



Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Silas Alves Costa

**Alterações no esmalte dentário de ratos a partir da exposição perinatal ao
Bisfenol A**

**Araraquara
2020**



Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Silas Alves Costa

Alterações no esmalte dentário de ratos a partir da exposição perinatal ao Bisfenol A

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia de Araraquara para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas, na Área de Odontopediatria.

Orientadora: Profa. Dra. Rita de Cássia Loiola Cordeiro

Coorientador: Dr. Diego Giroto Bussaneli

Araraquara
2020

C837a Costa, Silas Alves
Alterações no esmalte dentário de ratos a partir da
exposição perinatal ao Bisfenol A / Silas Alves Costa. --
Araraquara, 2020
45 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
(Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara
Orientadora: Rita de Cássia Liola Cordeiro
Coorientador: Diego Girotto Bussaneli

1. Esmalte dentário. 2. Amelogênese. 3. Rato. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da
Faculdade de Odontologia, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Silas Alves Costa

**Alterações no esmalte dentário de ratos a partir da exposição perinatal ao
Bisfenol A**

Comissão julgadora

**Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Odontológicas, na
Área de Odontopediatria**

Presidente e orientadora: Prof.^a Dr.^a Rita de Cássia Loiola Cordeiro (FOAr/UNESP)

2º Examinador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri (FOAr/UNESP)

3º Examinadora: Prof.^a Dr.^a Juliana Feltrin de Souza (FO/UFPR)

Araraquara, 06 de novembro de 2020.

DADOS CURRICULARES

Silas Alves Costa

Nascimento: 5 de novembro de 1994 - Cajapió, Maranhão

Filiação: Fernanda Cristina Pinheiro Alves e Romualdo Dias Costa

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2013-2018 – Bacharel em Odontologia

Curso de Odontologia

Universidade Federal do Maranhão

2018-2020 – Mestre em Ciências Odontológicas, Área de Odontopediatria

Faculdade de Odontologia de Araraquara

Universidade Estadual Paulista

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** a força para chegar até aqui e me conceder o ânimo para seguir em frente. A Sua proteção e cuidado durante essa trajetória me incentivam a confiar no Seu amor e graça.

Aos meus pais, **Fernanda Alves** e **Romualdo Costa**, os seus esforços e toda a dedicação para que eu concluísse este curso de pós-graduação. Eles ouviram os anseios do meu coração e confiaram nas oportunidades que a educação poderia me proporcionar.

Os meus amados avôs, **Walber Costa** e **José Alves**, a alegria expressa nos seus rostos em razão das minhas conquistas e a confiança nos meus sonhos. Agradeço às minhas avós, **Darialva Costa** e **Maria Tereza Alves** (*in memoriam*), duas professoras fantásticas! Elas plantaram em mim o desejo de ensinar e ainda hoje são exemplos de amor e cuidado.

Aos meus amados irmãos **Sandro Costa**, **Samara Costa** e **Sara Costa**. Vocês são meus incentivos para seguir crescendo. Espero que este trabalho encoraje vocês a buscarem os seus sonhos incessantemente.

Ao meu sincero incentivador **Yuri Lobo**, toda a paciência e carinho que dispensou a mim. Obrigado por confiar no meu potencial e por não medir esforços para contribuir comigo e com esta pesquisa.

Sou grato à **Faculdade de Odontologia de Araraquara** (UNESP) por viabilizarem a minha formação numa instituição pública, gratuita, acessível e de qualidade, na pessoa do seu Diretor **Prof. Dr. Edson Campos** e Vice-diretora **Prof.^a Patrícia Garcia**.

À minha caríssima orientadora **Prof.^a Dr.^a Rita Cordeiro**, a confiança no meu trabalho e generosidade em todas as etapas deste curso. Tia Rita, tenho muito orgulho da sua orientação e tenho convicção que seus ensinamentos se estendem para além da vida acadêmica. Obrigado por ser exemplo de seriedade, profissionalismo, paciência e gentileza. Obrigado por tudo!

Agradeço também ao meu Co-orientador, **Dr. Diego Bussanelli**, a sua paciência e gentileza com que me conduziu nesta pesquisa. Você foi fundamental em todos processos e me sinto honrado por compartilhar essa trajetória com você.

Ao **Prof. Dr. Paulo Cerri** e a **Prof.^a Dr.^a Estela Cerri**, a presteza ao abrirem as portas do Laboratório de Histologia e me receberem com tanta gentileza. Tenho seus ensinamentos em alta conta e sei que vou levá-los comigo por onde eu for. Oportunamente, agradeço ao técnico, **Sr. Pedro Sérgio Simões** e a todos os demais pesquisadores deste Laboratório por suas significativas contribuições com este trabalho e pela convivência harmoniosa.

Agradeço à **Universidade Federal do Maranhão**, a oportunidade de realizar parte desta pesquisa em suas dependências, na pessoa do **Prof. Dr. José Roberto Bauer**, que supervisionou parte desta pesquisa e a quem direciono profunda gratidão. Acertadamente, agradeço à **Rayssa de Macêdo**, a sua grande contribuição com este estudo, além de sua presteza e companhia fraterna.

Aos professores da Disciplina de Odontopediatria, **Prof.^a Dr.^a Lourdes dos Santos-Pinto**, **Prof.^a Dr.^a Angela Zuanon**, **Prof.^a Dr.^a Josimeri Costa**, **Prof. Dr. Fábio Lima**, **Prof.^a Dr.^a Fernanda Brighenti** pela dedicação que dispensaram em minha formação e, especialmente, à estimada **Prof.^a Dr.^a Elisa Giro** por me ensinar de perto o exercício da Odontopediatria e demonstrar tanto amor pela carreira, pelos pacientes e pelos alunos desta instituição.

Aos meus amigos de pós-graduação da Odontopediatria, **Bianca Silva, Marina Miranda, Isabela Catananti, Rafael Amorim, Luciana Solera, Vinícius Nogueira, Analú de Oliveira, Aline Farias, Camila Fragelli, Karina Salomão e Ana Carolina** pelo incentivo mútuo e amparo constante durante esta trajetória.

