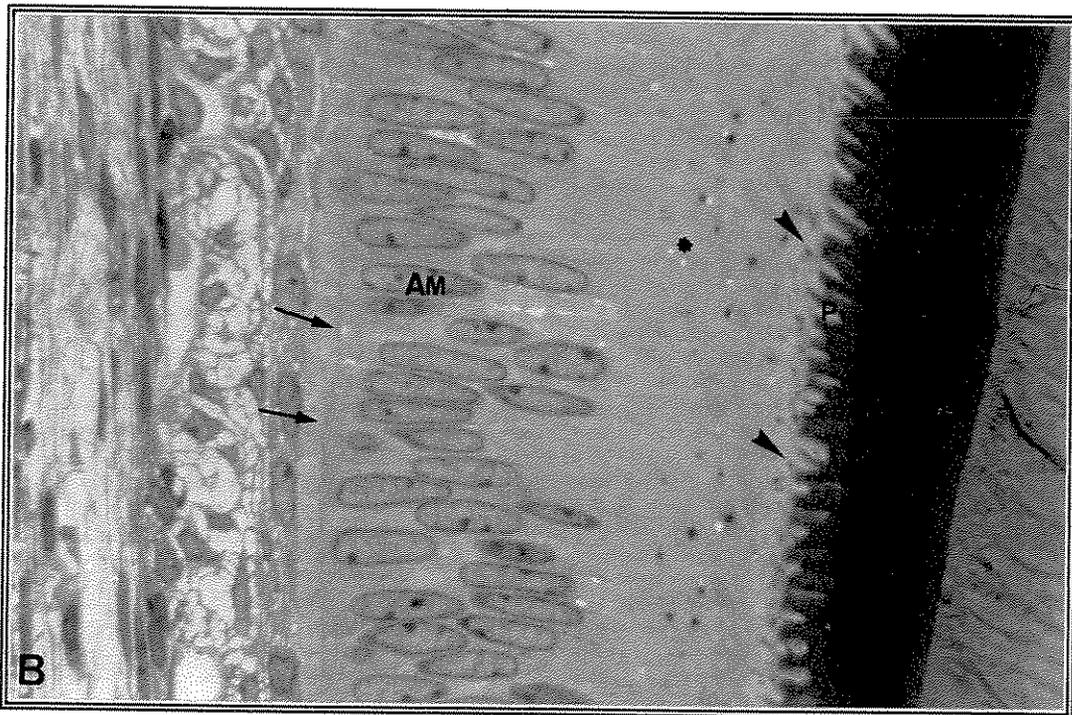
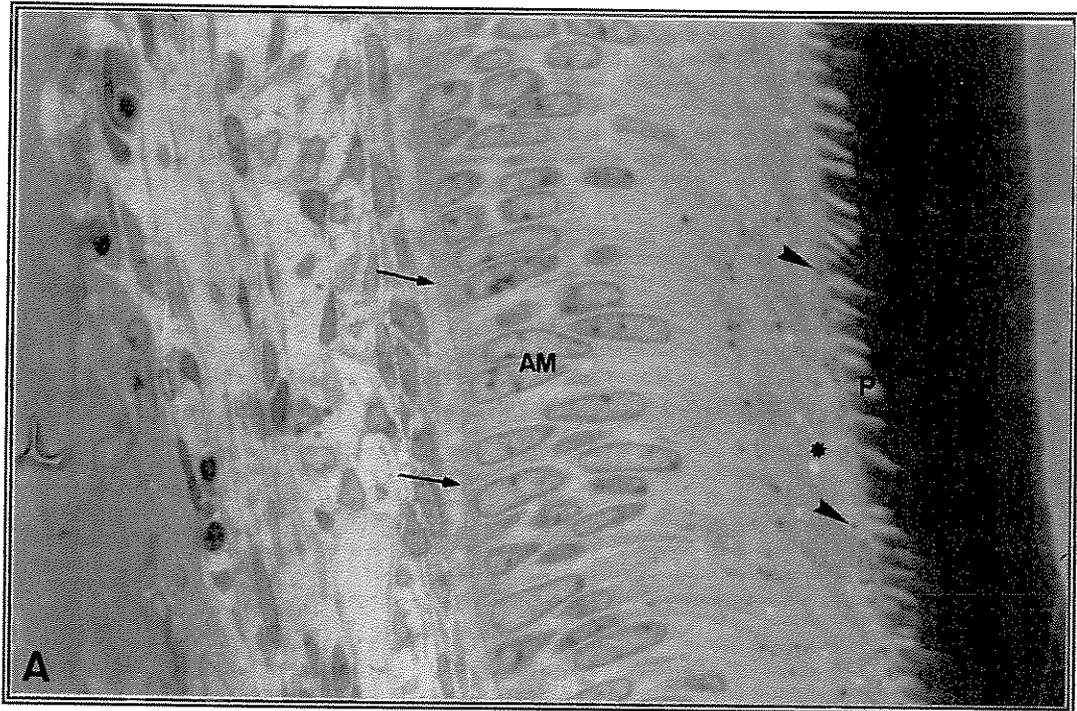


Figura 10 – Fotomicrografia da região da vertente lingual do germe dentário. A - Grupo controle B – Grupo tratado. Ameloblastos (AM); prolongamentos dos ameloblastos (P) irregulares dos; grânulos no citoplasma apical (cabeça de setas); vacúolos (*) e barras terminais (setas). Azul de toluidina. Aumento original: 1000x.

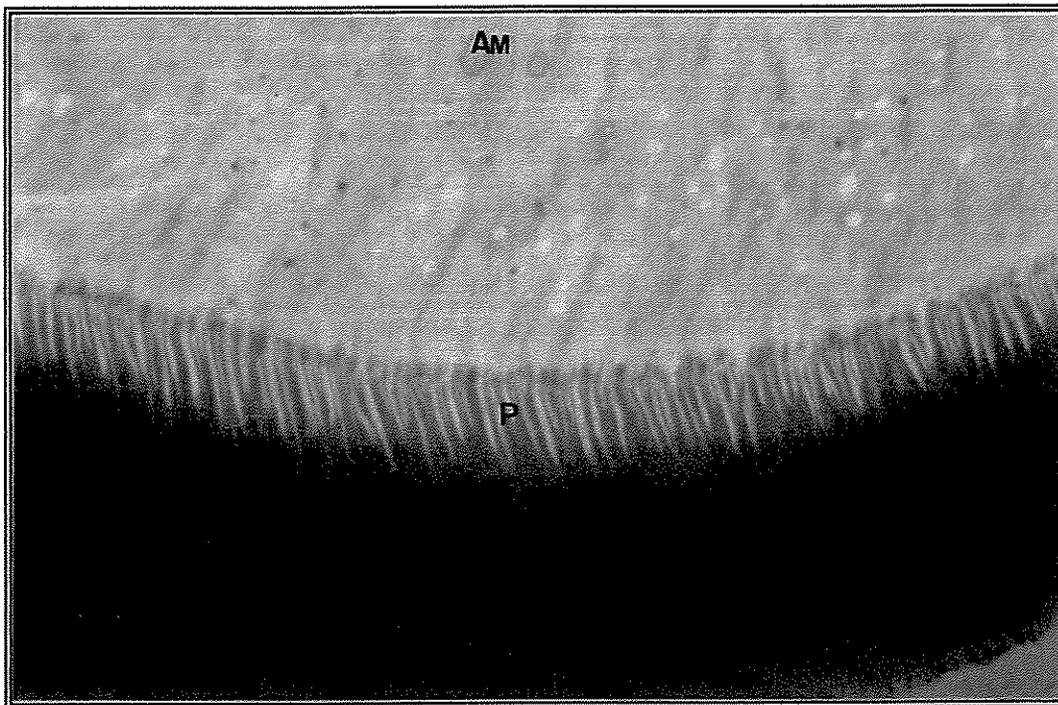
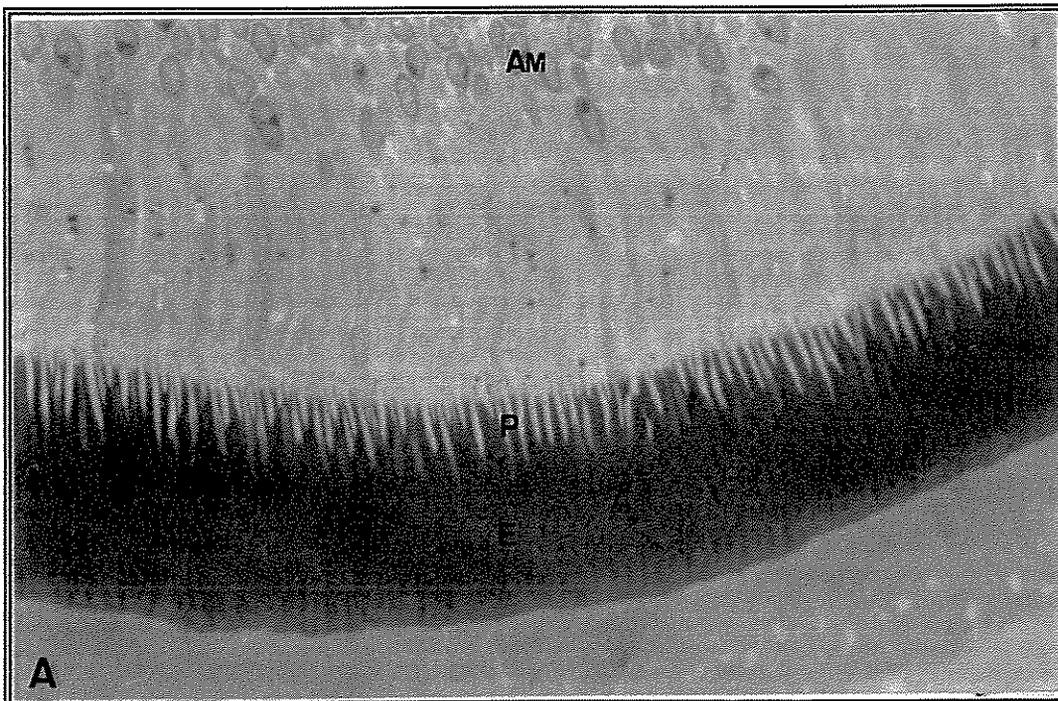


Figura 11 – Fotomicrografia da região intercuspídia do germe dentário.
A - Grupo controle B – Grupo tratado. Esmalte (E); ameloblastos (AM); prolongamentos dos ameloblastos (P) paralelos entre si. Azul de toluidina. Aumento original: 1000x.

