

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta
tese será disponibilizado
somente a partir de 27/02/2025.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA

Tawana Pascon

**Impacto do exercício de natação em rata prenhe
diabética no desenvolvimento do esmalte,
microdureza, e volume dos dentes da ninhada**

*Impact of diabetic pregnant rat swimming exercise on enamel
development, microhardness, and volume of offspring's teeth*

Tese apresentada à Faculdade
de Medicina, Universidade
Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Campus de
Botucatu, para obtenção do
título de Doutora em
Tocoginecologia.

Orientadora: Prof.^a Emérita Marilza Vieira Cunha Rudge

Coorientadores: Dr. Diego Giroto Bussaneli

Dr^a. Juliana Ferreira Floriano

Botucatu

2023

Tawana Pascon

**Impacto do exercício de natação em rata prenhe
diabética no desenvolvimento do esmalte,
microdureza, e volume dos dentes da ninhada**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Campus de Botucatu, para obtenção
do título de Doutora em
Tocoginecologia.

Orientadora: Prof^a. Emérita Marilza Vieira Cunha Rudge

Coorientadores: Dr. Diego Giroto Bussaneli

Dr^a. Juliana Ferreira Floriano

Botucatu
2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA
INFORM.DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE
BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Pascon, Tawana.

Impacto do exercício de natação em rata prenhe diabética
no desenvolvimento do esmalte, microdureza e volume dos
dentes da ninhada / Tawana Pascon. - Botucatu, 2023

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
(UNESP), Faculdade de Medicina, Botucatu

Orientador: Marilza Vieira Cunha Rudge

Coorientador: Diego Girotto Bussaneli

Coorientador: Juliana Ferreira Floriano

Capes: 40103005

1. Feto. 2. Diabetes. 3. Desenvolvimento fetal. 4. Esmalte
dentário. 5. Gravidez.

Palavras-chave: Diabete; Esmalte dentário; Feto; Gravidez;
Programação fetal.

Tawana Pascon

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Tocoginecologia

Orientadora: Prof^ª. Emérita Marilza Vieira Cunha Rudge

Comissão Examinadora para Exame Geral de Qualificação:

Prof^ª. Emérita Marilza Vieira Cunha Rudge
Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB - UNESP

Prof^ª. Dr^ª. Rita de Cássia Loiola Cordeiro
Faculdade de Odontologia de Araraquara - FOA - UNESP

Prof. Dr. Carlos Izaias Sartorão Filho
Fundação Educacional do Município de Assis – FEMA

Prof. Dr. Manuel Restrepo
Faculdade de Odontologia - Universidad CES

Prof^ª. Dr^ª. Patrícia de Souza Rossignoli
Faculdade de Filosofia e Ciências – FFC - UNESP

Botucatu, 27 de fevereiro de 2023.

Dedicatórias

Trilhar o caminho para atingir este objetivo só foi possível pelos sorrisos inocentes, abraços apertados e o amor transbordante dos meus filhos **Pedro** e **André**. Como não dedicar ao meu avô **Gilberto** que sempre foi luz no meu caminho, sustento da minha alma e o meu “tudo”. É para vocês, amores da minha vida, que faço a dedicatória desta tese.

Agradecimientos

Meu **Deus**, obrigada por esta conquista! Sinto-me muito feliz e realizada.

Professora Marilza Vieira Cunha Rudge, agradeço por ter aberto as portas do conhecimento, pela oportunidade de crescimento, por ter facilitado minha trajetória e ter acreditado na minha proposta.

Angélica, minha mãe, muito obrigada por me escolher como filha. Obrigada pela dedicação, pelas palavras e conselhos, pelo amor incondicional e pela amizade de sempre. Agradeço imensamente a Deus por ter me dado um anjo disfarçado de mãe. Te amo.

Minha família querida, meu avô **Gilberto** (*in memorian, in cor, in anima, in vita mea semper*), meu pai **Roberto**, minhas irmãs **Carolina, Vitória e Alice** e meu esposo **Raphael**, o apoio de vocês foi primordial para que eu me tornasse a pessoa que sou e para que obtivesse mais esta conquista em minha vida.

A oportunidade de fazer parte do ***Diamater Study Group***, em que **todos vocês** me acolheram de forma tão carinhosa, tornou possível não somente o término desta Tese, mas com certeza, a execução de cada etapa dela. Em especial a **Bruna Bologna, Aline Carr, Rafael Guilen, Gabriela Garcia, Caroline Baldini, Sthefanie, Guilherme Nava, Sofia Vega** e **Profa Patrícia Rossignoli**.

Agradecimento aos coorientadores **Dr. Diego Bussaneli** e **Dra. Juliana Floriano** pelo incentivo e pela dedicação.

Gabriela Garcia, como expressar meu agradecimento? Com tantos

desafios na minha vida, considerei a possibilidade de interromper o doutorado e, exatamente neste momento você surgiu, de forma quase silenciosa e tão solícita, que quando percebi você estava me fazendo seguir em frente. Você viabilizou a continuidade e concretização das análises pré-clínicas. Você mediou a conquista de parcerias muito importantes. Muito obrigada!

Bruna Bologna, sua colaboração foi ímpar em todo processo!! Se temos este modelo que incluímos no estudo, isto se deve a seu primor e dedicação. Agradecimentos especiais a responsável pelo Laboratório de Investigação Translacional em Uroginecologia e Obstetrícia (LIT-UroGO), **Prof^a. Angélica Barbosa** e pelo Laboratório de Ciências Fisiológicas (LACIFI), **Prof^a. Patrícia Rossignoli**.

Ao **Prof. Dr. Marco Húngaro** pela parceria nas análises dos dentes, que gentilmente viabilizou a utilização do Laboratório de pesquisa em Endodontia da FOB, USP, Bauru e dividiu conosco sua expertise, dando sugestões importantíssimas. **Leticia Citelli Conti**, você nos ajudou de forma muito especial.

A **Prof^a. Dra. Ana Carolina Magalhães** que nos recebeu em seu Laboratório de Bioquímica, FOB, USP, Bauru, espaço me que pudemos realizar as análises de microdureza.

Ao **Prof. Dr. Marcelo Ornaghi Orlandi** e ao **Dr. Diego Luiz Tita** por nos receber no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Alta Resolução - Instituto de Química, UNESP Araraquara para as análises do MEV.

Aos funcionários do **Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu**, e ao **Departamento de Tocoginecologia**, em especial à **Solange Sako**, por toda atenção e paciência.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)** pelo apoio ao Programa de Pós-Graduação em Tocoginecologia.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo financiamento do Projeto Temático processo 2016/01743-5, que possibilitou a execução deste mestrado.

Ao Escritório de Apoio à Pesquisa, **Cinthia** e **Cássia** por toda colaboração e competência dispensadas a mim e a este projeto.

E, claro, embora não tenha sido possível analisar os dados para o doutorado, agradeço imensamente às **mães** das **crianças** participantes, que confiaram seus filhos em minhas mãos e permitiram acessar seus dados pessoais e clínicos, e tudo **pelo bem dos filhos de outras mães**.

Todo meu respeito e agradecimento pelos **animais** que foram sacrificados neste estudo em detrimento do benefício humano.

Diamater Study Group, quem dera todos tivessem aliados, parceiros, e amigos como vocês; tudo seria mais simples e factível.