Aos colegas que a Pós-Graduação me trouxe como grato presente, **Amanda Ferro, Mayson Araújo, César Abreu, Jéssica Katarine, Lucas Portela, Patrícia Schnaider e Adriana de Jesus**. Sou grato pelo carinho fraterno, por cruzarem meu caminho e me terem feito tanto bem. Estes momentos foram mais fáceis com vocês ao meu lado!

Ao Departamento de Morfologia e Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr, representado pela chefe **Prof.^a Dr.^a Angela Zuanon** e pelo Vice-Chefe **Prof. Dr. Paulo Cerri**. Oportunamente, também agradeço aos funcionários deste departamento pela assistência e presteza durante este curso, **Dulce de Oliveira, Flávia Annunzio, Tânia Moreira, Pedro Alves e Diego Pendenza**.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas** coordenado pela **Prof.^a Dr.^a Fernanda Brighenti** e acertadamente, estendo meus agradecimentos aos funcionários da Seção de Pós-graduação, **José Alexandre Garcia e Cristiano Lamonier**, o apoio e prestada que sempre me dispensaram.

Aos colegas do curso de **Pós-Graduação em Ciências Odontológicas**, em especial aos da **Área Odontopediatria**, pelas experiências compartilhadas e pelo incentivo.

Agradeço aos **alunos de graduação** da disciplina de Odontopediatria e aos **pacientes** que passaram por mim nestes anos. Saibam que vocês foram fundamentais para a minha formação.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

Dedico este trabalho aos meus futuros alunos. Este manuscrito é a representação de parte da busca incansável para oferecer o melhor de mim!

“Se a educação sozinha não transforma a sociedade,
sem ela tampouco a sociedade muda.”

Paulo Freire*

* Freire, P. Pedagogia da indignação: cartas pedagógicas e outros escritos. São Paulo: Editora UNESP, 2000.

Costa SA. Alterações no esmalte dentário de ratos a partir da exposição perinatal ao Bisfenol A [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

RESUMO

A amelogenese é um processo sensível às interferências de fatores genéticos, traumáticos, hormonais, de agentes medicamentosos e a alguns poluentes. O Bisfenol A (BPA) é um desregulador endócrino que tem sido sugerido como fator de interferência em processos importantes do período perinatal. **OBJETIVO:** Avaliar o desenvolvimento e a microestrutura do esmalte dentário de ratos a partir da exposição ao BPA durante o período gestacional e de amamentação. **METODOLOGIA:** Após o acasalamento e confirmação da prenhez, seis ratas (*Rattus norvegicus, albinus, Holtzman*) foram aleatoriamente distribuídas em três grupos que receberam diariamente, no Grupo 1: dose intragástrica de BPA (5 µg/kg) durante toda a gestação e até o período de desmame dos filhotes (21 dias após o nascimento); Grupo 2: dose intragástrica de óleo de milho puro durante a gestação e dose de BPA (5 µg/kg) durante o período de amamentação dos filhotes; Grupo 3: dose intragástrica de óleo de milho durante toda a gestação até o período de desmame dos filhotes. Os filhotes foram eutanasiados nos períodos de 7 dias (G1=5; G2=5; e G3=4) e 12 dias (G1=7; G2=6; e G3=4) de vida para avaliações morfométricas dos germes dos dentes molares; e aos 60 dias foram eutanasiados os filhotes (G1=17; G2=11; e G3=6) sendo extraídos os incisivos inferiores para análise do conteúdo elementar na superfície dos esmalte. Para o processamento histológico e análises morfométricas (7 e 12 dias), as cabeças dos ratos foram removidas, fixadas e processadas para inclusão em parafina. Cortes frontais exibindo os primeiros molares superiores foram corados com hematoxilina de Carazzi e eosina (H&E) para mensuração da espessura da matriz de esmalte nas regiões das cúspides e na lateral vestibular. Os incisivos (60 dias) foram submetidos a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia por energia dispersiva (EDS) para análise do conteúdo de fósforo, cálcio e carbono. Os dados quantitativos foram comparados por ANOVA e pós-teste de Tukey e Games-Howell, considerando $\alpha=0.05$. **RESULTADOS:** Os animais de 7 dias expostos ao BPA (G1 e G2) apresentaram matriz de esmalte com espessuras semelhantes e ambas mais delgadas que o grupo controle (G3) em todas as regiões avaliadas ($p<0.036$). Aos 12 dias, os animais ao BPA (G1 e G2) apresentaram espessuras semelhantes e ambas mais delgadas que o grupo controle (G3) na área da cúspide ($p<0.004$). Nos animais

de 60 dias, os grupos expostos aos BPA (G1 e G2) não diferiram entre si quanto aos elementos avaliados, sendo ambos menores que o grupo controle (G3) para os elementos fósforo e cálcio ($p < 0.001$). **CONCLUSÃO:** Os dentes dos animais que foram expostos ao BPA no período gestacional e/ou na amamentação sofreram alterações no conteúdo de cálcio, fósforo e carbono na superfície do esmalte dos dentes incisivos (60 dias) e redução da espessura da matriz de esmalte dos germes dos dentes molares (7 e 12 dias).

Palavras-chave: Esmalte dentário. Amelogênese. Rato.

Costa SA. Changes in the dental enamel of rats from perinatal exposure to Bisphenol A [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