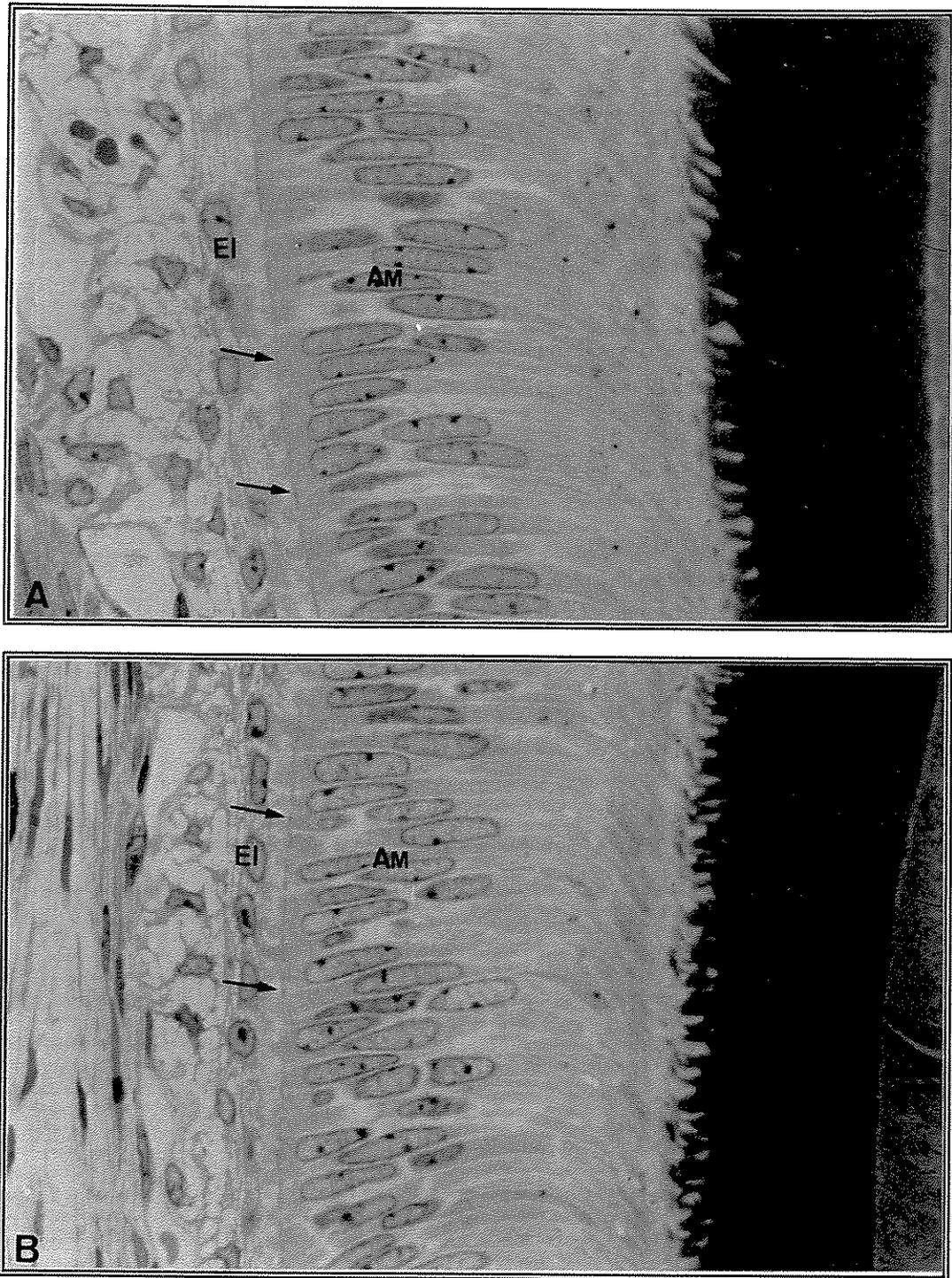


Figura 12 – Fotomicrografia da região da vertente lingual do germe dentário. A - Grupo controle B – Grupo tratado. Esmalte (E); ameloblastos (AM); estrato intermédio (EI) e barras terminais (setas). Azul de toluidina. Aumento original: 1000x.

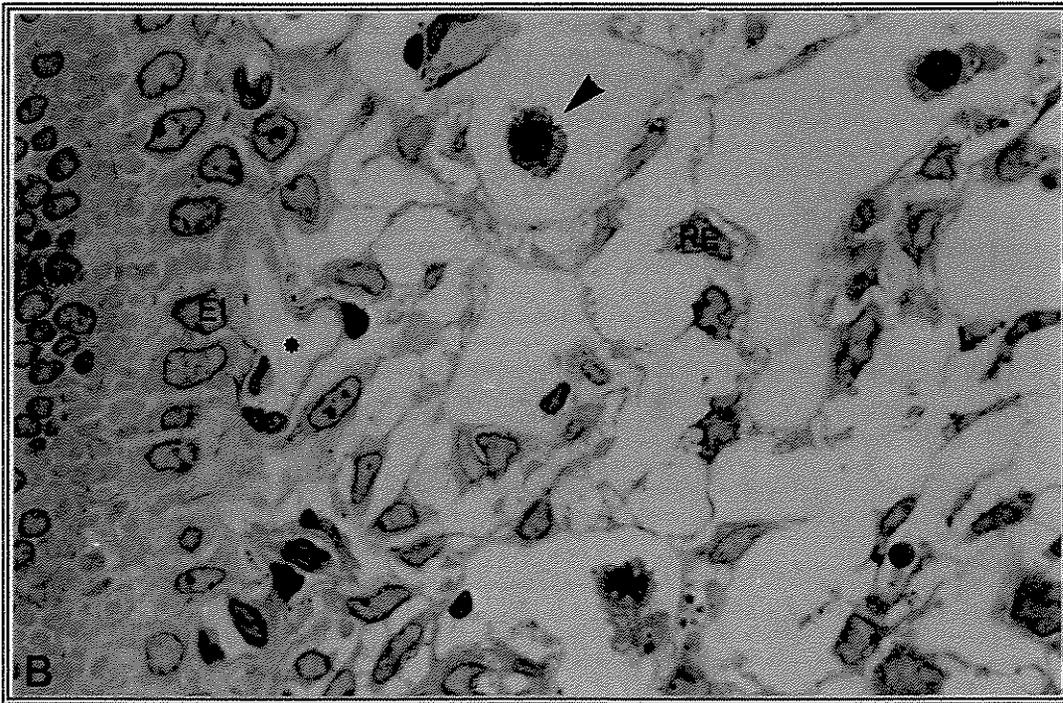
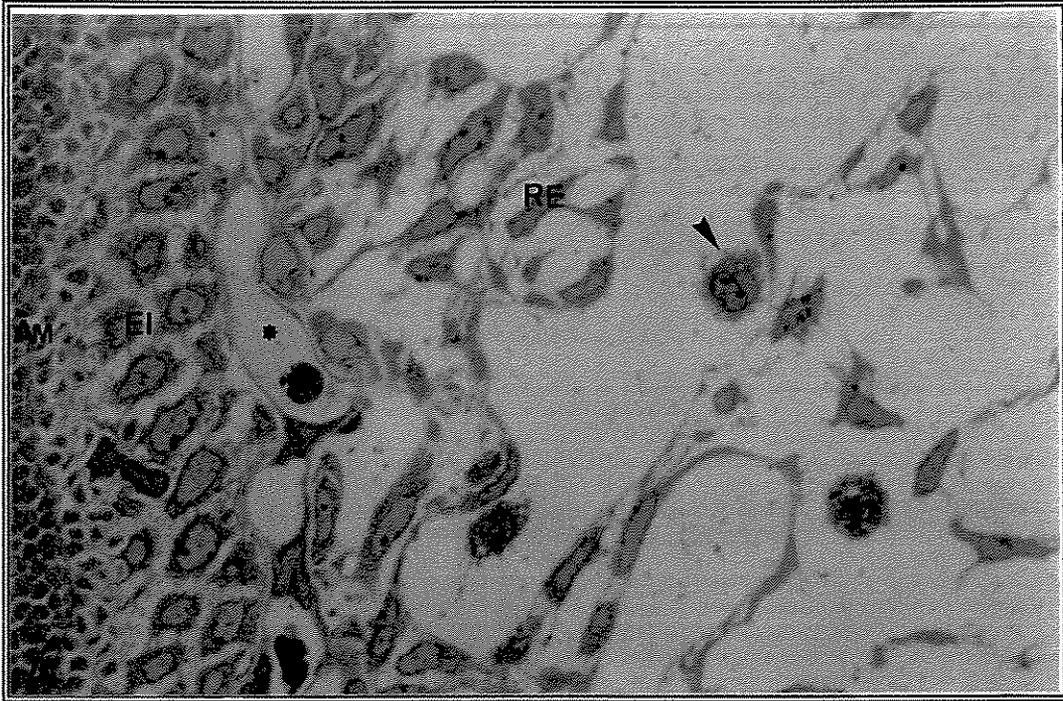


Figura 13 – Fotomicrografia da região oclusal do germe dentário.
 A - Grupo controle B – Grupo tratado. Reticulo estrelado (RE);
 macrófagos (cabeça de setas); vasos sanguíneos (*); estrato
 intermédio (EI) e ameloblastos (AM) Azul de toluidina. Aumento
 original: 1000x.