Epigrafe

“A dúvida é o princípio da sabedoria”

Aristóteles

Lista de Figuras

Contextualização

Figura 1	Desenvolvimento embrionário do germe dental.....	41
----------	--	-----------

Artigo 1

Figura 1	Dental Enamel Development Diamater's Conceptual Diagram.....	66
----------	--	-----------

Artigo 2

Figura 1	Study design.....	86
Figura 2	Enamel volume analysis between groups (A) and between upper and lower teeth (B).....,,.....	94
Figura 3	Enamel morphological characteristics of all teeth in the four groups and built the base of the variables to be scored.....	99
Figura 4	Analysis of enamel surface chemical between groups...	102
Figura 5	Analysis of enamel surface chemical between the arches (upper and lower teeth).....	104
Figura 6	Comparison of enamel microhardness between groups (A) and between upper and lower teeth within a group and between groups (B) limitations.....	105



Lista de Abreviações

Português e Inglês

LISTA DE ABREVIACÕES EM PORTUGUÊS

Ca	Calcio
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CIDPN	Centro de Investigação do Diabetes Perinatal
DED	Desenvolvimento do esmalte dentário
DDE	Defeito no Desenvolvimento do Esmalte
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
DMG	<i>Diabetes mellitus</i> gestacional
Dr.	Doutor
Dr^a.	Doutora
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FEMA	Fundação Educacional do Município de Assis
FFC	Faculdade de Filosofia e Ciências
FMB	Faculdade de Medicina de Botucatu
FOA	Faculdade de Odontologia de Araraquara
FOB	Faculdade de Odontologia de Bauru
GJ	Glicemia de jejum
IDE	Índice de defeitos de esmalte
IU	Incontinência urinária
IU-EG	Incontinência urinária específica da gestação
LACIFI	Laboratório de Ciências Fisiológicas
LIT-UroGo	Laboratório de Investigação Translacional em Uroginecologia e Obstetrícia

MAP	Músculos do assoalho pélvico
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MICRO CT	Microtomografia
Prof.	Professor
Prof^a.	Professora
PTH	Paratormônio
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TOTG	Teste oral de tolerância à glicose
UNESP	Universidade Estadual Paulista
UNIMAR	Universidade de Marília
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE ABREVIACÕES EM INGLÊS

%	Percentage
ACOG	American College of Obstetricians and Gynecologists
ADA	American Diabetes Association
BMI	Body mass index
CONCEA	Council for Control of Animal Experimentation
DED	Dental enamel development
DDE	Developmental defects of enamel
DOHaD	Developmental origins of adult health and disease
EDS	Energy Dispersive Spectroscopy
FOAD	Fetal origin of adult disease
GDM	Gestational <i>Diabetes Mellitus</i>
NCD	Non-communicable diseases
OGTT	Oral glucose tolerance test
PDRC	Perinatal Diabetes Research Center
SE	Swimming exercise
SEM	Scanning Electron Microscope
SD	Standard deviation
STZ	Streptozotocin

Resumo da Teó

Pascon, T. Impacto do exercício de natação em rata prenhe no desenvolvimento do esmalte, microdureza e volume dos dentes da ninhada. 2023. 141f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Brasil.

Introdução: 1) Durante o desenvolvimento intrauterino o feto é vulnerável a diversos fatores, principalmente por via materna. O esmalte dentário é considerado um marcador biológico sensível para algumas condições, é um tecido sem células vivas e não pode ser reparado depois de danificado. Os defeitos de desenvolvimento do esmalte (DDE) podem sugerir a associação com fatores sistêmicos ou locais e programação fetal. Portanto, este estudo teve como objetivo projetar e desenvolver o diagrama com a cronologia do desenvolvimento do esmalte dentário (DED) para possibilitar a investigação dos fatores de risco intrauterinos e repercussões da programação fetal da DDE com base no conceitual do *Diamater Study Group*. 2) Estudos epidemiológicos e em modelos animais mostraram que a hiperglicemia altera o processo de desenvolvimento do dente, afetando a erupção e a mineralização do dente e isso inclui o desenvolvimento do esmalte do dente. Ressalta-se que a organização do esmalte, dentina, cemento e polpa dentária é comum tanto para humanos quanto para roedores. O Diabetes Mellitus Gestacional (DMG) foi associado a efeitos adversos do DDE na prole. Identificar fatores associados a alterações no esmalte do descendente, bem como desenvolver estudos com propostas de intervenção, para que medidas preventivas e terapêuticas possam ser investigadas e adotadas no futuro a fim de minimizar as consequências negativas do DMG no desenvolvimento do esmalte dentário. O objetivo deste estudo foi analisar o impacto do exercício de natação de ratas grávidas no desenvolvimento do esmalte, microdureza e volume dos dentes dos filhotes. **Métodos e Resultados:** 1) O “diagrama conceitual do DED

Diamater” foi desenvolvido considerando a cronologia de formação do esmalte na dentição decídua e permanente com início na vida intrauterina. Os dentes foram diferenciados por grupo de dentes, tipo de dentição e por porcentagem de formação de esmalte dentário por superfície do dente. Os períodos do início até a formação completa do esmalte foram considerados e relacionados com o período intrauterino, nascimento e pós-natal. **2)** Para induzir o modelo de ratos, fêmeas Wistar recém-nascidas receberam no primeiro dia de vida injeção subcutânea de STZ (Sigma®). Ratos não diabéticos receberam injeção subcutânea de tampão citrato. Todas as ratas recém-nascidas foram mantidas com suas mães até o final do período de lactação (21 dias). Após este período, as ratas mães foram eutanasiadas por injeção de tiopental sódico (Thiopentax® - 80 mg/kg). Os recém-nascidos do sexo feminino foram mantidos até a idade adulta. O protocolo de exercício de natação foi baseado em estudos anteriores e considerado um protocolo de exercício de intensidade moderada. A primeira sessão de treino iniciou com 20 minutos, aumentando progressivamente 10 minutos/dia até 60 minutos. As ratas sedentárias foram expostas à água diariamente por 15 minutos, a uma profundidade de 10 cm na temperatura da água $31\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 6 dias/semana, do dia 0 até o dia 20 gestacional, visando não promover adaptações fisiológicas a partir da prática de exercícios. Todos os ratos recém-nascidos foram mantidos com suas mães até o final do período de lactação (21 dias). Para este estudo foram utilizados os dentes da prole: foram extraídos quatro incisivos de cada animal de cada grupo (dentes incisivos superiores e inferiores). Todas as amostras foram identificadas e armazenadas em formaldeído 10%. Para avaliar o volume do esmalte, todos os dentes foram escaneados em um sistema de micro-CT. Para a avaliação da microestrutura, as amostras foram avaliadas por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura. As amostras foram avaliadas quanto à presença ou ausência de fraturas, quebras na “ponta”, rugosidade, arranhões e ondulações. Para a avaliação

da microestrutura, as amostras foram avaliadas por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura. Avaliação da microdureza. Para cada animal de todos os grupos, quatro incisivos foram avaliados. As superfícies retificadas dos dentes foram polidas com pastas de polimento de 6 l e 1 l. A microdureza dos dentes foi testada usando um indentador Vicker. O volume do esmalte não apresentou diferença entre os grupos. No entanto, um maior volume de esmalte foi demonstrado nos dentes inferiores quando comparados aos dentes superiores nos quatro grupos. O grupo Dsed apresentou maior número de alterações em relação a fraturas, fissuras, rugosidade, formação de esmalte e a presença concomitante de opacidade difusa e demarcada. Aumento significativo na concentração de Na foi observado no grupo NDex em comparação com o grupo NDsed, enquanto nenhuma diferença foi encontrada nas concentrações de Mg, Fe, C, O, Ca, P, Cl e Al entre os grupos. Houve diminuição da microdureza nos grupos Dsed e Dex em relação ao grupo NDex. O grupo Dex apresentou redução dos efeitos deletérios observados no grupo Dsed e resultados semelhantes aos grupos ND (NDsed e NDex). Os grupos diabéticos e não diabéticos exercitados apresentaram aspecto de consolidação da fissura. Nosso estudo sobre a distribuição de elementos no esmalte de descendentes de dentes de ratos diabéticos também pode ser importante para a compreensão dos processos de mineralização do esmalte, determinando como os elementos alteram as propriedades dos materiais e explorando a relação entre o binômio gravidez e descendência. Os achados deste estudo demonstram o impacto negativo do Diabetes em ratas prenhes no esmalte dentário, principalmente no grupo sem intervenção com exercício de natação. **Conclusão: 1)** O diagrama conceitual do DED Diamater foi desenvolvido e permite visualizar a inter-relação do DED com a vida intrauterina até a idade pós-natal de quatro anos. O diagrama apresenta o grupo de dentes, tipo de dentição, superfície dentária e evolução do DED, indicando o início de acordo com a semana gestacional e ano de vida que

completa a formação do esmalte dentário. A ferramenta pode direcionar intervenções preventivas e terapêuticas em DDE que podem interferir positivamente na saúde bucal das crianças mais tarde na vida e nas gerações futuras. **2)** Os resultados sustentam que não houve diferença entre os grupos na análise do volume do esmalte. Não praticar natação e ter diabetes durante a gravidez teve maior impacto negativo em relação à ocorrência de fraturas, fissuras, alterações de rugosidade, formação de esmalte e a presença concomitante de opacidade difusa e demarcada. O diabetes em geral causou uma diminuição na microdureza do esmalte em comparação ao grupo não diabético e o exercício de natação foi capaz de reverter as fissuras.