ABSTRACT

Amelogenesis is a process that is sensitive to interference from genetic, traumatic, hormonal factors, drugs and some pollutants. Bisphenol A (BPA) is an endocrine-disrupting chemical that has been suggested as an interference factor in important processes in the perinatal period. **OBJECTIVE:** Evaluating the development and microstructure of dental enamel in rats from exposure to BPA during pregnancy and breastfeeding. **METHODS:** After mating and confirmation of pregnancy, six rats (*Rattus norvegicus, albinus, Holtzman*) were randomly distributed into three groups that received daily, in Group 1: intragastric BPA (5 µg/kg) during pregnancy and breastfeeding period of the puppies (21 days after birth); Group 2: intragastric corn oil during pregnancy and BPA (5 µg/kg) during the puppies' breastfeeding period; Group 3: intragastric corn oil during pregnancy and breastfeeding period. The puppies were euthanized in the periods of 7 days (G1 = 5; G2 = 5; and G3 = 4) and 12 days (G1 = 7; G2 = 6; and G3 = 4) of life for morphometric evaluations of the molar teeth germs; and at 60 days the puppies were euthanized (G1 = 17; G2 = 11; and G3 = 6) and the lower incisors were extracted for analysis of the elemental content on the enamel surface. For histological processing and morphometric analysis (7 and 12 days), the rats' heads were removed, fixed and processed for inclusion in paraffin. Frontal sections showing the first maxillary molars were stained with Carazzi hematoxylin and eosin (H&E) to measure the thickness of the enamel matrix in the region of the cusps and in the buccal side. The incisors (60 days) were submitted to scanning electron microscopy (SEM) and dispersive energy spectroscopy (EDX) to analyze the content of phosphorus, calcium and carbon. Quantitative data were compared by ANOVA and Tukey and Games-Howell posthoc, considering $\alpha = 0.05$. **RESULTS:** In the 7-day animals exposed to BPA (G1 and G2), they had an enamel matrix with similar thicknesses and both were thinner than the control group (G3) in all evaluated regions ($p < 0.036$). At 12 days, BPA animals (G1 and G2) had similar thicknesses and both were thinner than the control group (G3) in the cusp area ($p < 0.004$). In the 60-day animals, the groups exposed to BPA (G1 and G2) did not differ in relation to the evaluated elements, both being smaller than the control group (G3) for the elements phosphorus and calcium ($p < 0.001$). **CONCLUSION:** The teeth of animals that were exposed to BPA during pregnancy and/or breastfeeding underwent changes in the

content of calcium, phosphorus and carbon on the enamel surface of the incisor teeth and reduced thickness of the enamel matrix of the molar teeth germs.

Keywords: Dental enamel. Amelogenesis. Rat.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Aspecto do esfregaço vaginal de ratas antes e após o acasalamento com coloração de Shorr.	22
Figura 2 - Esquematização do plano de administração de Bisfenol A no período perinatal de acordo com o grupo e tempo de exposição.	23
Figura 3 - Esquematização do seccionamento dos dentes incisivos.	25
Figura 4 - Germe dentário de molares superiores de ratos de 7 dias de idade corados em H&E.	27
Figura 5 - Germe dentário de molares superiores de ratos de 12 dias de idade corados em H&E.	29
Figura 6 - Aspecto do esmalte dentário de ratos de 60 dias de acordo com o grupo de exposição.	31
Figura 7 - Aspecto dos dentes incisivos de ratos de 60 dias de acordo com o grupo de exposição por microscopia eletrônica de varredura, magnificação 50x.	32

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Espessura (μm) da matriz de esmalte do germe dentário de molares superiores de ratos de 7 dias de idade de acordo com o local de aferição.28

Gráfico 2 - Espessura (μm) da matriz de esmalte do germe dentário de molares superiores de ratos de 12 dias de idade de acordo com o local de aferição.30

Gráfico 3 - Frequência média do conteúdo de fósforo, cálcio e carbono na superfície do esmalte de dentes de ratos de 60 dias.33

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 PROPOSIÇÃO	20
3 METODOLOGIA	21
3.1 Animais	21
3.2 Processamento Histológico dos Germes Dentários	24
3.3 Análise Morfométrica da Matriz de Esmalte.....	24
3.4 Preparo dos Dentes Incisivos	25
3.5 Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura	26
3.6 Análise de Espectroscopia de Raios X por Energia Dispersiva.....	26
3.7 Análise Estatística.....	26
4 RESULTADOS.....	27
5 DISCUSSÃO	34
6 CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS.....	39
ANEXO A – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais	45

1 INTRODUÇÃO

A formação do esmalte dentário é marcada por estágios sucessivos de sinalização e indução entre células epiteliais e ectomesenquimais^{1,2}. As células do epitélio interno do órgão do esmalte se diferenciam lentamente em ameloblastos, célula responsável pela amelogênese^{3,4}. As células ectomesenquimais periféricas da papila dental se diferenciam em odontoblastos e iniciam a formação da dentina^{2,5}. Após a formação da dentina do manto, os ameloblastos completam sua morfodiferenciação e iniciam o estágio de secreção da matriz proteica⁵.

Durante o estágio de secreção, os ameloblastos assumem formas cilíndricas, com núcleo e mitocôndrias polarizados na porção proximal, enquanto que a região distal adquire aspecto cônico, denominado processo de Tomes⁴. Neste período, as proteínas que formam a matriz extracelular do esmalte são sintetizadas e secretadas. São elas: as amelogeninas, que definem a forma e a espessura do esmalte; a ameloblastina e a enamelinina que são produzidas em menor quantidade e estão envolvidas na formação dos cristais de hidroxiapatita^{1,4,6}.

No estágio subsequente, esses cristais aumentam de tamanho, enquanto as proteases são depositadas sobre a matriz orgânica, primeiramente a metaloproteinase-20 (MMP-20) e posteriormente a calicreína-4 (KLK4), que removem o conteúdo orgânico gradativamente, caracterizando o estágio de maturação do esmalte dentário^{4,7}. Neste momento, os ameloblastos sofrem alterações estruturais, reordenando suas organelas e tornando suas bordas pregueadas ou lisas⁸.

Dada a cronologia definida da síntese do esmalte dentário^{1,9,10} e as características dos defeitos de desenvolvimento do esmalte (DDE), muitas vezes podem ser identificados possíveis fatores etiológicos e os estágios em que alguns distúrbios tenham ocorrido⁹⁻¹¹, visto que estes são registrados permanentemente na superfície da estrutura dental, por causa da natureza não remodeladora deste tipo de tecido¹².

Estudos em animais têm mostrado que, além dos fatores genéticos, traumáticos e hormonais^{1,9}, agentes medicamentosos e alguns poluentes podem afetar a amelogênese^{5,9,11,12}. Souza *et al.*¹³ mostraram que a amoxicilina interferiu no estágio de secreção da matriz proteica, causando alterações morfológicas nos ameloblastos e reduzindo a espessura da matriz de esmalte de ratos. Jedeon *et al.*¹⁴ observaram defeitos no esmalte de ratos a partir da exposição perinatal ao Bisfenol A.