5.2.2 Aspectos histomorfométricos

Os resultados da análise histomorfométrica da matriz do esmalte e do germe dentário estão relacionados na Tab.6 e Fig.14. Os valores da densidade de volume da matriz do esmalte e do germe dentário nos filhotes do grupo tratado foram menores do que no grupo controle. A densidade de volume da matriz do esmalte mostrou uma redução em torno de 43%, e a densidade de volume do germe dentário uma redução em torno de 12%, nos animais do grupo tratado. Podemos destacar ainda que o volume da matriz do esmalte observado no grupo controle foi equivalente a 11% do volume total do germe dentário, enquanto que no grupo tratado foi apenas de 6,2%.

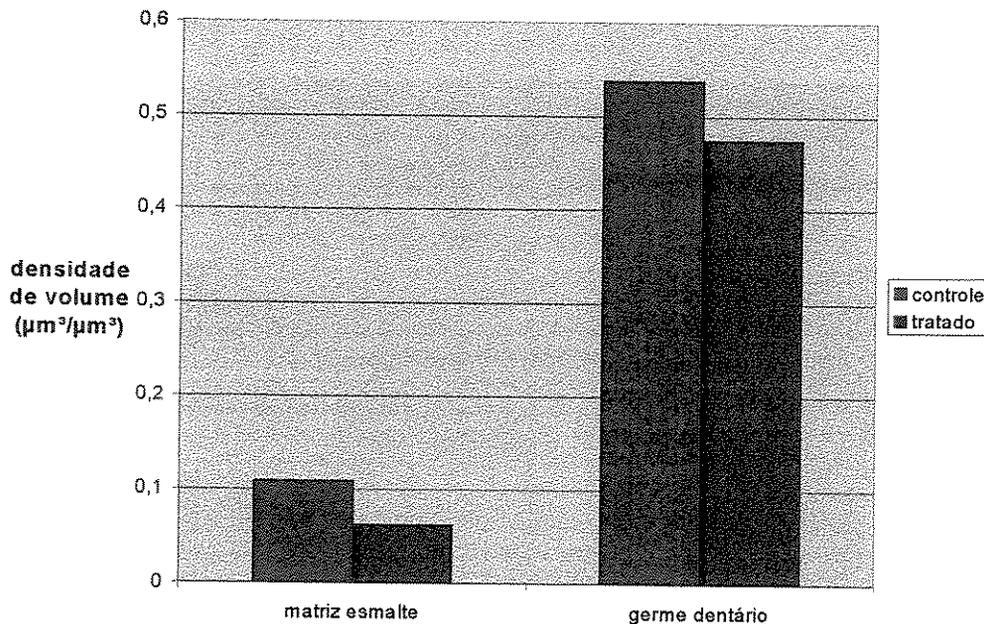


Figura 14 - Médias da densidade de volume ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$) da matriz do esmalte (Vve) e do germe dentário (Vvg) dos filhotes com 5 dias de vida dos grupos controle e tratado.

Tabela 6 – Médias e desvio padrão da densidade de volume ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$) da matriz de esmalte e do germe dentário de filhotes com 5 dias de vida dos grupos controle e tratado.

	Matriz do esmalte		Germe dentário	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado
Filhotes R1 (n=3)	0,121	0,083	0,584	0,477
Filhotes R2 (n=3)	0,129	0,056	0,533	0,480
Filhotes R3 (n=3)	0,090	0,046	0,576	0,499
Filhotes R4 (n=3)	0,103	0,047	0,542	0,489
Filhotes R5 (n=3)	0,090	0,067	0,486	0,457
Filhotes R6 (n=3)	0,119	0,071	0,506	0,439
Média (n=6)	0,109 a	0,062 b	0,538 a	0,474 b
D.padrão	0,016	0,014	0,038	0,021
Redução (%)		43		12

Médias seguidas de letras distintas na horizontal diferem entre si pelo teste t de student ($p \leq 0,05$).

6. DISCUSSÃO

Os autores são unânimes em afirmar que a ingestão crônica de álcool etílico durante a gestação, retarda o desenvolvimento dos tecidos e órgãos. BROWN et al. (1979), estudando embriões de ratos, *in vitro*, foram os primeiros a demonstrar os efeitos diretos do álcool na redução do crescimento e na diferenciação dos tecidos embrionários.

De fato, a interferência do álcool na proliferação celular foi relatada por SULIK & JOHNSTON (1983), os quais constataram, que a redução no tamanho da placa neural resultava no crescimento anormal do cérebro. Estudos mostraram que o álcool inibiu o desenvolvimento do cérebro com conseqüente redução no crescimento do crânio (CLARREN et al., 1978). SINGH et al. (1996) verificaram que o retardo no crescimento do cérebro observado nos animais tratados com álcool etílico era devido à diminuição de aproximadamente 40% nos níveis de IGF-I.

As malformações crânio faciais também têm sido relatadas associadas à alterações no crescimento celular, devido à interferência do álcool. De fato a redução no crescimento crânio facial tem sido descrita em ratos (EDWARDS et al., 1991) e camundongos (GUERRERO et al., 1998; WEBSTER et al., 1983) expostos ao álcool na vida pré natal. Outros estudos com microscopia eletrônica de varredura em embriões de camundongos no 14º dia de vida intra-uterina demonstraram alta incidência de malformações crânio faciais, dentre elas

ausência do osso da pré maxila ao 1º dia de vida dos filhotes (SULIK & JOHNSTON, 1983).

A hipoplasia maxilar e mandibular, também foram observadas em humanos. Um desenvolvimento incompleto da região média da face, particularmente a maxila, foi relatado por JACKSON et al. (1990). Segundo GUERRERO et al. (1998) e GUERRERO (1990), a redução nas medidas do crânio e da mandíbula pode ser uma manifestação do desenvolvimento neural e mesenquimal desorganizado. Ainda, GUERRERO (1990) encontrou redução significativa nas medidas de comprimento e altura da mandíbula, a qual pode ser explicada pelo efeito do álcool na atividade mitótica das células sobre a atividade mitótica do côndilo, visto que o mesmo desempenha importante papel no crescimento mandibular.

Segundo BARAN et al. (1982) o álcool desempenha um efeito direto sobre o metabolismo do cálcio e sobre o processo de ossificação. Entretanto, de acordo com JONES, K.L. et al. (1973) os efeitos subseqüentes do álcool sobre o metabolismo do cálcio nos filhotes não foram totalmente investigados, exceto a observação de uma hipocalcemia transitória nas crianças com a SFA. Efeitos sutís dessas alterações metabólicas podem persistir durante o desenvolvimento posterior, levando a alguns aspectos hipoplásicos da SFA (JONES, K.L. et al., 1973).

Em nossa pesquisa verificamos, através da análise histomorfométrica, que os germes dentários na fase de coroa do desenvolvimento apresentavam um desenvolvimento significativamente menor nos filhotes do grupo tratado com álcool

etílico, evidenciando a interferência do mesmo no processo de diferenciação e formação dos tecidos presentes nesta fase (Tab.6 e Fig.14).

Isto vem ao encontro dos achados de GUERRERO et al. (1996), os quais também observaram que os germes dentários dos filhotes de mães tratadas eram morfométricamente menores. Segundo este estudo a ingestão materna de álcool reduz a expressão do EGF no folículo dentário dos molares dos camundongos. Estudos realizados por PARTANE & THESLEFF (1987), sugerem que esse fator de crescimento exerce um papel significativo no desenvolvimento do germe dentário e na diferenciação das células mesenquimais. Portanto a redução no tamanho do germe dentário observada em nossa pesquisa poderia ser devida à inibição do EGF pelo álcool etílico.

SULIK et al. (1981) demonstraram que o álcool é um potente teratígeno, que exerce seus efeitos sobre a proliferação, migração e diferenciação das células da crista neural, resultando em menor desenvolvimento das estruturas dependentes da morfogênese dessas células.

O desenvolvimento normal do germe dentário está na dependência de uma série de eventos celulares ou processos fisiológicos que ocorrem durante o período pré natal (BALOGH & FEHRENBACH, 1997). As células da crista neural têm a capacidade de diferenciarem-se intensamente no embrião em desenvolvimento, dando lugar a variadas estruturas, dentre elas a maior parte do tecido conjuntivo embrionário da região facial e que contribui para o desenvolvimento dos dentes (TEN CATE, 1994). Sendo assim a interferência do

álcool sobre as células da crista neural poderia causar uma redução no tamanho do germe dentário.

O desenvolvimento do germe dentário de filhotes de camundongos ao 14,5º dia de vida intra uterina foi estudado por GUERRERO (1990), relatando um retardo na formação do botão epitelial, nos animais tratados, o qual apresentava-se constituído por células cuboidais densamente compactadas, enquanto nos controles o germe dentário em fase de botão apresentava-se composto de células cilíndricas na periferia e células poligonais na região central.