Palavras-chave: feto, diabete, programação fetal, esmalte dentário, gravidez, parto, puerpério, exercício, natação, ratas

Thesis Abstract

Pascon, T. Impact of pregnant rat swimming exercise on enamel development, microhardness, and volume of offspring's teeth 2023. 141p. Thesis (Doctorate) - Botucatu Medical School (FMB), São Paulo State University (UNESP), Brazil.

Background: **1)** During intrauterine development the fetus is vulnerable to various factors, mainly affected via maternal. Dental enamel is considered a sensitive biological marker for some conditions, it's a tissue with no living cells and cannot be repair after damaged. The developmental defects of enamel (DDE) may suggest the association with systemic or local factors and fetal programming. Therefore, this study aimed to design and develop the diagram with the chronology of the DED to enable investigation of the intrauterine risk factors and fetal programming repercussions of DDE based on Diamater Study Group conceptual. **2)** Epidemiological and animal model studies have shown that hyperglycemia alters the tooth development process by affecting tooth eruption and mineralization and this includes tooth enamel development. It is noteworthy that the organization of enamel, dentin, cementum and dental pulp is common to both humans and rodents. Gestational Diabetes Mellitus (GDM) was associated with adverse effects of DDE on offspring. To identify factors associated with changes in the descendant's enamel, as well as to develop studies with intervention proposals, so that preventive and therapeutic measures can be investigated and adopted in the future in order to minimize the negative consequences of GDM on the development of dental enamel. The aim this study was analyze of Impact of pregnant rat swimming exercise on enamel development, microhardness, and volume of offspring's teeth. **Methods and Results:** **1)** The "DED Diamater's conceptual diagram" was developed considering of the chronology enamel formation in the deciduous and permanent dentition with start in intrauterine life. The teeth were differentiated by group of teeth, type of dentition and by percentage of dental enamel formation per surface of the tooth. The periods to the beginning until

complete enamel formation was considered and was related with the intrauterine, birth and postnatal period. **2)** To induce rats' model, newborn female Wistar received in the first day of life subcutaneously injection of STZ (Sigma®). Non-diabetic rats received subcutaneous injection of citrate buffer. All female newborn rats were maintained with their mothers until the end of the lactation period (21 days). After this period, the mother rats were euthanized by sodium thiopental injection (Thiopentax® - 80 mg/kg). The female newborns were maintained until adulthood. The swimming exercise protocol was based on previous studies and considered to be a moderate intensity exercise protocol. The first training session started with 20 minutes, progressively increasing 10 minutes/day until 60 minutes. The sedentary rats were exposed to water daily for 15 minutes, at a depth of 10 cm at water temperature $31\pm 1^{\circ}\text{C}$ for 6 days/week, from gestational day 0 until gestational day 20, aiming not to promote physiological adaptations from exercise practice. All newborn rats were maintained with their mothers until the end of the lactation period (21 days). For this study the offspring teeth was used: four incisors of each animal of each group were extracted (upper and lower incisors teeth). All samples were identified and stored in formaldehyde 10%. In order to evaluate enamel volume, all teeth were scanned in a micro-CT system. For the evaluation of the microstructure, the samples were evaluated by means of Scanning Electron Microscopy. The samples were evaluated for the presence or absence of fractures, breaks at the "tip", roughness, scratches and dimples. For the evaluation of the microstructure, the samples were evaluated by means of Scanning Electron Microscopy. Microhardness evaluation. For each animal of all groups, four incisors were evaluated. Ground surfaces of teeth were polished using 6l and 1l polishing pastes. Teeth microhardness was tested using a Vicker indenter. The enamel volume showed no difference between the groups. However, a greater enamel volume was demonstrated in the lower teeth when compared with the upper teeth in the four groups. The Dsed group showed a greater number of alterations in relation to fractures, fissures,

roughness, enamel formation and the concomitant presence of diffuse opacity and as demarcated. A significant increase in Na concentration was observed in the NDex group compared with NDsed group, while no difference was found in the Mg, Fe, C, O, Ca, P, Cl e Al concentrations between groups. There was a decrease in microhardness in the Dsed and Dex groups compared to the NDex group. The Dex group showed a reduction in the deleterious effects observed in the Dsed group and similar results to the ND groups (NDsed and NDex). The exercised diabetic and non-diabetic groups showed an appearance of fissure consolidation.

Our study on the distribution of elements in the enamel of offspring of the diabetic rats' teeth may also be important for the understanding of the enamel mineralization processes, determining how elements change the properties of the materials, and exploring the relationship between binomial pregnancy and offspring. The findings in this study demonstrate the negative impact of Diabetes in pregnant rats on dental enamel, especially the group without intervention with swimming exercise. **Conclusion: 1)** DED Diamater's conceptual diagram was developed and makes it possible to view the interrelation of the DED with intrauterine life to four years postnatal age. The diagram present of the group of teeth, type of dentition, tooth surface and evolution of DED, indicating the onset according to gestational week and year of life that completes the formation of dental enamel. The tool may to target preventive and therapeutic interventions in DDE that can positively interfere with children's oral health later life and in future generation. **2)** The results support that there was no difference between groups in the analysis of enamel volume. Not performing swimming exercises and having diabetes during pregnancy had a greater negative impact in relation to the occurrence of fractures, fissures, changes in roughness, enamel formation and the concomitant presence of diffuse and demarcated opacity. Diabetes in general caused a decrease in enamel microhardness compared to the non-diabetic group and swimming exercise

was able to reverse fissures.

keywords: fetus, diabetes, fetal programming, dental enamel, pregnancy, birth, postpartum period, exercise, swimming, rats

Sumário

Seção 1	Trajetória Acadêmica.....	31
Seção 2	Contextualização	
	Avanços do conhecimento sobre a repercussão da exposiçãomaterna a hiperglicemia no desenvolvimento do esmalte dentário do descendente.....	37
	Referências.....	49
Seção 3	Artigos	
	Artigo 1: Fetal and postnatal programming of dental enamel development: the DED Diamater’s conceptual diagram.....	57
	Abstract.....	59
	Introduction.....	60
	Methods.....	62
	Results.....	64
	Discussion.....	67
	Study limitations.....	68
	Conclusion.....	68
	Acknowledgments.....	68
	References.....	69
	Artigo 2: Impact of diabetic pregnant rat swimming exercise on enamel development, microhardness, and volume of offspring’s teeth.....	76
	Abstract.....	77
	Introduction.....	78
	Materials and Methods.....	84
	Results.....	92
	Discussion.....	106
	Conclusion.....	109
	Acknowledgments.....	110
	References.....	111
Seção 5	Perspectivas Acadêmicas e Científicas.....	115
Seção 6	Diamater Study Group.....	117
	Anexos.....	120

Seção 1

Trajetória Acadêmica

Iniciei a formação acadêmica em odontologia na Universidade de Marília em 2005 e, ao concluir em 2009, a Odontopediatria estava definida como área de interesse de trabalho. Entre 2010 e 2012, realizei curso de especialização em Odontopediatria na UNESP em Araçatuba que foi, indubitavelmente, a diretriz para o interesse em ampliar o interesse de atuação clínica e associar a pesquisa científica. Agregando conhecimento e complementando a atuação, cursei entre 2010 e 2013 a especialização em ortodontia na Universidade de Marília, e desta formação, o conhecimento aprofundado sobre formação dental e do esmalte desde o período intrauterino.