O Bisfenol A (BPA) é um composto químico desregulador do sistema endócrino^{15,16}, utilizado como intermediário na produção de termoplásticos, como matéria-prima para vernizes, além de servir como antioxidante de óleos, plásticos e borracha¹⁷. Está presente na composição de embalagens plásticas como copos para bebês, mamadeiras e brinquedos de policarbonato, embalagem de produtos enlatados através do seu revestimento com resinas epóxi^{15,18}, inclusive em sistemas restauradores odontológicos¹⁹⁻²¹. No Brasil, o composto é proibido na composição de produtos para lactentes²², mas ainda é discutida sua utilização na produção de embalagem de alimentos.

Calafat et al.²³, avaliando uma amostra populacional com idade entre 6 e 60 anos, encontraram, em média, 2,6 µg/L de BPA na urina de 92,6% dos 2.517 participantes, sugerindo ampla e frequente exposição a este poluente. Com base neste estudo, Lakind e Naiman¹⁸ sugeriram que a exposição diária ao BPA varia, de acordo com a idade, entre 0,03 e 0,05 µg/kg de peso corporal. Em humanos, a exposição parental ao BPA e seus análogos estão associadas sobretudo ao parto prematuro²⁴ e ao baixo peso ao nascer²⁵. Já em animais, este composto está relacionado a distúrbios no desenvolvimento dos sistemas nervoso, reprodutor e respiratório²⁶. O BPA e sua forma ativa no organismo, aglicona-BPA, também foram encontrados em concentrações semelhantes, tanto no líquido amniótico de ratas, como no plasma sanguíneo de suas respectivas proles recém-nascidas, sugerindo a passagem placentária deste composto¹⁶.

Estudos em animais também mostram a associação entre desreguladores endócrinos como o BPA e a formação dos tecidos duros, tanto no aumentando da massa óssea²⁷ quanto provocando defeitos qualitativos no esmalte dentário, semelhantes à HMI em humanos^{14,28}.

O modelo animal proposto por Jedeon et al.²⁰ (2013) demonstra o efeito do BPA sobre o tecido dentário maduro, porém, suas limitações estão relacionadas à reprodutibilidade do método que ainda não foi testado por outros pesquisadores e pelo fato da administração do BPA não ter sido realizada exclusivamente durante o período de amamentação, ou seja, sem diferenciar as vias de transmissão vertical para o filhote. Tal informação é de fundamental importância para que se elucide o potencial de ação desse composto químico, determinando sua transmissão via placentária e/ou por transmissão via amamentação.

2 PROPOSIÇÃO

Avaliar o desenvolvimento e a microestrutura do esmalte dentário de ratos a partir da exposição ao BPA durante o período gestacional e de amamentação.

1. Mensurar a espessura da matriz de esmalte de germes de molares de ratos.
2. Avaliar o conteúdo de fósforo, cálcio e carbono na superfície do esmalte de incisivos de ratos.