Já TOMAZELA et al. (1997) verificaram que o álcool etílico não altera a morfologia e o aparecimento da lâmina epitelial primária ao 14º dia de vida intra uterina em incisivos de ratos, assim como, o aspecto dos odontoblastos e a espessura da matriz dentinária observados no 1º dia de vida dos animais. Embora nosso trabalho não tenha permitido o estudo do germe dentário nesses períodos, a análise histomorfológica também não mostrou alterações evidentes nos elementos estruturais característicos do germe dentário na fase de coroa, dentre os quais odontoblastos, ameloblastos, estrato intermédio, retículo estrelado e epitélio externo. Estes apresentaram um desenvolvimento morfológico semelhante ao do grupo controle nessa fase do desenvolvimento (Figs.8 a 13).

Anteriormente CAMPOS & DURANZA (1988), observaram alterações celulares no germe dentário de molares de ratos na fase de botão e de capuz, sendo que as alterações mais relevantes foram encontradas no epitélio interno do esmalte do germe dentário. Considerando que estas células irão se diferenciar em ameloblastos e, assim, dar início à produção do esmalte, estas modificações

poderiam justificar a redução na matriz do esmalte encontrada em nosso trabalho (Tab.6 e Fig.14).

Com relação ao desenvolvimento dos tecidos dentários, a hipoplasia do esmalte foi observada como sendo uma manifestação encontrada entre 1% a 25% dos pacientes portadores da Síndrome Fetal Alcoólica (CLARREN & SMITH, 1978; JACKSON et al., 1990).

A análise histomorfométrica da matriz do esmalte mostrou que a espessura desta matriz era significativamente menor nos germes dentários dos filhotes do grupo tratado com álcool etílico (Tab.6 e Fig.14). Considerando que existe uma íntima interação mesênquima-ectoderma, onde os mecanismos indutores do primeiro influenciam a diferenciação dos ameloblastos, acreditamos que estes sofrem influências do álcool administrado nessa etapa de desenvolvimento e portanto interferência no processo secretório de sua matriz. Isto está de acordo com os estudos de GUERRERO (1990) onde observou-se que a falta de calcificação da matriz dentinária no 1,5º dia de vida dos animais tratados era devida à redução no número de células seguida de uma diminuição na função celular, as quais foram resultantes da interferência do álcool nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário.

Assim MATTHIESSEN & RÖMERT (1988), observaram modificações na ultraestrutura dos ameloblastos secretores em mini porcos, as quais indicaram um padrão de secreção anormal da matriz do esmalte. Ainda estes dois autores em 1984 verificaram nas células do fígado de fetos de mini porcos um acúmulo de secreção no complexo de Golgi, agregação das cisternas do retículo

endoplasmático granular, além de alterações na forma e tamanho das mitocôndrias. Estes achados evidenciaram que os hepatócitos mostraram sinais de injúria celular. Assim também, a redução na viabilidade celular, devido à desorganização e fragmentação dos microtubúlos foi demonstrada em cultura de células humanas expostas ao álcool etílico (BANAN et al., 1988). Segundo PÁR (1992) o acetaldeído, o qual é um produto do metabolismo do álcool, se liga à cisteína causando uma diminuição na quantidade de tubulina, a qual é necessária para a polimerização dos microtúbulos. Dessa maneira, ocorre uma redução na função secretora da célula.

Esses estudos estão de acordo com WESTERGAARD (1980) ao relatar que a tetraciclina quando administrada a ratos com quatro dias de vida ocasiona distúrbios no processo de secreção dos ameloblastos, os quais poderiam ser a causa do acúmulo de grânulos observados no citoplasma dos mesmos, com conseqüente redução no volume da matriz do esmalte. Embora este trabalho tenha utilizado outra droga, esses achados vêm corroborar a nossa pesquisa demonstrando também que o período da amelogênese em ratos é susceptível aos efeitos tóxicos de agentes químicos, como a tetraciclina e o álcool.

Uma importante conseqüência da exposição fetal ao álcool é a inibição da síntese proteica com resultante efeito no crescimento e maturação dos tecidos na fase embrionária (MICHAELIS et al., 1990; RANDALL et al., 1990). Anteriormente, RAWAT (1976) demonstrou uma diminuição do conteúdo proteico nas células do fígado de fetos de ratas tratadas com álcool. Em adição EDWARDS (1991) mostrou haver uma relação entre a diminuição na síntese proteica dos

osteoblastos com a redução no desenvolvimento crânio mandibular em filhotes de ratas tratadas com álcool

Um efeito direto da diminuição da síntese proteica é a menor quantidade de grânulos secretores formados a partir do complexo de Golgi, desde que um constante suprimento de novas proteínas é necessário para manter esta organela intacta (WEINSTOCK, 1970). Podemos então inferir, que a redução da matriz do esmalte poderá estar também relacionada com a diminuição do conteúdo proteico nos ameloblastos.

A intensidade dos efeitos do álcool sobre a formação dos tecidos parece não ser semelhante em todos eles. De fato, GARCIA et al. (1996) demonstraram um pronunciado e específico efeito do álcool sobre a atividade enzimática mitocondrial nas células do fígado e cérebro, mas um pequeno ou nenhum efeito sobre as células do coração. Assim também, WEBSTER (1983) observou que quando camundongos eram expostos ao álcool durante o 7º e 8º dias de gestação, os defeitos no embrião ocorriam nos tecidos da cabeça do mesmo. Já entre os 9º e 10º dias encontraram defeitos de desenvolvimento dos membros.

Por outro lado, a análise histomorfométrica realizada por ALVAREZ et al. (1991) demonstrou não haver diferença significativa no volume e comprimento das células do miocárdio de filhotes de ratas nos 2º ou 6º dias de vida. Entretanto, uma redução no número de células binucleadas mostrou-se presente ao 6º dia de vida dos animais. A variação no número de malformações relacionadas com os dias de tratamento sugerem que certos estágios do período organogênico são mais sensíveis ao álcool do que outros (WEBSTER, 1983).

HENDERSON et al. (1980) verificaram que a inibição da síntese proteica era maior nas células do fígado e do coração do que nas células do rim e do cérebro de fetos das ratas tratadas cronicamente com álcool durante a gestação.

Nossos estudos, neste sentido, estão de acordo com GARCIA et al. (1996); WEBSTER (1983); CLARREN et al. (1978); HENDERSON et al. (1980) ao demonstrar que o álcool ingerido durante a gravidez produziu uma resposta tecidual que aparentemente afetou mais um tecido do que outro. Assim verificamos que a redução na densidade de volume foi mais acentuada na matriz do esmalte do que no germe dentário como um todo. Isto pode ser melhor evidenciado na Tab.6 e Fig.14. O volume da matriz do esmalte observado no grupo controle foi equivalente a 11% do volume total do germe dentário, enquanto que no grupo tratado foi apenas de 6,2%. Já o volume do germe dentário no grupo controle foi igual a 54% da área teste, sendo que o volume do germe dentário no grupo tratado foi igual a 47% da área teste.

O fato da redução na densidade de volume da matriz do esmalte ter sido maior do que no germe dentário, sugere que os ameloblastos foram mais susceptíveis ao álcool etílico do que outras células, no mesmo período analisado. Isto está de acordo com PHILLIPS & KRUEGER (1992), ao dizer que existe uma resposta específica das células que estão em intensa atividade metabólica no momento da exposição ao álcool.

Visando complementar nossos estudos, obtivemos como parâmetros do desenvolvimento global, o peso e comprimento crânio caudal dos filhotes das ratas controles e tratadas com álcool.

Segundo JONES et al. (1973), CLARREN & SMITH (1978), COLES (1993), STREISSGUTH et al. (1980, 1991) e AUTTI-RÄMÖ et al. (1992) o álcool seria a causa do retardo no crescimento, tendo seus efeitos no peso e comprimento ao nascimento e posteriormente na estatura pós natal. Segundo CLARREN & SMITH (1978) a deficiência no crescimento reflete uma injúria durante o período pré-natal na proliferação celular resultando na redução do número de células e eventual limitação no tamanho das mesmas.

TOMAZELA et al. (1997) mostraram que o peso e comprimento crânio caudal foram semelhantes ao 1º dia de vida, em ambos os grupos, tratados e controles, porém estes parâmetros foram menores nos animais do grupo tratado quando comparados àqueles do grupo controle, ao 6º e 10º dias de vida, sendo, neste último período, as diferenças estatisticamente significantes. Já SILVA et al. (1999) observou que o peso e o comprimento crânio caudal nos filhotes do grupo tratado com álcool foram menores em todos os períodos estudados (1º, 5º, 10º, 15º, 20º, 25º e 30º dias de vida). Assim também, GUERRERO et al. (1998) verificaram a diminuição no peso dos filhotes do grupo tratado com álcool nos 1,5º e posteriormente aos 14.5; 21.5 e 28.5 dias de vida pós natal (GUERRERO et al., 1996).

O menor desenvolvimento global dos filhotes do grupo tratado, observado em nossa pesquisa e determinado pelo peso e comprimento crânio-caudal, pode ser atribuído à interferência do álcool sobre os mecanismos de desenvolvimento embriogênicos, desde que esse foi o único fator teratogênico em evidência.

De acordo com JACKSON et al. (1990) as crianças afetadas com SFA têm uma redução no peso ao nascimento maior do que a estatura.