Ao longo de boa parte da minha vida acompanhei cada resultado obtido das investigações do Grupo de Pesquisa “Diabetes e Gravidez: Clínico e Experimental” *Diamater Study Group*, do qual minha mãe faz parte desde 2002. No final de 2014, como sempre de forma entusiasmada, ela falou sobre a “tríade” que havia se formado em torno da Hiperglicemia gestacional, miopatia diabética gestacional e incontinência urinária gestacional, e do projeto ambicioso projeto Temático de investigar ampla e profundamente esta associação.

Entre as investigações proposta neste Temático, me despertou especial atenção, as análises bioquímicas como cálcio, calcitonina, paratormônio e vitamina D, por serem variáveis relacionadas a formação do esmalte dentário desde a fase intrauterina. Neste momento, todo conhecimento adquirido na graduação e especializações se agrupou, e

surgiu a seguinte pergunta da dissertação de mestrado: se o meio materno está alterado, e a formação dental e do esmalte se inicia na vida intrauterina, este pode gerar repercussões negativas, porque o desenvolvimento dental e do esmalte depende da cascata destas mesmas variáveis bioquímicas.

Em 2015, iniciei no grupo de pesquisa participando das reuniões e discussões e paralelamente construindo o projeto de mestrado. Fazer parte de grupo de estudos com tantos anseios em relação à pesquisa abriu meus horizontes para um mundo novo. Entre 2016 e 2018, cursei o mestrado sob orientação da Profa. Marilza Rudge, que culminou com a dissertação intitulada “Associação do *Diabetes Mellitus* Gestacional com os Defeitos de Desenvolvimento de Esmalte na Dentição da Criança”. Os resultados obtidos e publicados (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211771>), abriram novas linhas de investigação e nos impulsionaram a ampliar e aprofundar o conhecimento e desta forma propusemos a condução, de forma translacional, deste doutorado.

Ingressei no Programa em Tocoginecologia como aluna regular de doutorado em 2018 com proposta de estudo translacional. Entre 2018 e 2022 cursei 10 disciplinas, coletei dados e colaborei na elaboração de trabalhos apresentados em eventos, sendo 1 pôster em evento nacional como autora principal (Anexo 1) e 3 internacionais como coautora em 2018

e 2019 (Anexo 2-4). Sou autora de 12 artigos, sendo um deles como autora principal (Anexo 5) e outros 11 como autora ou como membro do *Diamater Study Group/The Perinatal Diabetes Research Group* (Anexos 6-16), conforme orientado e recomendado pela Capes.

Como dentista, meu interesse maior foi verificar a repercussão da hiperglicemia materna na dentição da criança a curto e longo prazo. Inicialmente a proposta clínica do estudo translacional foi o estudo de coorte prospectiva, com objetivo de analisar a associação da hiperglicemia gestacional materna e os níveis sanguíneos maternos do cálcio, calcitonina, paratormônio, vitamina D, vitamina A, cortisol e fósforo, no defeito do desenvolvimento de esmalte na dentição decídua do descendente. Contudo, pela situação pandêmica, não foi possível realizar os exames bucais e coletar as imagens dos dentes das crianças. Utilizamos estratégias para obter de alguma forma as imagens, mas não obtivemos sucesso. Este estudo será continuado tão logo a situação sanitária permita as atividades presenciais.

Considerando a viabilidade e factibilidade de realizar análises em modelo animal com proposta na etapa *bed to bench* de intervenção (preventiva ou minimizadora) com exercícios, e com o intuito de verificar o impacto do exercício em ratas prenhes diabéticas no desenvolvimento do esmalte da ninhada, de forma translacional, esta tese foi desenvolvida. O estudo pré-clínico teve como objetivo realizar *screening* no esmalte da dentição da ninhada sob a ótica do Volume do Esmalte por meio da

Microtomografia (Micro CT) com realização dos escaneamentos (*Scans*), por meio do software de reconstrução NRecon e do software para as medidas CTan, da Microdureza e da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Esta tese tem o propósito de ampliar e aprofundar o conhecimento sobre as repercussões maternas nos filhos de mães diabéticas e verificar o efeito da terapêutico com exercícios sobre o Defeito no Desenvolvimento do Esmalte (DDE). A proposta, é inédita e colabora na elucidação de fatores de risco para o desfecho e terapêutica do DDE de filhos de mães com DMG.

As aprovações do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) referentes a esta Tese estão apresentadas nos Anexos 17 e 18, respectivamente.

Cumprir a etapa até aqui, foi processo de muitos desafios; conciliei as atividades da pós-graduação, consultório, filhos, família e pessoais, contudo foi de extrema gratificação e com valioso amadurecimento.

Seção 2

Contextualização

**Avanços do conhecimento sobre a repercussão da exposição
materna a hiperglicemia no desenvolvimento do esmalte dentário do
descendente**

Os Grupos de Pesquisa “Diabetes e Gravidez: Clínico e Experimental” e *Diamater Study Group* realizam pesquisas multicêntricas nacionais e internacionais relacionadas à gravidez complicada pelo diabetes; e de forma intrincada investiga repercussões e resultados maternos e fetais, perinatais e neonatais dos descendentes destas mulheres (1-8). Nos últimos quase 50 anos, os dois grupos juntos realizaram estudos clínicos e pré-clínicos. Importantes lacunas do conhecimento foram preenchidas ao longo destes anos. Estes resultados interferiram direta e profundamente em diferentes condutas e manejos obstétricos e clínicos com benefício à mulher, ao feto e ao recém-nascido (9-16). A internacionalização das pesquisas se evidencia com estudos pré-clínicos, que tomaram importante proporção com estudos sobre as repercussões a curto e longo prazo do diabetes no desenvolvimento fetal embrionário (17-24).

O *diabetes mellitus* gestacional (DMG) (25,26) está associado a um risco aumentado de complicações para o binômio materno-fetal durante a gravidez, bem como no período após o nascimento (27-29). A literatura tem reforçado que a hiperglicemia gestacional de intensidade variada, independentemente do diagnóstico de DMG, está envolvida na determinação do peso ao nascimento (30,31), macrosomia fetal,

hipoglicemia neonatal, hiperinsulinismo fetal (28), aumento dos índices de mortalidade fetal e perinatal (1,13), malformações congênitas (32), prematuridade e síndrome do desconforto respiratório (28). No entanto, os efeitos do diabetes materno no desenvolvimento dos dentes e os mecanismos subjacentes não foram completamente investigados (33).

Estudos epidemiológicos e de modelos animais mostraram que a hiperglicemia altera o dente em seu processo de desenvolvimento, e pode afetar a erupção e a mineralização do dente (34-36); e isto inclui o desenvolvimento do esmalte dentário.

Demanda bioquímica na gestação e repercussão no feto e neonato

Durante a gestação normoglicêmica, cerca de 250 gramas por dia de Cálcio (Ca) é transferido da mãe para o feto no 3º trimestre gestacional (37), sendo que os níveis de Ca são mais elevados no feto do que na mãe (38), e concomitante há aumento do funcionamento das glândulas paratireoides. Esse estado de hiperparatireoidismo relativo funciona como uma compensação homeostática para melhorar os estoques de Ca materno enviado para o feto (37).

O Ca tem intrincada relação com minerais, vitaminas e hormônios, demonstrando interdependência em cascata para sua manutenção e transferência. O paratormônio (PTH), hormônio secretado pela paratireoide (39), age nos osteoclastos que, por ação enzimática, reabsorvem a matriz

e solubilizam o Ca. O PTH, portanto, tem função primordial no *turnover* ósseo, isto é, no equilíbrio entre aposição e reabsorção, na manutenção do Ca em torno de 8,9 a 10 mg/dL e na absorção de Ca no intestino (39). O PTH mantém os níveis de Ca, aumentando a reabsorção intestinal e diminuindo a excreção urinária (40). A maioria do Ca "economizado" durante a gestação (cerca de 30 g) é transportada ativamente através da placenta e, principalmente no terceiro trimestre, depositada no esqueleto fetal.

A calcitonina é hormônio secretado pela tireoide, que apresenta como principal efeito participar do metabolismo do Ca. A secreção desse hormônio é controlada, basicamente, pela concentração de Ca, ou seja, os níveis de calcitonina aumentam ou diminuem diretamente proporcional ao aumento ou diminuição do Ca (37).