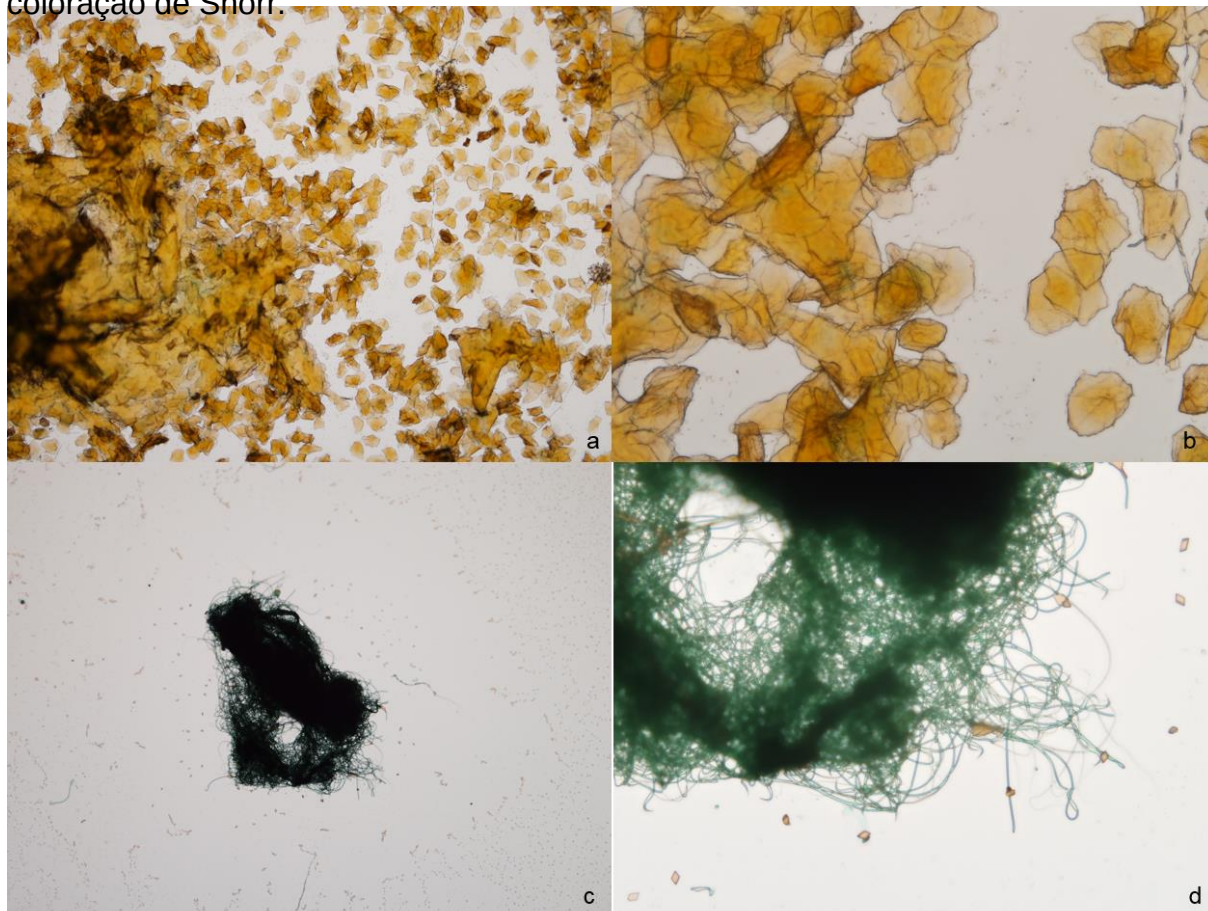
3 METODOLOGIA

3.1 Animais

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/UNESP, sob o registro nº 29/2018 (ANEXO A). Foram utilizadas 6 ratas fêmeas e 3 ratos machos (*Rattus norvegicus, albinus, Holtzman*), com 2-3 meses de idade, pesando aproximadamente 250 g. As ratas foram mantidas no biotério da FOAr com temperatura ($23\pm 10^{\circ}\text{C}$) e umidade relativa ($55\pm 5\%$) controladas, iluminação artificial por lâmpada fluorescente com foto períodos de claro e escuro, 12h cada, tendo ração e água *ad libitum*. Passado o período de adaptação de cinco dias no biotério, as ratas foram postas em acasalamento na proporção máxima de duas fêmeas para cada um macho (2:1).

O dia gestacional 1 foi determinado pela presença de espermatozoide no esfregaço vaginal à fresco e após coloração pelo método de Shorr (Figura 1), colhido 12 horas após os pares serem colocados em acasalamento, e analisado em microscopia de luz (Primo Star, Zeiss, Oberkochen, Alemanha)²⁹.

Figura 1 - Aspecto do esfregaço vaginal de ratas antes e após o acasalamento com coloração de Shorr.



a,b – Estro, indicativo do período fértil (magnificação 10x e 40x, respectivamente); **c,d** – Presença de espermatozoide, indicativo de prenhez (magnificação 10x e 40x, respectivamente).

Fonte: Imagens obtidas no Laboratório de Histologia – FOAr/UNESP

Determinada a prenhez (Figura 1c,d), as ratas foram identificadas aleatoriamente e divididas em três grupos para administração intragástrica (gavagem) de:

G1 – solução de BPA (Sigma-Aldrich, Minessota, EUA) dissolvido em óleo de milho com concentração de $\sim 1,75 \mu\text{gBPA/mL}$, aplicada diariamente durante toda a gestação (21 dias) e amamentação (21 dias), ajustada na dose de $5 \mu\text{gBPA/kg}^{14,28}$ de peso animal.

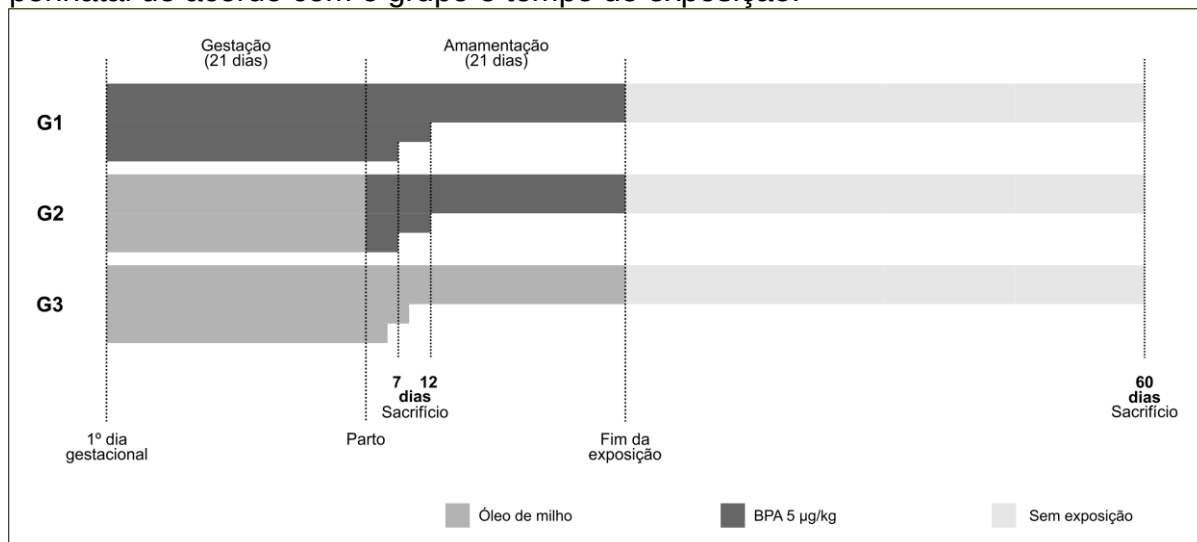
G2 – óleo de milho puro durante a gestação (21 dias) e solução de BPA equivalentes ao grupo G1, aplicada diariamente durante a amamentação (21 dias).

G3 – óleo de milho puro, aplicado diariamente durante toda a gestação (21 dias) e amamentação (21 dias), com volume correspondente ao grupo G1^{14,28}.

Os filhotes foram selecionados aleatoriamente e sofreram eutanásia após 7 (G1=5; G2=5; G3=4) e 12 (G1=7; G2=6; G3=4) dias do nascimento, período correspondente ao estágio de secreção da matriz proteica do 1º molar de ratos³⁰; e ao início do estágio de maturação da mesma matriz³¹, respectivamente (Figura 2). Após a eutanásia, os filhotes foram decapitados e as cabeças foram imediatamente imersas em solução de formaldeído a 4%.

Passados 60 dias de vida, 34 filhotes (G1=17; G2=11; G3=6) restantes também sofreram eutanásia para obtenção dos incisivos inferiores em estágio completo de irrupção e oclusão que foram imediatamente extraídos após a eutanásia.

Figura 2 - Esquemática do plano de administração de Bisfenol A no período perinatal de acordo com o grupo e tempo de exposição.



Fonte: Elaboração própria.

Cada rata, assim como seus filhotes, foram eutanasiados com sobredose de Cloridrato de Cetamina a 10% (Cetamin, Syntec do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil)

associado ao Cloridrato de Xilazina a 2% (Xilazin, Syntec do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil).