Observando a Tab.4 e 5 podemos notar que no grupo tratado o peso corpóreo ao nascimento foi 21% menor, enquanto que a redução no comprimento foi de 8%. Assim também, GARCIA et al. (1996) notaram uma redução de 20% no peso dos filhotes de mães tratadas com álcool durante a gravidez.

Entretanto, nossos resultados diferem em parte daqueles encontrados por TOMAZELA et al. (1997) onde, tanto o peso, como o comprimento crânio caudal dos filhotes foram equivalentes ao nascimento em ambos os grupos, controle e tratado. Podemos considerar que essas diferenças foram devidas às variações nos padrões de administração do álcool e no tempo de exposição a 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., 1983).

Em nosso trabalho, foi observado que além das ratas tratadas terem um peso menor, elas apresentaram 50% menos filhotes do que as ratas controles (Tabs.2 e 3 e Fig.2). Estes dados estão de acordo com os achados por STREISSGUTH et al. (1980); ABEL (1982); WEBSTER et al. (1983); GUERRERO et al. (1996); GUERRERO et al. (1998); GUERRERO (1990).

Na Tab.3 podemos observar que o ganho de peso das ratas controles foi 50% maior do que o das tratadas com álcool etílico. Assim também, a diferença entre o número de filhotes de ambos os grupos, controle e tratada foi

aproximadamente igual a 50%, ou seja 50% do peso das ratas equivale a mais ou menos 50% dos filhotes. Portanto, devemos considerar que o número de filhotes está diretamente relacionado ao ganho de peso materno durante a gestação. De fato, a redução no peso das ratas tratadas com álcool pode ser atribuída ao menor número de filhotes nascidos destas, desde que a proporção entre o ganho de peso materno e o número de filhotes foi similar em ambos os grupos (SANCHIS & GUERRI, 1986).

O aumento da mortalidade pós-natal em animais expostos ao álcool no período pré-natal foi notado por ABEL (1982); STREISSGUTH et al. (1980) e SILVA et al. (1999). Assim, nós verificamos também no grupo tratado um aumento da taxa mortalidade equivalente a 25%, enquanto que no grupo controle esta taxa foi apenas 2% (Tab.3).

O mecanismo teratogênico do álcool ainda não está bem definido. Entretanto, algumas justificativas são propostas, tais como hipóxia fetal, deficiência no transporte de nutrientes através da placenta, deficiência nutricional e alteração no metabolismo do cálcio (MICHAELIS, 1990).

De acordo com CHERNOFF (1980) as reabsorções embrionárias, as malformações e a redução no peso fetal ao 18º dia de vida intrauterina de ratos estavam relacionadas com o nível de álcool no sangue materno. Segundo o autor isto pode ser evidenciado pela relação direta entre dano fetal e o nível de álcool no sangue das mães.

Segundo GUERRERO et al. (1998), a ingestão prolongada de álcool está freqüentemente associada à hábitos de dietas pobres nos humanos. Sabe-se que

o álcool interfere na absorção intestinal de nutrientes. Assim pode ser que o baixo peso ao nascimento em crianças com a SFA seja influenciado por deficiências nutricionais.

Entretanto, estudos in vitro realizados em embriões de ratos (BROWN, 1979), em embriões de galinhas (PENNINGTON & KALMUS, 1987) e em células humanas (BANAN et al., 1988), onde as influências maternas são eliminadas, demonstraram que o álcool exerce efeito direto na proliferação, na diferenciação e na síntese proteica resultando, assim, no retardo do desenvolvimento dos tecidos embrionários.

Dessa maneira ABEL (1982); GUERRERO et al. (1996, 1998); RAWAT (1976) e STREISSGUTH et al. (1980) concluíram que os efeitos nas células são devido primeiramente ao álcool por si só e não por fatores secundários associados ao abuso do álcool, i.e., má nutrição e fumo, embora estes sejam capazes de exarcebar o potencial teratogênico do álcool.

Em vista do exposto acreditamos que nosso trabalho vem contribuir de alguma forma para esclarecer alguns aspectos da ingestão do álcool etílico durante a gestação sobre o desenvolvimento do germe dentário e especificamente sobre a formação da matriz do esmalte, bem como, o desenvolvimento pós-natal (peso e comprimento) de filhotes de ratas.

7. CONCLUSÕES

Dentro das condições experimentais deste trabalho, com base nos resultados obtidos, podemos concluir que:

1 – O álcool etílico ingerido durante a gestação, causou uma redução no tamanho do germe dentário e na secreção da matriz do esmalte, estatisticamente significativa.

2 – Os efeitos do álcool etílico foram mais acentuados sobre a amelogenese do que sobre o germe dentário como um todo.

3 - A matriz do esmalte, os ameloblastos e o estrato intermédio, apresentaram características estruturais semelhantes nos animais de ambos os grupos.

4 – O álcool etílico causou um retardo no desenvolvimento dos filhotes, o qual foi evidenciado pelo peso e comprimento menores, tanto ao nascimento, quanto no 5º dia de vida. A redução no peso corpóreo foi maior do que no comprimento crânio-caudal.

5 – As ratas tratadas com álcool tiveram um peso menor do que as controles, assim como redução no número de filhotes e um aumento da taxa de mortalidade ao nascimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. ABEL, E.L. Consumption of alcohol during pregnancy: a review of effects on growth and development of offspring. **Hum Biol**, Detroit, v.54, n.3, p.421-453, 1982.
2. ALVAREZ, M.R. *et al.* Results of prenatal alcohol exposure on the dimensions and binucleation of cardiac myocytes in neonatal and weaning rats. **Teratology**, New York, v.44, n.4, p.395-404, Oct. 1991.
3. AUTTI-RÄMÖ, I., GAILY, E., GRANSTRÖM, M.L. Dysmorphic features in offspring of alcoholic mothers. **Arch Dis Child**, London, v.67, n.6, p.712-716, June 1992.
4. BALOGH, M.B., FEHRENBACH, M.J. **Illustrated dental embryology, histology, and anatomy**. Philadelphia : Saunders, 1997. Chap.3, p.29-39.
5. BANAN, A. *et al.* Protection against ethanol injury by prostaglandin in human intestinal cell line: role of microtubules. **Am J Physiol**, Bethesda, v.274, n.1 pt.1, p.G111-G121, Jan. 1998.
6. BARAN, D.T., BRYANT, C., ROBSON, D. Alcohol-induced alterations in calcium metabolism in pregnant rat. **Am J Clin Nutr**, Bethesda, v.36, n.1, p.41-44, July 1982.
7. BROWN, N.A., GOULDING, E.H., FABRO, S. Ethanol embryotoxicity: direct effects on mammalian embryos in vitro. **Science**, Washington, v.206, n.2, p.573-575, 1979.

* De acordo com a NBR-6023 de 1989, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Abreviaturas de periódicos de conformidade com o INDEX MEDICUS

8. CAMPOS, R.M., DURANZA, M.C. Efectos del consumo prolongado de etanol sobre las etapas tempranas del desarrollo dentario en ratones. **Rev Cubana Invest Biomed**, La Habana, v.7, p.30-35, 1988.
9. CHALKLEY, H.W. Method for quantitative morphologic analysis of tissues. **J Natl Cancer Inst**, Bethesda, v.4, p.47-53, 1943.
10. CHERNOFF, G.F. The fetal alcohol syndrome in mice: maternal variables. **Teratology**, New York, v.22, n.1, p.71-75, Aug. 1980.
11. CHURCH, M.W. *et al.* Hearing, language, speech, vestibular, and dentofacial disorders in fetal alcohol syndrome. **Alcohol Clin Exp Res**, Baltimore, v.21, n.2, p.227-237, 1997.
12. CLARREN, S.K., SMITH, D.S. The fetal alcohol syndrome. **New Engl J Med**, Waltham, v.298, n.19, p.1063-1067, 1978.
13. _____. *et al.* Brain malformations related to prenatal exposure to ethanol. **J Pediatr**, Sait Louis, v.92, n.1, p.64-67, 1978.
14. COLES, C.D. Impact of prenatal alcohol exposure on the newborn and the child. **Clin Obstet Gynecol**, Philadelphia, v.36, n.2, p.255-266, 1993.
15. DAVIS, W.L. *et al.* Ethanol induces the generation of reactive free radicals by neural crest cells in vitro. **J Craniofac Genet Dev Biol**, Copenhagen, v.10, n.3, p.277-293, 1990.
16. DELESSE, M.A. (1847) *Apud* WEIBEL, E.R. *Op. cit.* Ref. 59.
17. EDWARDS, H.G., DOW-EDWARDS, D.L. Craniofacial alterations in adult rats prenatally exposed to ethanol. **Teratology**, New York, v.44, n.4, p.373-378, Oct. 1991.