Como o PTH e a calcitonina não atravessam a barreira placentária, ao nascimento, pelos altos níveis de calcitonina, PTH e vitamina D neonatal dos fetos das mães diabéticas, ocorre hipocalcemia devido à interrupção da transferência materno-fetal de Ca (37,41).

A vitamina D, indiretamente, está relacionada na regulação do Ca extracelular e no fluxo deste mineral dentro das células beta. A secreção de insulina é processo mediado pelo Ca, portanto, alterações na regulação de seu fluxo podem ser prejudiciais à função secretória das células pancreáticas e também para ação propriamente dita da insulina. Dessa forma, tanto níveis inadequados de Ca, quanto níveis deficientes de

vitamina D, podem alterar o balanço entre os compartimentos intracelular e extracelular de Ca, afetando a liberação normal de insulina (42).

Além de repercutir em diferentes variáveis maternas e do neonato o Ca, calcitonina, PTH e vitamina D são indispensáveis para a saúde do organismo em toda sua complexidade, entre elas a estruturação dos ossos e dentes (43).

Desenvolvimento dentário na vida intrauterina e após o nascimento

O primeiro sinal morfológico da formação dentária ocorre durante a 4ª e 6ª semana intrauterina quando há o aparecimento da lâmina dentária primária (42,44). Todas as fases do desenvolvimento dentário se processarão a partir desta lâmina dentária primária (45).

Do ponto de vista embriológico o dente é órgão misto derivado de duas camadas, o ectoderma que formará a coroa, e o mesoderma que dará origem a dentina, cemento e polpa. Os dentes decíduos comumente denominados “de leite”, iniciam sua formação na 7ª semana de vida intrauterina e o esmalte de todos eles, está usualmente completo por volta do primeiro ano de vida. Todos os dentes decíduos estão geralmente erupcionados por volta de 24 e 36 meses e a estrutura radicular desses dentes está geralmente completa por volta dos três anos (42,44).

A odontogênese refere-se ao processo embriológico que dá origem ao germe dentário (42,45). A cronologia da formação do germe dental pode

ser observada na Figura 1.

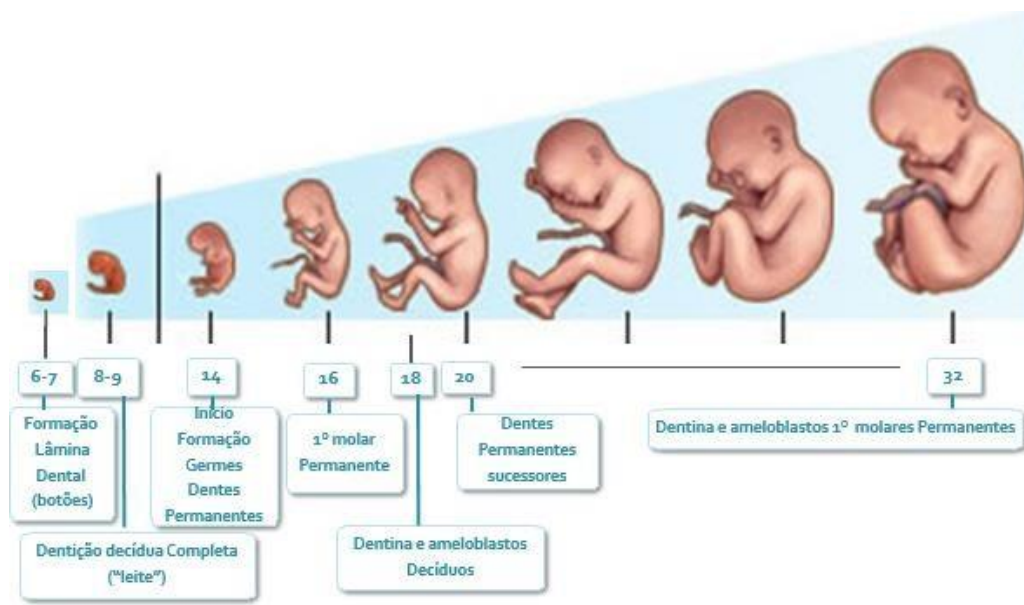


Figura 1: Desenvolvimento embrionário do germe dental. FONTE: adaptado de Bolland et al.,2008 (46).

A formação do esmalte e da dentina acontecem simultaneamente, e ambos os processos começam a partir de uma linha que formará a junção amelodentinária (47) e são descritos em fases: pré-secretora, fase secretora e fase de maturação (43). Na fase pré-secretora, ao lado da junção amelodentinária referente ao esmalte estão os ameloblastos que secretam a matriz orgânica. Os ameloblastos diferenciam-se, mudam de polaridade e desenvolvem extenso aparato de síntese proteica (43,47). Na fase secretora, pela expressão genética programada, à medida que secretam as proteínas da matriz extracelular, os ameloblastos se afastam do centro do órgão dentário (48); e nesta fase os cristais de hidroxapatita são depositados na matriz orgânica e formam placas finas alongadas. É

nesta frente de mineralização que se inicia a deposição mineral. Após o depósito da camada de esmalte aprismático, os ameloblastos secretores desenvolvem nas suas porções terminais processo em forma de cone (47). À medida que os ameloblastos secretam as proteínas do esmalte, os cristais de hidroxiapatita continuam a crescer em comprimento, mas crescem muito pouco em largura e em espessura (43,48), sendo que, comprimento final dos cristais depende de quanto tempo os ameloblastos secretam (47).

A quantidade de esmalte depositado em um dia varia de acordo com fatores sistêmicos e podem formar padrões distintos de linhas incrementais que são reproduzidas fielmente no esmalte de todos os dentes em formação num determinado momento (43).

Distúrbios durante a fase secretora da amelogênese resultarão em esmalte patologicamente fino ou hipoplásico, devido ao insuficiente alongamento dos cristais. Os distúrbios sistêmicos ocorridos nestes neonatos parecem atuar no mecanismo de armazenamento de minerais, que também parece afetar diretamente a mineralização dos tecidos dentários (47). Quando ocorre distúrbio no metabolismo do Ca, como por exemplo em gestação complicada pelo diabetes, podem predispor a alterações nos dentes decíduos (49). O Ca transferido da mãe para o feto é depositado principalmente sob a forma de hidroxiapatita e a maior taxa de acúmulo de Ca ocorre no período de deposição e concomitante com parte do período de calcificação dos dentes decíduos (50).

A mineralização ou calcificação dentária compreende a deposição de sais minerais, principalmente Ca e fósforo, sobre a matriz tecidual anteriormente formada. A deposição inicia-se sobre as pontas das cúspides e bordos incisais dos dentes, e continua com aposições concêntricas e sucessivas sobre os pequenos pontos de origem. Os dentes decíduos iniciam a sua calcificação entre a 14ª e 18ª semana intrauterina, com início nos incisivos centrais e término no 2º molar (51). Os ápices dos dentes decíduos fecham geralmente um ano após a erupção do dente e geralmente ocorre entre o ano e meio e três anos da criança (42).

Devido a sua composição, o esmalte é rígido e duro (52), e com presença de diversos componentes químicos no esmalte dentário, como: cálcio, água, dióxido de carbono, magnésio, sódio, potássio e fósforo (53,54).

Alterações no esmalte em relação às suas propriedades físicas, mecânicas e químicas podem afetar permanentemente a dentição decídua e permanente, dependendo do momento em que o dente ficou exposto ao agente agressor.

O esmalte dental é considerado importante marcador biológico sensível a uma série de eventos e situações, pois não contém células vivas e não pode reparar danos (55). Esta condição permite a definição da ocorrência do evento causador (55) e tem sido utilizada como um indicativo de padrões de saúde (56) e qualidade de vida, seja em aspectos gerais (57) ou em situações específicas (58).

Defeitos do desenvolvimento do Esmalte e *Diabetes Mellitus* Gestacional

Alterações recorrentes são os defeitos de desenvolvimento de esmalte (DDE) e geralmente refletem distúrbio ocorrido durante determinado período da amelogênese durante a gestação, sendo que, somente os dentes em formação no período em que se deu o distúrbio serão afetados. Portanto, com o conhecimento da cronologia de mineralização dentária, pode-se estimar em qual período a mineralização do esmalte foi afetada na gestação (47).