3.2 Processamento Histológico dos Germes Dentários

Após a eutanásia, as cabeças dos filhotes de 7 e 12 dias foram imersas em solução de formaldeído a 4%. Após 48 h de fixação, foram descalcificadas em solução de EDTA a 7% de 3 a 7 dias dependendo do estágio de desenvolvimento. Ambos o formaldeído e o EDTA foram tamponadas com PBS a 0,1M, com pH 7,2. Posteriormente, os espécimes foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, a partir da solução 70° GL até o etanol absoluto, diafanizados em xilol e finalmente embebidas em parafina para a obtenção de cortes frontais.

Foram obtidos 6 cortes por animal com ~5 µm de espessura, distando ~45 µm entre si, contendo a porção central dos germes dos primeiros molares superiores. Os cortes foram realizados paralelamente ao longo eixo dos molares em desenvolvimento com auxílio de um micrótomo (RM2125RTS, Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha) e então corados com hematoxilina de Carazzi e eosina (H&E).

3.3 Análise Morfométrica da Matriz de Esmalte

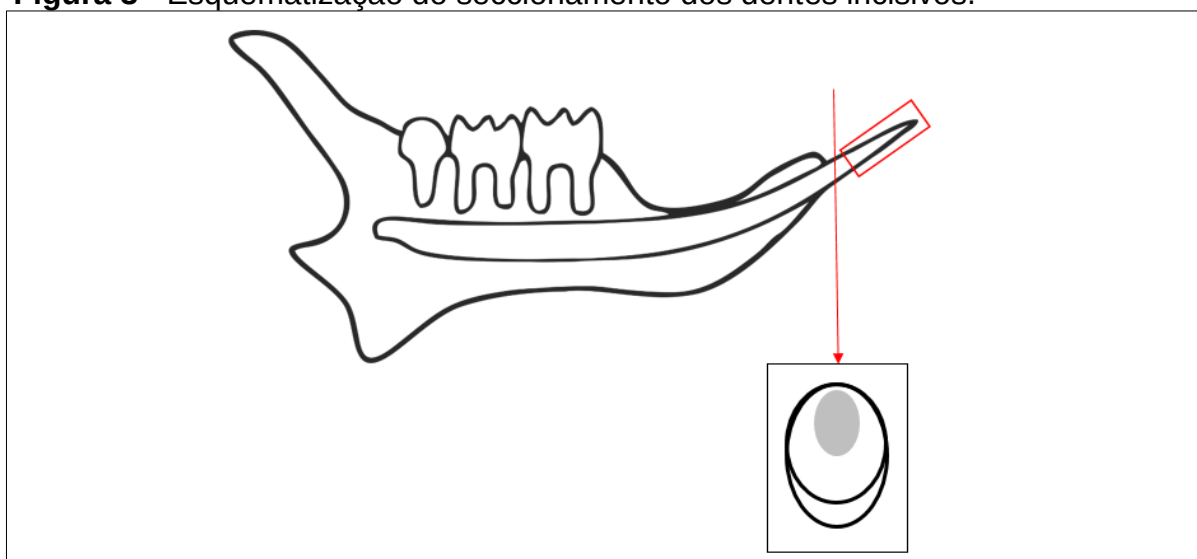
Com o intuito de avaliar se o BPA promoveu alguma alteração no estágio de secreção dos ameloblastos, foi mensurada a espessura da matriz de esmalte dos germes de primeiros molares superiores em desenvolvimento nos períodos de 7 e 12 dias de idade, com o auxílio de um microscópio de luz (BX51, Olympus, Tóquio, Japão), lente objetiva 40x e um sistema de análise de imagens (versão 3.2.1.276, DP Controller, Olympus, Tóquio, Japão) e capturadas com auxílio de uma câmera digital (DP-71, Olympus, Tóquio, Japão) acoplada ao microscópio. O parâmetro de

mensuração adotado foi a distância entre o limite amelo-dentinário e a porção distal da camada de ameloblastos. Corte foi analisado na porção da ponta da cúspide e na região lateral vestibular. Finalmente, após a mensuração dos 6 cortes de cada germe dentário, foi obtida a média aritmética para cada animal, distinguindo as duas regiões do germe dental analisado.

3.4 Preparo dos Dentes Incisivos

Após a eutanásia, os animais de 60 dias tiveram os tecidos moles cuidadosamente removidos e os incisivos foram seccionados no limite da margem óssea cervical (Figura 3) com auxílio de disco de carborundum acoplado a um motor de rotação (LB-100, Beltec, São Paulo, Brasil), sob irrigação constante.

Figura 3 - Esquemática do seccionamento dos dentes incisivos.



Fonte: Elaboração própria.

Os dentes seccionados foram imediatamente analisados com o auxílio de lupa estereoscópica (SZ2-ILST, Olympus, Tóquio, Japão) por dois pesquisadores com reconhecida experiência em defeitos de desenvolvimento do esmalte dentário para a confirmação do aparecimento de alterações clínicas na superfície.

3.5 Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura

Para avaliação microscópica da superfície do esmalte, os dentes dos animais de 60 dias foram lavados 2 vezes em cuba ultrassônica (Cristófoli, Paraná, Brasil), por 5 minutos cada, em água deionizada, sem aquecimento e então desidratados a 60° C por 5 minutos em estufa (MyLabor, São Paulo, Brasil). Posteriormente, foram montados em uma plataforma de alumínio e escaneados pelo microscópio eletrônico de varredura (TM3030, Hitachi, Tóquio, Japão), com filamento de cobre, num ambiente à vácuo, 15kV e magnificação 50x.

3.6 Análise de Espectroscopia de Raios X por Energia Dispersiva

A fim de quantificar elementos presentes na superfície do esmalte, as mesmas amostras também foram analisadas através da espectroscopia de raios X por energia dispersiva usando um sistema detector elementar (Quantax 70, Bruker, Massachusetts, EUA), acoplado ao microscópio eletrônico de varredura a 15 kV. Para cada amostra, pontos distintos distribuídos na superfície do esmalte foram analisados para medir a porcentagem do conteúdo de P, Ca e C.

3.7 Análise Estatística

Os dados quantitativos foram avaliados quanto a normalidade com o teste de Shapiro-Wilk e então comparados por ANOVA, com auxílio do *software* SPSS Statistics, versão 27 (IBM Corp., Nova Iorque, EUA). O pós-teste Games-Howell detectou as diferenças dos dados da morfometria, e o pós-teste de Tukey detectou as diferenças do conteúdo elementar superficial, de acordo com a homocedasticidade das médias. Ambas as análises consideraram $\alpha=0.05$.