18. FADEL, R.A., PERSAUD, T.V. Effects of alcohol and caffeine on cultured whole rat embryos. **Acta Anat (Basel)**, Basel, v. 144, n.2, p.114-119, 1992.
19. GARCIA, J.M., ANANTHAKRISHNAN, R., GOLDENTHAL, M.J. Mitochondrial dysfunction after fetal alcohol exposure. **Alcohol Clin Exp Res**, Baltimore, v.20, n.6, p.1029-1032, 1996.
20. GLAGOLEFF, A.A. (1933) *Apud* WEIBEL, W.R. *Op. cit.* Ref. 59.
21. GUERRERO, J.C.H., MONTES, C.L., RODRIGUEZ, P.L. Effects of maternal ethanol intake on second alcoholic generation murine skull and mandibular size. **Arch Med Res, México**, v.29, n.4, p.297-302, 1998.
22. _____. *et al.* Immunoexpression of epidermal growth factor in odontogenesis of the offspring of alcoholic mice. **Bol Estud Med Biol, México**, v.44, p.25-35, 1996.
23. GUERRERO, J.C.H. Morphologic effects of maternal alcohol intake on skull, mandible and tooth of the offspring in mice. **Jpn J Oral Biol**, Tokyo, v.32, p.460-469, 1990.
24. HENDERSON, G.I. *et al.* Effect of ethanol and ethanol-induced hypothermia on protein synthesis in pregnant and fetal rats. **Alcohol Clin Exp Res**, Baltimore, v.4, n.2, p.165-177, 1980.
25. JACKSON, I.T., HUSSAIN, K. Craniofacial and oral manifestations of fetal alcohol syndrome. **Plast Reconstr Surg**, Baltimore, v.85, n.4, p 505-512, Apr. 1990.
26. JONES, K.L. *et al.* Pattern of malformations in offspring of chronic alcoholic mothers. **Lancet**, London, v.1, n.7815, p.1267-1271, June 1973.

27. KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **J Cell Biol**, New York, v.27, p.137-138, 1965.
28. LEMOINE, P., HAROUSSEAU, H., BORTEYRU, J.P. Les enfants de parents alcooliques: anomalies observées. **Ouest Med**, Paris, v.25, p.476-482, 1968.
29. MICHAELIS, E.K. Fetal alcohol exposure: cellular toxicity and molecular events involved in toxicity. **Alcohol Clin Exp Res**, Baltimore, v.14, n.6, p.819-826, Dec. 1990.
30. MILLER, M.W. Effect of prenatal exposure to alcohol on the distribution and time of origin of corticospinal neurons in the rat. **J Comp Neurol**, New York, v.257, n.3, p.372-382, Mar. 1987.
31. MILLER, M.W. Migration of cortical neurons is altered by gestacional exposure to ethanol. **Alcohol Clin Exp Res**, Baltimore, v.17, n.2, p.304-314, 1993.
32. PÁR, A. Pathogenesis and management of alcoholic liver injury. **Acta Physiol Hung**, Budapest, v.80, n.1/4, p.325-350, 1992.
33. PARTANE, A.M., THESLEFF, I. Localization and quantitation of 125I-epidermal growth factor binding in mouse embrionic tooth and other embrionic tissues at different development stages. **Dev Biol**, Orlando v.120, n.1, p.186-197, Mar. 1987.
34. PENNINGTON, S., KALMUS, G. Brain growth during ethanol-induced hypoplasia. **Drug Alcohol Depend**, Limerick, v.20, n.3, p.279-286, Nov. 1987.

35. PHILLIPS, D.E., KRUEGER, S.K. Effects of combined pre- and posnatal ethanol exposure (three trimester equivalency) on glial cell development in rat optic nerve. **Int J Dev Neurosci**, Oxford, v.10, n.3, p.197-206, 1992.
36. RANDALL, C.L., EKBLAD, U., ANTON, R.F. Perspectives on the pathophysiology of fetal alcohol syndrome. **Alcohol Clin Exp Res**, Baltimore, v.14, n.6, p.807-812, 1990.
37. RAWAT, A.K. Effect of maternal ethanol consumption on fetal and neonatal rat hepatic protein synthesis. **Biochem J**, London, v.160, n.3, p.653-661, Dec. 1976.
38. RÖMERT, P., MATTHIESSEN, M.E. Changes of secretory ameloblasts in mini-pig fetuses exposed to ethanol in vivo. **J Dent Res**, Washington, v.67, n.11, p.1402-1404, 1988.
39. RÖMERT, P., MATTHIESSEN, M.E. Fine structure of hepatocytes from mini-pig fetuses exposed to alcohol (ethanol) in vivo. **Acta Anat (Basel)**, Basel, v.120, n.4, p.190-195, 1984.
40. SANCHIS, R., GUERRI, C. Alcohol-metabolizing enzymes in placenta and fetal liver: effect of chronic ethanol intake. **Alcohol Clin Exp Res**, Baltimore, v.10, n.1, p.39-44, 1986.
41. SILVA, K.C. *et al.* Efeitos do álcool sobre o desenvolvimento pós eruptivo de dentes incisivos de ratos. JORNADA ACADÊMICA CERVANTES JARDIM, 13., São José dos Campos. **Anais...** São José dos Campos, 1999. p.50.
42. SINGH, S.P., EHMANN, S., SNYDER, A.K. Ethanol-induced changes in insulin-like growth factors and IGF gene expression in the fetal brain. **Proc Soc Exp Biol Med**, Cambridge, v.212, n.4, p.349-354, Sept. 1996.

43. SLAVKIN, H.C. **Meeting the challenges of craniofacial-oral-dental birth defects. National Institute of Dental Research.** [online] Available from Internet: http://www.nidcr.nih.gov/slavikin/birth_df.htm. [Cited 30/01/1999]
44. SOKOL, R.J., CLARREN, S.K. Guidelines for use of terminology describing the impact of prenatal alcohol on the offspring. **Alcohol Clin Exp Res**, Baltimore, v.13, n.4, p.597-598, July/Aug. 1989.
45. STREISSGUTH, A.P. *et al.* Fetal alcohol syndrome in adolescents and adults. **JAMA**, Chicago, v.265, n.15, p.1961-1967, 1991.
46. STREISSGUTH, A.P. *et al.* Teratogenic effects of alcohol in humans and laboratory animals. **Science**, Washington, v.209, n.18, p.353-361, 1980.
47. SULIK, K.K. Critical periods for alcohol teratogenesis in mice, with special reference to the gastrulation stage of embriogenesis. **Ciba Found Symp**, Amsterdam, v.105, p.124-141, 1984.
48. _____, JOHNSTON, M.C. Sequence of development alterations following acute ethanol exposure in mice: craniofacial features of the fetal alcohol syndrome. **Am J Anat**, New York, v.166, n.3, p.257-269, Mar. 1983.
49. _____, _____, WEBB, M.A. Fetal Alcohol Syndrome: Embryogenesis in mouse model. **Science**, Washington, v.214, n.20, p.936-938, 1981.
50. _____. *et al.* Fetal alcohol syndrome and DiGeorge anomaly: Critical ethanol exposure periods for craniofacial malformations as illustrated in an animal model. **Am J Med Genet Suppl**, New York, v.2, p.97-112, 1986.
51. TEN CATE, A.R. General embryology. _____. **Oral histology development, structure, and function.** 4th ed. Saint Louis : Mosby, 1994. Chap.1, p.7-14.

52. TOMAZELA, S.A., SALGADO, M.A.C., ARANA-CHAVES, V.E. Efeitos do álcool etílico no desenvolvimento dos incisivos de ratos. **An Soc Bras Pesqui Odontol**, São Paulo, v.14, p.69, ago./set. 1997. [Resumo, 128]
53. WARSHAWSKY, H., MOORE, G. A technique for the fixation and the decalcification of rat incisors for electron microscopy. **J Histochem Cytochem**, New York, v.15, n.9, p.542-549, Sept. 1967.
54. WEBSTER, W.S. *et al.* Alcohol and congenital heart defects: an experimental study in mice. **Cardiovasc Res**, Amsterdam, v.18, n.6, p.335-333, June 1984.
55. _____. *et al.* Some teratogenic properties of ethanol and acetaldehyde in C57BL/6J mice: implications for the study of the fetal alcohol syndrome. **Teratology**, New York, v.27, n.2, p.231-243, Apr. 1983.
56. WEIBEL, E.R. Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. **Int Rev Cytol**, New York, v.26, p.235-302, 1969.
57. WEINSTOCK, A. Citotoxic effects of puromycin on the golgi apparatus of pancreatic acinar cells, hepatocytes and ameloblasts. **J Histochem Cytochem**, New York, v.18, n.12, p.875-886, Dec. 1970. *Apud* WESTERGAARD, J. *Op. cit.* Ref. 61.
58. WESTERGAARD, J. Structural changes induced by tetracycline in secretory ameloblasts in young rats. **Scand J Dent Res**, Copenhagen, v.88, n.6, p.481-495, Dec. 1980.

Tabela 7 - : Consumo de água (ml) de ratas adultas jovens do grupo controle em cada semana do período de tratamento.

Animal	1 ^{as}	2 ^{as}	3 ^{as}	4 ^{as}	5 ^{as}	6 ^{as}
Rata 1	240	260	190	240	245	255
Rata 2	230	295	235	220	240	260
Rata 3	245	285	255	240	260	250
Rata 4	225	210	215	240	260	310
Rata 5	280	270	310	250	260	260
Rata 6	300	270	270	250	245	255
Rata 7	305	310	330	290	330	345
Rata 8	280	310	340	300	265	290
Rata 9	350	280	260	270	240	250
Rata 10	410	325	340	285	265	310
Rata 11	365	300	310	275	300	250
Rata 12	455	305	335	325	295	310
Rata 13	355	360	410	390	325	250
Rata 14	360	325	305	275	265	250
Rata 15	365	270	265	225	230	245
Rata 16	340	265	255	255	225	250
Rata 17	330	240	315	215	225	250
Total	5435	4880	4940	4545	4475	4590
Média	320	287	291	267	263	270
Desvio P.	64,98	35,44	54,59	43,41	32,06	30,51

Tabela 8 - :Consumo de solução alcoólica (ml) de ratas adultas jovens do grupo tratado em cada semana do período de tratamento.