Vários índices clínicos têm sido usados para registrar os defeitos de desenvolvimento de esmalte, tais como: o índice Al-Alousi, o índice de defeitos de desenvolvimento de esmalte (Índice DDE), índice de fluorose da superfície dentária, o índice de defeitos de esmalte (IDE) (59), e o mais preconizado e utilizado cientificamente, o índice modificado de defeitos de desenvolvimento de esmalte (Índice DDE modificado) (60). Embora estes índices permitam a classificação dos DDE, não foram encontrados guias que correlacionassem os defeitos observados pelos índices com o período gestacional de seu desenvolvimento. Desta forma tornou-se importante desenvolver um diagrama conceitual com modulação dinâmica da programação DDE fetal, desde as fases iniciais da vida, durante o período gestacional, até o final da formação do período dentário.

Os estudos disponíveis enfocam o *diabetes mellitus* tipo II, e os

estudos em animais têm resultados heterogêneos, que são inconclusivos. Além disso, a maioria dos estudos originais sobre a prole da mãe com DMG não incluiu dados sobre DDE

A literatura demonstrou em estudo com animais que, além dos fatores genéticos, traumáticos e hormonais podem afetar a amelogênese e o processo de desenvolvimento ao afetar a erupção e a mineralização do dente e isto inclui o desenvolvimento do esmalte dentário (61,62). Vale ressaltar que a organização do esmalte, dentina, cemento e polpa dentária é comum tanto para os humanos quanto para os roedores (63).

Estudo recente de Pascon et. al (2019) (64) com objetivo de avaliar as consequências a longo prazo da exposição intrauterina à hiperglicemia em DDE nos descendentes entre 3-12 anos após o nascimento, concluiu que o DMG foi associado aos efeitos adversos do DDE na prole. Estes resultados estabeleceram as bases para novos estudos afim de determinar o impacto do DMG no risco de DDE a longo prazo. As oportunidades para melhorar os efeitos perinatais e os efeitos intergeracionais do DMG em longo prazo existem no nível de prevenção, triagem e tratamento do DMG e intervenções pós-natal de seus descendentes. É necessário avançar ainda mais para melhorar os resultados em longo prazo para os descendentes expostos ao meio materno alterado pela hiperglicemia, e a compreensão dos fatores de risco é essencial.

Identificar fatores associados às alterações do esmalte do descendente como também, desenvolver estudos com propostas de

intervenção, para que medidas preventivas e terapêuticas possam ser investigadas e futuramente adotadas de forma a minimizar as consequências negativas do DMG no desenvolvimento do esmalte dental.

Os estudos de acompanhamento em longo prazo são desafiadores, particularmente em relação ao custo e ao planejamento em longo prazo. Além disso, ao mesmo tempo em que se esforça para aperfeiçoar continuamente o controle glicêmico antes e durante a gravidez é, sem dúvida, importante melhorar os resultados a curto e longo prazo para as crianças de mães com DMG.

Impacto da COVID-19 na pesquisa clínica

Neste sentido, a proposta inicial desta tese incluiu três diferentes abordagens de pesquisa na mesma temática: 1) pesquisa clínica com o objetivo de analisar a repercussão da hiperglicemia gestacional materna no DDE da dentição decídua da criança e associar os níveis maternos das variáveis bioquímicas Ca, calcitonina, PTH e vitamina D com DDE; 2) desenvolver o Diagrama que facilitasse a correlação do período gestacional com a fase de formação de esmalte dental do descendente e 3) pesquisa experimental para avaliar a repercussão do exercício em ratas prenhes com diabetes moderado sobre o esmalte dos dentes da ninhada.

Inesperadamente a proposta clínica teve importante impacto negativo do Covid-19 no desenvolvimento da pesquisa e meios para superá-lo. Desafio que exigiu muitas adaptações e estratégias para

desenvolver pesquisa foi a pandemia do Covid-19 e seus efeitos na sociedade. O efeito foi devastador para humanidade e refletiu no desenvolvimento das pesquisas e no acesso aos serviços de saúde. Isso afetou substancialmente nossa pesquisa clínica. Os meios para superar este desafio na parte clínica da pesquisa incluíram as visitas virtuais e telemedicina, considerando que estas desempenham papel fundamental na realização de pesquisas e na prestação de cuidados aos pacientes na sociedade. Embora todo esforço tenha sido realizado pela equipe Diamater e pela doutoranda, o sucesso foi parcial. Cumprimos o compromisso do cronograma com a coleta de sangue dos grupos de mães DMG e não-DMG, contudo, não foi possível avaliar com rigor científico a dentição decídua da criança. Depois de discussão com a equipe, tomamos a decisão de aguardar o retorno da “normalidade” das condições sanitárias para retomarmos a proposta clínica inicial após a conclusão deste doutorado.

A presente Tese, inédita, integra de modo complementar o Projeto Temático Diamater, segue a linha da dissertação de mestrado desenvolvida pela doutoranda, agora com os objetivos a saber:

1) Projetar e desenvolver o diagrama com a cronologia do desenvolvimento do esmalte dentário (DED) para possibilitar a investigação dos fatores de risco intrauterinos e repercussões da programação fetal da DDE, com base no conceitual do *Diamater Study Group*.

2) Analisar o impacto do exercício de natação das ratas prenhes diabéticas no desenvolvimento do esmalte dentário da ninhada em sua morfologia, estrutura, e propriedades físicas e químicas.

Os resultados obtidos até o momento da Qualificação desta Tese, estão apresentados em 1 artigo, completo, e resultados preliminares do artigo 2.

1 - Fetal and postnatal programming of dental enamel development: the DED Diamater's conceptual diagram

2 – Impact of diabetic pregnant rat swimming exercise on enamel development, microhardness, and volume of offspring's teeth.

REFERÊNCIAS

1. Rudge M, Calderon I, Ramos M, Peraçoli J. Avaliação da vitalidade dos fetos de gestantes diabéticas - Análise cardiotocográfica. *Rev Ginecol e Obs USP*. 1994;5(4):201–7.
2. Honorio-França A, Calderon I, Ramos M, Rudge M. Repercussões fetais da hiperglicemia materna decorrente de lesão pancreática de testes repetidos à glicose na prenhez de ratas. *Rev Ginecol e Obs São Paulo*. 1995;17(691–695).
3. Rudge M, Calderon I, Ramos M, Rodrigues M. Diabetes and experimental pregnancy in rats: course of maternal blood glucose levels and its repercussions on the blood glucose levels and pancreas of newborn pups. *Brazilian J Med Biol Res*. 1995;28:219–25.
4. Berezowski A, Suetake H, Missiato M, Rudge M. Mortalidade materna: análise dos últimos dez anos do Centro Médico-Universitário de Botucatu-UNESP. *Rev Bras Ginecol e Obs*. 1995;17(10):1001–7.
5. Rudge M, Calderon I, Ramos M, Maestá I, Souza L, Peraçoli J. Perspectiva perinatal decorrente do rígido controle pré-natal em gestações complicadas pelo diabete. *Rev Bras Ginecol e Obs*. 1995;17(1):26–32.
6. Maestá I, Rudge M, Calderon I, Ramos M, Peraçoli J, Henry M. Effects of insulin therapy on the mother. The newborn and the placenta of diabetic rats. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1997;76(167):97.
7. Group E (Estudo C para P da P com AC. ECPPA: randomised trial of low dose aspirin for the prevention of maternal and fetal complications in high risk pregnant women. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol* [Internet]. 1996 Jan;103(1):39–47. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1471-0528.1996.tb09513.x>
8. Rudge MVC, Calderon I de MP, Ramos MD, Abbade JF, Rugolo LMSS. Perinatal Outcome of Pregnancies Complicated by Diabetes and by Maternal Daily Hyperglycemia Not Related to Diabetes. *Gynecol Obstet Invest* [Internet]. 2000;50(2):108–12. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/10293>
9. Mascaro MS, Calderon I de MP, Costa RA de A, Maestá I, Bossolan G, Rudge MVC. Cardiotocografia Anteparto e Prognóstico Perinatal em Gestações Complicadas pelo Diabete: Influência do Controle Metabólico Materno. *Rev Bras Ginecol e Obs* [Internet]. 2002 Oct;24(9):593–9. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-72032002000900005&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
10. Mascaro MS, Calderon I de MP, Rudge MVC. Análise dos Métodos