4 RESULTADOS

O número total de filhotes e sua distribuição nos grupos experimentais estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Distribuição da frequência absoluta do número de filhotes de acordo com o grupo de exposição ao BPA e a idade de eutanásia.

Grupo	Idade (dias)			Total
	7	12	60	
G1	5	7	17	29
G2	5	6	11	22
G3	4	4	6	15
Total	14	17	34	65

G1 - solução de BPA (5 µgBPA/kg) durante a gestação + amamentação; **G2** - solução de BPA (5 µgBPA/kg) durante a amamentação; e **G3** - óleo de milho durante a gestação + amamentação (controle).

Fonte: Elaboração própria.

Os animais de 7 dias apresentaram características histológicas semelhantes, com exceção da espessura da matriz de esmalte na região das cúspides. Estes animais apresentaram camada de dentina e esmalte circundando quase completamente a coroa de forma irregular (Figura 4).

Figura 4 - Germe dentário de molares superiores de ratos de 7 dias de idade corados em H&E.



G1 - Exposto ao BPA durante a gestação + amamentação; **G2** - Exposto ao BPA durante a amamentação; e **G3** - Exposto a óleo de milho durante a gestação + amamentação. **Fd** - Folículo dentária; **Ac** - Alça cervical; **To** - Trabeculado ósseo; **Pd** - Papila dentária; **Od** - Camada de odontoblastos; **D** - Dentina; **Me** - Matriz de esmalte; **A** - Camada de ameloblastos; **OE** - Órgão epitelial do esmalte.

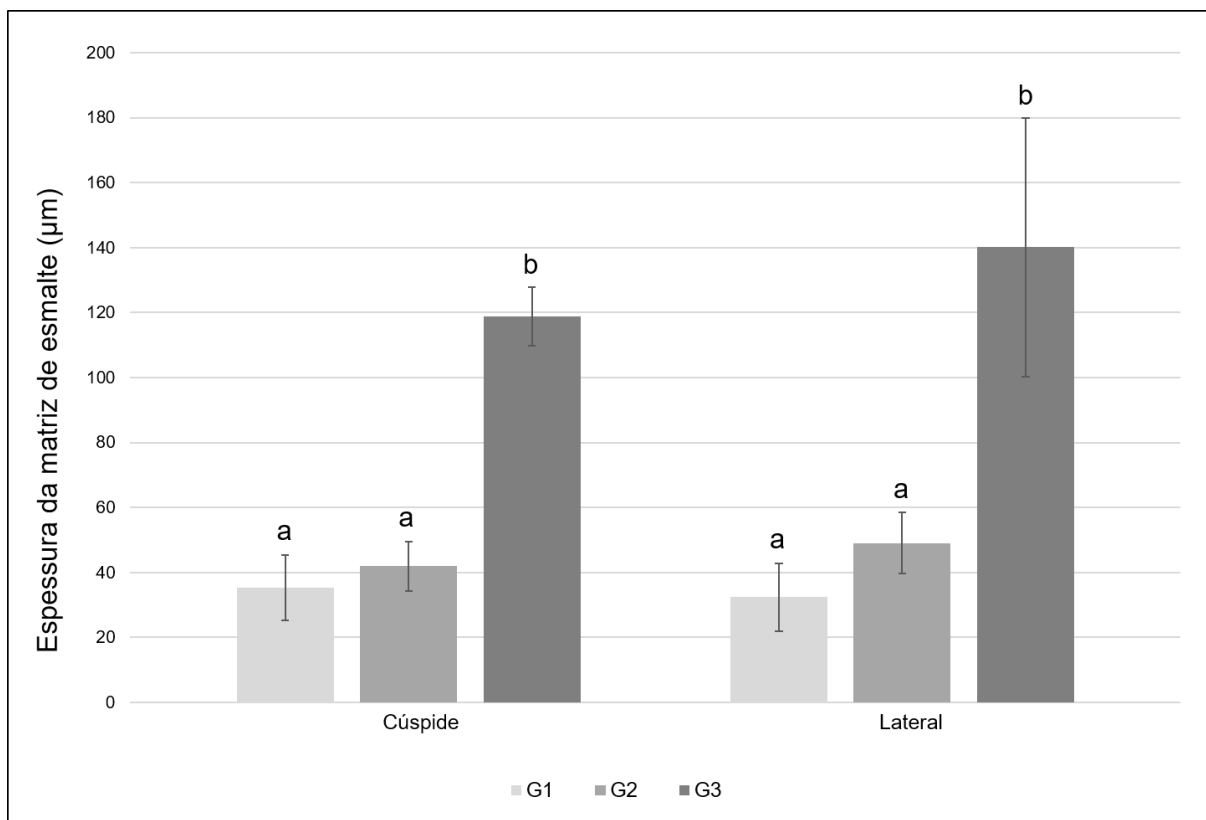
Fonte: Imagens obtidas no Laboratório de Histologia – FOAr/UNESP.

As células ameloblásticas mostraram-se dispostas adjacentes à matriz de esmalte, em camada única, com núcleos posicionados na região proximal do

citoplasma. A papila dentária delimitava-se parcialmente pela alça cervical e em sua periferia estavam posicionados os odontoblastos, numa camada subsequente à pré-dentina (Figura 4).

Com relação à espessura da matriz de esmalte, o Gráfico 1 mostra que os grupos G1 e G2 (expostos ao BPA) apresentaram matriz de esmalte com espessuras semelhantes e ambas mais delgadas que o grupo G3 (controle) em todas as regiões avaliadas ($p=0.036$).

Gráfico 1 - Espessura (μm) da matriz de esmalte do germe dentário de molares superiores de ratos de 7 dias de idade de acordo com o local de aferição.



G1 - solução de BPA (5 $\mu\text{gBPA/kg}$) durante a gestação + amamentação; **G2** – solução de BPA (5 $\mu\text{gBPA/kg}$) durante a amamentação; e **G3** – óleo de milho durante a gestação + amamentação (controle).