Animal	1 ^{as}	2 ^{as}	3 ^{as}	4 ^{as}	5 ^{as}	6 ^{as}
Rata 1	260	215	200	170	190	172
Rata 2	245	180	175	160	275	300
Rata 3	260	200	155	140	200	190
Rata 4	295	215	175	140	245	265
Rata 5	230	200	150	155	220	225
Rata 6	225	200	165	145	205	275
Rata 7	265	230	165	145	155	160
Rata 8	200	150	150	145	130	125
Rata 9	210	185	140	155	140	130
Rata 10	230	220	160	125	160	155
Rata 11	260	205	200	195	180	175
Rata 12	385	270	265	210	280	305
Rata 13	335	220	205	160	210	250
Rata 14	360	225	235	175	230	265
Rata 15	275	270	225	200	260	245
Rata 16	350	250	200	180	240	245
Rata 17	280	200	210	170	185	165
Rata 18	275	205	215	160	180	165
Rata 19	235	185	170	115	165	140
Rata 20	285	225	200	150	160	150
Rata 21	260	320	195	175	180	260
Rata 22	310	355	195	185	170	225
Rata 23	270	300	210	195	125	220
Rata 24	325	435	210	270	175	215
Rata 25	305	355	200	190	170	205
Total	6930	6015	4770	4210	4830	5227
Média	277	240,5	191	168	193	209
Desvio P.	47,22	66,32	29,85	31,84	42,84	53,73

Tabela 9 - : Peso corpóreo (g) de ratas adultas jovens do grupo controle em cada semana do período de tratamento

Animal	0 ^{as}	1 ^{as}	2 ^{as}	3 ^{as}	4 ^{as}	5 ^{as}	6 ^{as}
Rata 1	210	230	250	250	260	270	275
Rata 2	200	215	230	235	245	235	240
Rata 3	215	235	255	255	260	270	265
Rata 4	165	175	200	205	205	200	195
Rata 5	200	205	225	210	220	220	220
Rata 6	200	205	215	210	225	225	220
Rata 7	225	245	270	255	270	280	280
Rata 8	205	210	230	220	245	250	250
Rata 9	185	225	235	235	245	250	255
Rata 10	155	200	210	215	215	225	220
Rata 11	175	230	210	225	225	235	240
Rata 12	205	255	260	255	270	270	260
Rata 13	210	240	250	240	265	270	265
Rata 14	185	230	235	250	250	240	245
Rata 15	165	205	210	215	210	215	220
Rata 16	165	195	190	200	205	210	210
Rata 17	165	210	220	215	220	220	220
Total	3230	3710	3895	3890	4035	4085	4080
Média	190	218	229	229	237	240	240
Desvio P.	21,50	20,46	22,38	19,25	23,06	24,78	24,69

Tabela 10 - :Peso corpóreo (g) de ratas adultas jovens do grupo tratado em cada semana do período de tratamento.

Animal	0 ^{as}	1 ^{as}	2 ^{as}	3 ^{as}	4 ^{as}	5 ^{as}	6 ^{as}
Rata 1	155	205	210	215	220	225	220
Rata 2	155	205	220	225	220	225	225
Rata 3	150	235	240	230	240	240	235
Rata 4	170	235	245	255	255	250	250
Rata 5	160	220	225	220	245	230	225
Rata 6	195	215	230	220	220	220	215
Rata 7	190	215	245	240	240	235	225
Rata 8	220	195	205	205	205	210	195
Rata 9	230	230	230	230	235	230	215
Rata 10	205	230	245	245	240	250	235
Rata 11	210	205	215	195	190	195	180
Rata 12	200	230	245	230	240	230	225
Rata 13	195	235	255	230	235	230	230
Rata 14	210	200	220	205	225	210	220
Rata 15	220	205	230	210	210	215	215
Rata 16	205	215	235	220	225	225	220
Rata 17	210	215	235	225	230	220	220
Rata 18	220	220	235	230	230	230	230
Rata 19	205	190	200	200	190	185	180
Rata 20	195	195	220	205	210	200	200
Rata 21	210	200	200	215	205	210	220
Rata 22	210	200	205	205	200	205	210
Rata 23	220	180	180	235	190	210	210
Rata 24	185	225	240	235	225	225	220
Rata 25	190	205	205	215	210	215	215
Total	4915	5305	5615	5540	5535	5520	5435
Média	197	212	224,5	221,5	221	221	217
Desvio P.	22,67	15,35	18,48	14,84	18,23	15,72	15,82

Tabela 11 - Consumo de água (ml) de ratas adultas jovens do grupo controle em cada semana da gestação.

Animal	1 ^{as}	2 ^{as}	3 ^{as}
Rata 1	175	355	455
Rata 2	190	420	420
Rata 3	345	365	435
Rata 4	325	430	520
Rata 5	375	450	500
Rata 6	300	415	455
Total	1710	2435	2785
Média	285	405	464
Desvio P.	83,25	37,61	38,39

Tabela 12 - Consumo de solução alcoólica (ml) de ratas adultas jovens do grupo tratado em cada semana da gestação.

Animal	1 ^{as}	2 ^{as}	3 ^{as}
Rata 1	225	360	310
Rata 2	180	240	255
Rata 3	185	285	285
Rata 4	160	195	180
Rata 5	270	270	290
Rata 6	265	140	200
Total	1285	1490	1520
Média	214	248	253
Desvio P.	46,41	76,07	52,50

Tabela 13 -- Peso corpóreo (g) de ratas adultas jovens do grupo controle em cada semana da gestação.

Animal	1 ^{as}	2 ^{as}	3 ^{as}
Rata 1	285	310	395
Rata 2	260	280	345
Rata 3	295	290	370
Rata 4	280	306	365
Rata 5	300	340	390
Rata 6	265	295	340
Total	1685	1821	2205
Média	280	303	367
Desvio P.	15,94	20,92	22,53

Tabela 14 – Peso corpóreo (g) de ratas adultas jovens do grupo tratado em cada semana da gestação.

Animal	1 ^{as}	2 ^{as}	3 ^{as}
Rata 1	235	245	270
Rata 2	255	260	295
Rata 3	240	255	295
Rata 4	245	255	290
Rata 5	260	240	310
Rata 6	240	240	270
Total	1475	1495	1730
Média	245	249	288
Desvio P.	9,70	8,61	15,71

Análise estatística

1. Desenvolvimento das ratas no período de tratamento pré-fertilização.

1.1 Consumo de água e da solução alcoólica de ratas na 1ª semana de tratamento dos grupos controle e tratado.

Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	319,7059	277,2
Variância	4223,346	2229,333333
Observações	17	25
Variância agrupada	3026,938	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	40	
Stat t	2,457633	
P(T<=t) uni-caudal	0,009208	
t crítico uni-caudal	1,683852	
P(T<=t) bi-caudal	0,018416	
t crítico bi-caudal	2,021075	

1.2 Consumo de água e da solução alcoólica de ratas na 2ª semana de tratamento dos grupos controle e tratado.

Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	287,0588	240,6
Variância	1256,434	4398,58333
Observações	17	25
Variância agrupada	3141,724	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	40	
Stat t	2,636659	
P(T<=t) uni-caudal	0,005931	
t crítico uni-caudal	1,683852	
P(T<=t) bi-caudal	0,011863	
t crítico bi-caudal	2,021075	

1.3 Consumo de água e da solução alcoólica de ratas na 3ª semana de tratamento dos grupos controle e tratado.

Teste-t: duas amostras presumindo variâncias diferentes

	Variável 1	Variável 2
Média	290,5882	190,8
Variância	2980,882	891
Observações	17	25
Hipótese da diferença de média	0	
gl	23	
Stat t	6,869933	
P(T<=t) uni-caudal	2,63E-07	
t crítico uni-caudal	1,71387	
P(T<=t) bi-caudal	5,27E-07	
t crítico bi-caudal	2,068655	

1.4 Consumo de água e da solução alcoólica de ratas na 4ª semana de tratamento dos grupos controle e tratado.

Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes

	Variável 1	Variável 2
Média	267,3529	168,4
Variância	1884,743	1014
Observações	17	25
Variância agrupada	1362,297	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	40	
Stat t	8,528303	
P(T<=t) uni-caudal	7,71E-11	
t crítico uni-caudal	1,683852	
P(T<=t) bi-caudal	1,54E-10	
t crítico bi-caudal	2,021075	

1.5 Consumo de água e da solução alcoólica de ratas na 5ª semana de tratamento dos grupos controle e tratado.

Teste-t: duas amostras presumindo variâncias diferentes

	Variável 1	Variável 2
Média	263,2353	193,2
Variância	1027,941	1835,166667
Observações	17	25
Hipótese da diferença de média	0	
gl	40	
Stat t	6,052979	
P(T<=t) uni-caudal	1,99E-07	
t crítico uni-caudal	1,683852	
P(T<=t) bi-caudal	3,98E-07	
t crítico bi-caudal	2,021075	

1.6 Consumo de água e da solução alcoólica de ratas na 6ª semana de tratamento dos grupos controle e tratado.

Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes

	Variável 1	Variável 2
Média	270	209,08
Variância	931,25	2887,41
Observações	17	25
Variância agrupada	2104,946	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	40	
Stat t	4,223857	
P(T<=t) uni-caudal	6,73E-05	
t crítico uni-caudal	1,683852	
P(T<=t) bi-caudal	0,000135	
t crítico bi-caudal	2,021075	

1.7 Peso corpóreo de ratas na 1ª semana de tratamento dos grupos controle e tratado.

Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	218,2353	212,2
Variância	418,5662	235,5833333
Observações	17	25
Variância agrupada	308,7765	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	40	
Stat t	1,092562	
P(T<=t) uni-caudal	0,140561	
t crítico uni-caudal	1,683852	
P(T<=t) bi-caudal	0,281123	
t crítico bi-caudal	2,021075	