- Biofísicos de Avaliação Fetal Anteparto, em Gestações Complicadas pelo Diabetes. Fem (Federação Bras das Soc Ginecol e Obs. 2003;31(3):259–63.
11. Rudge MVC, Nero U, Calderon I, Lima R. Prospective study of the influence of the placental weight, volume and density of pregnant women with high blood pressure or diabetes in the perinatal outcome. *Hypertens Pregnancy*. 2004;23:47.
 12. Volpato GT, Damasceno DC, Miranda MRF, Sabbag Filho D, Calderon I de MP, Rudge MVC. Mixture of vitamin C, hesperidin and piperidol exposure in pregnancy: maternal-fetal repercussions. *Rev Bras Ciências Farm [Internet]*. 2006 Mar;42(1):77–82. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322006000100008&lng=en&nrm=iso&tlng=en
 13. Basso NA de S, Costa RAA, Magalhães CG, Rudge MVC, Calderon I de MP. Insulinoterapia, controle glicêmico materno e prognóstico perinatal: diferença entre o diabetes gestacional e o clínico. *Rev Bras Ginecol e Obs [Internet]*. 2007 May;29(5):253–9. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-72032007000500006&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
 14. Rudge MVC, Maestá I, Rudge CVC, Campanini F, Gomes M, Moraes V, et al. Dois níveis hierarquizados de atenção ao parto no modelo de maternidade segura: resultado materno e do recém-nascido. *Rev La Div Ciencias la Salud la Univ del Norte*. 2007;22:56–7.
 15. Rudge MVC, Lima CAB, Paulette TAL, Jovanovic L, Negrato CA, Rudge CVC, et al. Influence of Lower Cutoff Values for 100-G Oral Glucose Tolerance Test and Glycemic Profile for Identification of Pregnant Women at Excessive Fetal Growth Risk. *Endocr Pract [Internet]*. 2008 Sep;14(6):678–85. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1530891X20412790>
 16. Braga A, Maestá I, Michelin OC, Delmanto LRG, Consonni M, Rudge MVC, et al. Maternal and perinatal outcomes of first pregnancy after chemotherapy for gestational trophoblastic neoplasia in Brazilian women. *Gynecol Oncol [Internet]*. 2009 Mar;112(3):568–71. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0090825808009359>
 17. Iessi IL, Bueno A, Sinzato YK, Taylor KN, Rudge MV, Damasceno DC. Evaluation of neonatally-induced mild diabetes in rats: Maternal and fetal repercussions. *Diabetol Metab Syndr [Internet]*. 2010 Dec 8;2(1):37. Available from: <https://dmsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1758-5996-2-37>.
 18. Saito FH, Damasceno DC, Kempinas WG, Morceli G, Sinzato YK, Taylor KN, et al. Repercussions of mild diabetes on pregnancy in Wistar rats and on the fetal development. *Diabetol Metab Syndr*

- [Internet]. 2010 Dec 23;2(1):26. Available from: <https://dmsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1758-5996-2-26>
19. Moreli JB, Morceli G, De Luca AKC, Magalhães CG, Costa RAA, Damasceno DC, et al. Influence of Maternal Hyperglycemia on IL-10 and TNF- α Production: The Relationship with Perinatal Outcomes. *J Clin Immunol* [Internet]. 2012 Jun 30;32(3):604–10. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10875-011-9634-3>
 20. Sinzato YK, Volpato GT, Iessi IL, Bueno A, Calderon I de MP, Rudge MVC, et al. Neonatally Induced Mild Diabetes in Rats and Its Effect on Maternal, Placental, and Fetal Parameters. *Exp Diabetes Res* [Internet]. 2012;2012:1–7. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/jdr/2012/108163/>
 21. Damasceno DC, Sinzato YK, Bueno A, Netto AO, Dallaqua B, Gallego FQ, et al. Mild Diabetes Models and Their Maternal-Fetal Repercussions. *J Diabetes Res* [Internet]. 2013;2013:1–9. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/jdr/2013/473575/>
 22. Bueno A, Sinzato YK, Sudano MJ, Alvarenga F da CL e, Calderon I de MP, Rudge MVC, et al. Short and long-term repercussions of the experimental diabetes in embryofetal development. *Diabetes Metab Res Rev* [Internet]. 2014 Oct;30(7):575–81. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/dmrr.2521>
 23. Moura PMSS, Maestá I, Rugolo LMSS, Angulski LFRB, Caldeira AP, Peraçoli JC, et al. Risk factors for perinatal death in two different levels of care: a case–control study. *Reprod Health* [Internet]. 2014 Dec 30;11(1):11. Available from: <https://reproductive-health-journal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1742-4755-11-11>
 24. Gelaleti RB, Damasceno DC, Santos DP, Calderon IMP, Rudge MVC. Increased DNA Damage is Related to Maternal Blood Glucose Levels in the Offspring of Women With Diabetes and Mild Gestational Hyperglycemia. *Reprod Sci* [Internet]. 2016 Mar 2;23(3):318–23. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1933719115602766>
 25. de Sousa Basso NA, Morceli G, Costa R, Dias A, Rudge MVC, Calderon IMP. Validation of a symphysis-fundal height chart developed for pregnancy complicated by diabetes and hyperglycemia: an observational study. *Reprod Health* [Internet]. 2016 Dec 3;13(1):89. Available from: <http://reproductive-health-journal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12978-016-0202-4>
 26. Vernini JM, Moreli JB, Magalhães CG, Costa RAA, Rudge MVC, Calderon IMP. Maternal and fetal outcomes in pregnancies complicated by overweight and obesity. *Reprod Health* [Internet]. 2016 Dec 27;13(1):100. Available from: <http://reproductive-health-journal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12978-016-0206-0>
 27. Sirimarco MP, Guerra HM, Lisboa EG, Vernini JM, Cassetari BN, de

- Araujo Costa RA, et al. Diagnostic protocol for gestational diabetes mellitus (GDM) (IADPSG/ADA, 2011): influence on the occurrence of GDM and mild gestational hyperglycemia (MGH) and on the perinatal outcomes. *Diabetol Metab Syndr* [Internet]. 2017 Dec 3;9(1):2. Available from: <http://dmsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13098-016-0200-2>
28. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* [Internet]. 2012 Jan 1;35(Supplement_1):S64–71. Available from: https://diabetesjournals.org/care/article/35/Supplement_1/S64/26301/Diagnosis-and-Classification-of-Diabetes-Mellitus
 29. Weinert LS. International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups Recommendations on the Diagnosis and Classification of Hyperglycemia in Pregnancy. *Diabetes Care* [Internet]. 2010 Jul 1;33(7):e97–e97. Available from: <https://diabetesjournals.org/care/article/33/7/e97/39395/International-Association-of-Diabetes-and>
 30. Katz L, Amorim M, Coutinho I, Santos LC. Análise Comparativa de Testes Diagnósticos para Diabete Gestacional. *Rev Bras Ginecol e Obs* [Internet]. 2002 Sep;24(8). Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-72032002000800005&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
 31. Rudge M, Calderon I, Ramos M, Suetake H, Peraçoli J. Diabetes investigation during pregnancy. *Rev Bras Ginecol e Obs*. 1996;18(1):21–8.
 32. The HAPO Study Cooperative Research Group. Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcomes. *N Engl J Med* [Internet]. 2008 May 8;358(19):1991–2002. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa0707943>
 33. HAPO Study Cooperative Research Group. Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) Study: Associations With Neonatal Anthropometrics. *Diabetes* [Internet]. 2009 Feb 1;58(2):453–9. Available from: <http://diabetes.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/db08-1112>
 34. Pedersen J. A diabética grávida e seu recém-nascido. 2ª ED. São Paulo: Editora Manole; 1979.
 35. Metzger BE. Biphasic Effects of Maternal Metabolism on Fetal Growth; Quintessential Expression of Fuel-Mediated Teratogenesis. *Diabetes* [Internet]. 1991 Dec 1;40(Supplement_2):99–105. Available from: https://diabetesjournals.org/diabetes/article/40/Supplement_2/99/9037/Biphasic-Effects-of-Maternal-Metabolism-on-Fetal
 36. Pimenta WP, Calderon IMP, Cruz NS, Santos ML, Aragon FF,

- Padovani CR. Subclinical abnormalities of glucose metabolism in Brazilian women with a history of gestational diabetes mellitus. *Acta Obstet Gynecol Scand* [Internet]. 2004 Dec;83(12):1152–8. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.0001-6349.2004.00444.x>
37. Chen G, Chen J, Yan Z, Li Z, Yu M, Guo W, et al. Maternal diabetes modulates dental epithelial stem cells proliferation and self-renewal in offspring through apurinic/apyrimidinic endonuclease 1-mediated DNA methylation. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Feb 17;7(1):40762. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep40762>
 38. Lal S, Cheng B, Kaplan S, Softness B, Greenberg E, Goland RS, et al. Accelerated Tooth Eruption in Children With Diabetes Mellitus. *Pediatrics* [Internet]. 2008 May 1;121(5):e1139–43. Available from: <https://publications.aap.org/pediatrics/article/121/5/e1139/73459/Accelerated-Tooth-Eruption-in-Children-With>
 39. Silva-Sousa YTC, Peres LC, Foss MC. Enamel hypoplasia in a litter of rats with alloxan-induced diabetes mellitus. *Braz Dent J* [Internet]. 2003;14(2):87–93. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-64402003000200003&lng=en&tlng=en
 40. Villarino ME, Goya JA, De Lucca RC, Ubios AM. Alterations of Tooth Eruption and Growth in Pups Suckling from Diabetic Dams. *Pediatr Res* [Internet]. 2005 Oct;58(4):695–9. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1203/01.PDR.0000180599.54807.24>
 41. Gaspar C, Jesus M. Repercussões da Diabetes materna para o neonato. *Rev Enferm UNISA*. 2004;5:57–61.
 42. Montenegro CAB, Filho J de R. *Obstetrícia*. 12ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. 60 p.
 43. Junqueira L, Carneiro J. *Histologia Básica*. 8ª Ed. Guanabara Koogan; 1995.
 44. Belizán JM, Villar J. The relationship between calcium intake and edema-, proteinuria-, and hypertension-gestosis: an hypothesis. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 1980 Oct 1;33(10):2202–10. Available from: <https://academic.oup.com/ajcn/article/33/10/2202/4692362>
 45. Karamali M, Asemi Z, Ahmadi-Dastjerdi M, Esmailzadeh A. Calcium plus vitamin D supplementation affects pregnancy outcomes in gestational diabetes: randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Public Health Nutr* [Internet]. 2016 Jan 20;19(1):156–63. Available from: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S1368980015000609/type/journal_article
 46. Pittas AG, Lau J, Hu FB, Dawson-Hughes B. The Role of Vitamin D and Calcium in Type 2 Diabetes. A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2007 Jun 1;92(6):2017–29. Available from:

- <https://academic.oup.com/jcem/article/92/6/2017/2623152>
47. Zemel MB. Insulin Resistance vs. Hyperinsulinemia in Hypertension: Insulin Regulation of Ca²⁺ Transport and Ca²⁺-Regulation of Insulin Sensitivity. *J Nutr* [Internet]. 1995;125(suppl_6):1738S–1743S. Available from: https://doi.org/10.1093/jn/125.suppl_6.1738S
 48. Sociedade Brasileira de Diabetes. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes. São Paulo: AC FARMACÊUTICA;
 49. Pittas AG, Harris SS, Stark PC, Dawson-Hughes B. The Effects of Calcium and Vitamin D Supplementation on Blood Glucose and Markers of Inflammation in Nondiabetic Adults. *Diabetes Care* [Internet]. 2007 Apr 1;30(4):980–6. Available from: <https://diabetesjournals.org/care/article/30/4/980/25719/The-Effects-of-Calcium-and-Vitamin-D>
 50. Bolland MJ, Barber PA, Doughty RN, Mason B, Horne A, Ames R, et al. Vascular events in healthy older women receiving calcium supplementation: randomised controlled trial. *BMJ* [Internet]. 2008 Feb 2;336(7638):262–6. Available from: <https://www.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmj.39440.525752.BE>
 51. Mendoza A. Desarrollo y erupción dentaria. In: *Odontopediatria*. Barcelon: Masson; 2004. p. 55–72.
 52. Thesleff I, Tummers M. Tooth organogenesis and regeneration. *StemBook* [Internet]. 2009;1–12. Available from: <http://www.stembook.org/node/535>
 53. Simmer J, Hu J. Dental enamel formation and its impact on clinical dentistry. *J Dent Educ*. 2001;65(9):896–905.
 54. RYTHÉN M, NORÉN JG, SABEL N, STEINIGER F, NIKLASSON A, HELLSTRÖM A, et al. Morphological aspects of dental hard tissues in primary teeth from preterm infants. *Int J Paediatr Dent* [Internet]. 2008 Nov;18(6):397–406. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-263X.2008.00928.x>
 55. Franco KMD, Line SRP, Moura-Ribeiro MVL de. Prenatal and neonatal variables associated with enamel hypoplasia in deciduous teeth in low birth weight preterm infants. *J Appl Oral Sci* [Internet]. 2007 Dec;15(6):518–23. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1678-77572007000600012&lng=en&tlng=en
 56. Angker L, Swain MV. Nanoindentation: Application to dental hard tissue investigations. *J Mater Res* [Internet]. 2006 Aug 1;21(8):1893–905. Available from: <http://link.springer.com/10.1557/jmr.2006.0257>
 57. Bowes JH, Murray MM. The chemical composition of teeth. *Biochem J* [Internet]. 1935 Dec 1;29(12):2721–7. Available from: <https://portlandpress.com/biochemj/article/29/12/2721/22700/The-chemical-composition-of-teethThe-composition>

58. Lowater F, Murray MM. Chemical composition of teeth. *Biochem J* [Internet]. 1937 May 1;31(5):837–41. Available from: <https://portlandpress.com/biochemj/article/31/5/837/28604/Chemical-composition-of-teethSpectrographic>
59. Aine L, Backström MC, Mäki R, Kuusela A-L, Koivisto A-M, Ikonen R-S, et al. Enamel defects in primary and permanent teeth of children born prematurely. *J Oral Pathol Med* [Internet]. 2000 Sep;29(8):403–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1034/j.1600-0714.2000.290806.x>
60. Fearn JM, Bryan EM, Elliman AM, Brook AH, Williams DM. Enamel defects in the primary dentition of children born weighing less than 2000 g. *Br Dent J* [Internet]. 1990 Jun 9;168(11):433–7. Available from: <http://www.nature.com/articles/4807231>
61. Funakoshi Y, Kushida Y, Hieda T. Dental observations of low birth weight infants. *Pediatr Dent*. 1981;3(1):21–5.
62. Johnsen D, Krejci C, Hack M, Fanaroff A. Distribution of Enamel Defects and the Association with Respiratory Distress in Very Low Birthweight Infants. *J Dent Res* [Internet]. 1984 Jan 8;63(1):59–64. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/00220345840630011401>
63. A review of the developmental defects of enamel index (DDE Index). Commission on Oral Health, Research & Epidemiology. Report of an FDI Working Group. *Int Dent J* [Internet]. 1992 Dec;42(6):411–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1286924>
64. Pascon T, Barbosa AMP, Cordeiro RCL, Bussaneli DG, Prudencio CB, Nunes SK, et al. Prenatal exposure to gestational diabetes mellitus increases developmental defects in the enamel of offspring. Sánchez-Margalet V, editor. *PLoS One* [Internet]. 2019 Feb 27;14(2):e0211771. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0211771>

Seção 3
Artigos