1.8 Peso corpóreo de ratas na 2ª semana de tratamento dos grupos controle e tratado.

Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	229,1176	224,6
Variância	500,7353	341,5
Observações	17	25
Variância agrupada	405,1941	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	40	
Stat t	0,713922	
P(T<=t) uni-caudal	0,23971	
t crítico uni-caudal	1,683852	
P(T<=t) bi-caudal	0,479421	
t crítico bi-caudal	2,021075	

1.9 Peso corpóreo de ratas na 3ª semana de tratamento dos grupos controle e tratado.

Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	228,8235	221,6
Variância	370,4044	220,25
Observações	17	25
Variância agrupada	280,3118	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	40	
Stat t	1,372457	
P(T<=t) uni-caudal	0,088784	
t crítico uni-caudal	1,683852	
P(T<=t) bi-caudal	0,177569	
t crítico bi-caudal	2,021075	

1.10 Peso corpóreo de ratas na 4ª semana de tratamento dos grupos controle e tratado.

Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	237,3529	221,4
Variância	531,6176	332,3333333
Observações	17	25
Variância agrupada	412,0471	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	40	
Stat t	2,499984	
P(T<=t) uni-caudal	0,008311	
t crítico uni-caudal	1,683852	
P(T<=t) bi-caudal	0,016621	
t crítico bi-caudal	2,021075	

1.11 Peso corpóreo de ratas na 5ª semana de tratamento dos grupos controle e tratado.

Teste-t: duas amostras presumindo variâncias diferentes

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	240,2941	220,8
Variância	613,9706	247,25
Observações	17	25
Hipótese da diferença de média	0	
gl	25	
Stat t	2,874066	
P(T<=t) uni-caudal	0,004077	
t crítico uni-caudal	1,70814	
P(T<=t) bi-caudal	0,008154	
t crítico bi-caudal	2,059537	

1.12 Peso corpóreo de ratas na 6ª semana de tratamento dos grupos controle e tratado.

Teste-t: duas amostras presumindo variâncias diferentes

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	240	217,4
Variância	609,375	250,25
Observações	17	25
Hipótese da diferença de média	0	
gl	25	
Stat t	3,337431	
P(T<=t) uni-caudal	0,001324	
t crítico uni-caudal	1,70814	
P(T<=t) bi-caudal	0,002648	
t crítico bi-caudal	2,059537	

2. Desenvolvimento das ratas no período de tratamento pós-fertilização.

2.1 Consumo de água e da solução alcoólica de ratas na 7ª semana de tratamento dos grupos controle e tratado.

Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	285	214,166667
Variância	6930	2154,166667
Observações	6	6
Variância agrupada	4542,083	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	10	
Stat t	1,820416	
P(T<=t) uni-caudal	0,049355	
t crítico uni-caudal	1,812462	
P(T<=t) bi-caudal	0,09871	
t crítico bi-caudal	2,228139	

2.2 Consumo de água e da solução alcoólica de ratas na 8ª semana de tratamento dos grupos controle e tratado.

Teste-t: duas amostras presumindo variâncias diferentes

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	405,8333	248,3333
Variância	1414,167	5786,667
Observações	6	6
Hipótese da diferença de média	0	
gl	7	
Stat t	4,54637	
P(T<=t) uni-caudal	0,001324	
t crítico uni-caudal	1,894578	
P(T<=t) bi-caudal	0,002648	
t crítico bi-caudal	2,364623	

2.3 Consumo de água e da solução alcoólica de ratas na 9ª semana de tratamento dos grupos controle e tratado.

Teste-t: duas amostras presumindo variâncias diferentes

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	464,1667	253,33333
Variância	1474,167	2756,6667
Observações	6	6
Hipótese da diferença de média	0	
gl	9	
Stat t	7,939661	
P(T<=t) uni-caudal	1,18E-05	
t crítico uni-caudal	1,833114	
P(T<=t) bi-caudal	2,35E-05	
t crítico bi-caudal	2,262159	

2.4 Peso corpóreo de ratas na 7ª semana de tratamento dos grupos controle e tratado.

Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	280,8333	245,83333
Variância	254,1667	94,166667
Observações	6	6
Variância agrupada	174,1667	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	10	
Stat t	4,593526	
P(T<=t) uni-caudal	0,000495	
t crítico uni-caudal	1,812462	
P(T<=t) bi-caudal	0,00099	
t crítico bi-caudal	2,228139	

2.5 Peso corpóreo de ratas na 8ª semana de tratamento dos grupos controle e tratado.

Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	303,5	249,1666667
Variância	437,5	74,16666667
Observações	6	6
Variância agrupada	255,8333	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	10	
Stat t	5,883671	
P(T<=t) uni-caudal	7,72E-05	
t crítico uni-caudal	1,812462	
P(T<=t) bi-caudal	0,000154	
t crítico bi-caudal	2,228139	

2.6 Peso corpóreo de ratas na 9ª semana de tratamento dos grupos controle e tratado.

Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	367,5	288,3333333
Variância	507,5	246,6666667
Observações	6	6
Variância agrupada	377,0833	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	10	
Stat t	7,061294	
P(T<=t) uni-caudal	1,73E-05	
t crítico uni-caudal	1,812462	
P(T<=t) bi-caudal	3,45E-05	
t crítico bi-caudal	2,228139	

2.7 Ganho de peso de ratas no período de gravidez dos grupos controle e tratado.

Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	86,6667	42,5
Variância	166,6667	87,5
Observações	6	6
Variância agrupada	127,0833	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	10	
Stat t	6,785955	
P(T<=t) uni-caudal	2,41E-05	
t crítico uni-caudal	1,812462	
P(T<=t) bi-caudal	4,82E-05	
t crítico bi-caudal	2,228139	

2.8 Tempo de gravidez de ratas dos grupos controle e tratado.

Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	21	21,83
Variância	0	0,066666667
Observações	6	6
Variância agrupada	0,033333	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	10	
Stat t	-7,90569	
P(T<=t) uni-caudal	6,53E-06	
t crítico uni-caudal	1,812462	
P(T<=t) bi-caudal	1,31E-05	
t crítico bi-caudal	2,228139	

2.9 Número de filhotes por ratas dos grupos controle e tratado.

Teste-t: duas amostras presumindo variâncias diferentes

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	14,5	7,33333333
Variância	2,3	7,46666667
Observações	6	6
Hipótese da diferença de média	0	
gl	8	
Stat t	5,617197	
P(T<=t) uni-caudal	0,00025	
t crítico uni-caudal	1,859548	
P(T<=t) bi-caudal	0,0005	
t crítico bi-caudal	2,306006	

3. Desenvolvimento dos filhotes

3.1 Peso corpóreo de filhotes de ratas ao nascimento dos grupos controle e tratado.

Teste-t: duas amostras presumindo variâncias diferentes

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	6,033333	4,76833333
Variância	0,671107	0,05157667
Observações	6	6
Hipótese da diferença de média	0	
gl	6	
Stat t	3,644955	
P(T<=t) uni-caudal	0,005385	
t crítico uni-caudal	1,943181	
P(T<=t) bi-caudal	0,010771	
t crítico bi-caudal	2,446914	

3.2 Peso corpóreo de filhotes de ratas no 5º dia de vida dos grupos controle e tratado.

Teste-t: duas amostras presumindo variâncias diferentes

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	9,583333	7,555
Variância	2,473987	0,22099
Observações	6	6
Hipótese da diferença de média	0	
gl	6	
Stat t	3,026477	
P(T<=t) uni-caudal	0,011601	
t crítico uni-caudal	1,943181	
P(T<=t) bi-caudal	0,023203	
t crítico bi-caudal	2,446914	

3.3 Comprimento de filhotes de ratas ao nascimento dos grupos controle e tratado.

Teste-t: duas amostras presumindo variâncias diferentes

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	6,3	5,815
Variância	0,108	0,01783
Observações	6	6
Hipótese da diferença de média	0	
gl	7	
Stat t	3,349078	
P(T<=t) uni-caudal	0,006133	
t crítico uni-caudal	1,894578	
P(T<=t) bi-caudal	0,012266	
t crítico bi-caudal	2,364623	

3.4 Comprimento de filhotes de ratas no 5º dia de vida dos grupos controle e tratado.

Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	8,578333	7,735
Variância	0,063737	0,06807
Observações	6	6
Variância agrupada	0,065903	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	10	
Stat t	5,689921	
P(T<=t) uni-caudal	0,000101	
t crítico uni-caudal	1,812462	
P(T<=t) bi-caudal	0,000201	
t crítico bi-caudal	2,228139	

4. Aspectos histomorfométricos

4.1 Densidade de volume da matriz do esmalte do germe dentário de filhotes de ratas dos grupos controle e tratado.

Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	0,109	0,062
Variância	0,00028	0,000212667
Observações	6	6
Variância agrupada	0,000246	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	10	
Stat t	5,185366	
P(T<=t) uni-caudal	0,000205	
t crítico uni-caudal	1,812462	
P(T<=t) bi-caudal	0,00041	
t crítico bi-caudal	2,228139	

4.2 Densidade de volume do germe dentário de filhotes de ratas dos grupos controle e tratado.

Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes:

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	0,53783	0,4735
Variância	0,0014658	0,0004815
Observações	6	6
Variância agrupada	0,0009736	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	10	
Stat t	3,5710749	
P(T<=t) uni-caudal	0,0025433	
t crítico uni-caudal	1,8124615	
P(T<=t) bi-caudal	0,0050866	
t crítico bi-caudal	2,2281392	