* Letras iguais significam igualdade, ANOVA e pós-teste Games-Howell ($\alpha=0.05$).

** Intervalos correspondentes ao desvio-padrão.

Fonte: Elaboração própria.

Quanto aos animais de 12 dias, notadamente a camada da matriz de esmalte apresentou-se mais espessa que nos animais de 7 dias devido ao estágio de desenvolvimento do germe mais avançado. Neste período, é possível notar o início da degradação da matriz de esmalte na pontas das cúspides, bem como o início da formação da dentina radicular, a partir da região cervical. Os ameloblastos mostraram-se encurtados, delimitando o espaço da matriz de esmalte (Figura 5).

Figura 5 - Germe dentário de molares superiores de ratos de 12 dias de idade corados em H&E.

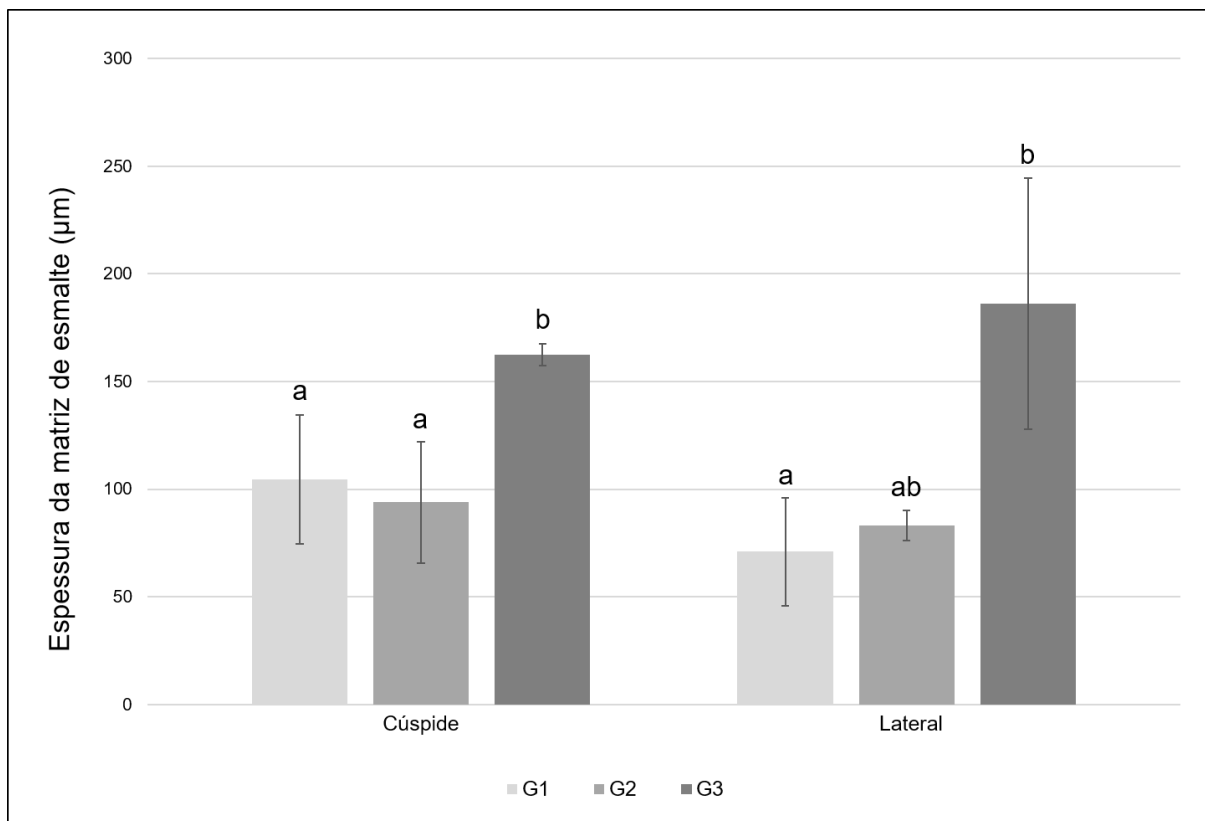


G1 – Exposto ao BPA durante a gestação + amamentação; **G2** - Exposto ao BPA durante a amamentação; e **G3** - Exposto a óleo de milho durante a gestação + amamentação. **Fd** – Folículo dentária; **DR** – Terço cervical da raiz; **To** – Trabeculado ósseo; **Pd** – Papila dentária; **Od** – Camada de odontoblastos; **D** – Dentina; **Me** – Matriz de esmalte; **A** – Camada de ameloblastos; **OE** – Órgão epitelial do esmalte. **Região de degradação da matriz de esmalte.

Fonte: Imagens obtidas no Laboratório de Histologia – FOAr/UNESP.

O Gráfico 2 mostra que os grupos G1 e G2 (expostos ao BPA) apresentaram espessuras semelhantes e ambas mais delgadas que o grupo G3 (controle) na área da cúspide ($p < 0.004$). Na região lateral vestibular, foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos G1 (expostos ao BPA durante a gestação e amamentação) e G3 (controle). Contudo, esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p = 0.076$) entre os grupos G2 (expostos ao BPA pela amamentação) e o G3 (controle).

Gráfico 2 - Espessura (μm) da matriz de esmalte do germe dentário de molares superiores de ratos de 12 dias de idade de acordo com o local de aferição.



G1 - solução de BPA (5 $\mu\text{gBPA/kg}$) durante a gestação + amamentação; **G2** – solução de BPA (5 $\mu\text{gBPA/kg}$) durante a amamentação; e **G3** – óleo de milho durante a gestação + amamentação (controle).

* Letras iguais significam igualdade, ANOVA e pós-teste Games-Howell ($\alpha=0.05$).

** Intervalos correspondentes ao desvio-padrão.

Fonte: Elaboração própria.

Aos 60 dias, os incisivos dos animais expostos ao BPA (G1 e G2) apresentaram manchas de aspecto branco-amareladas e assimétricas, clinicamente semelhantes a HMI, na maioria dos animais. Os incisivos do grupo controle (G3) não apresentaram alterações à normalidade, mantendo a coloração alaranjada uniforme (Figura 5).

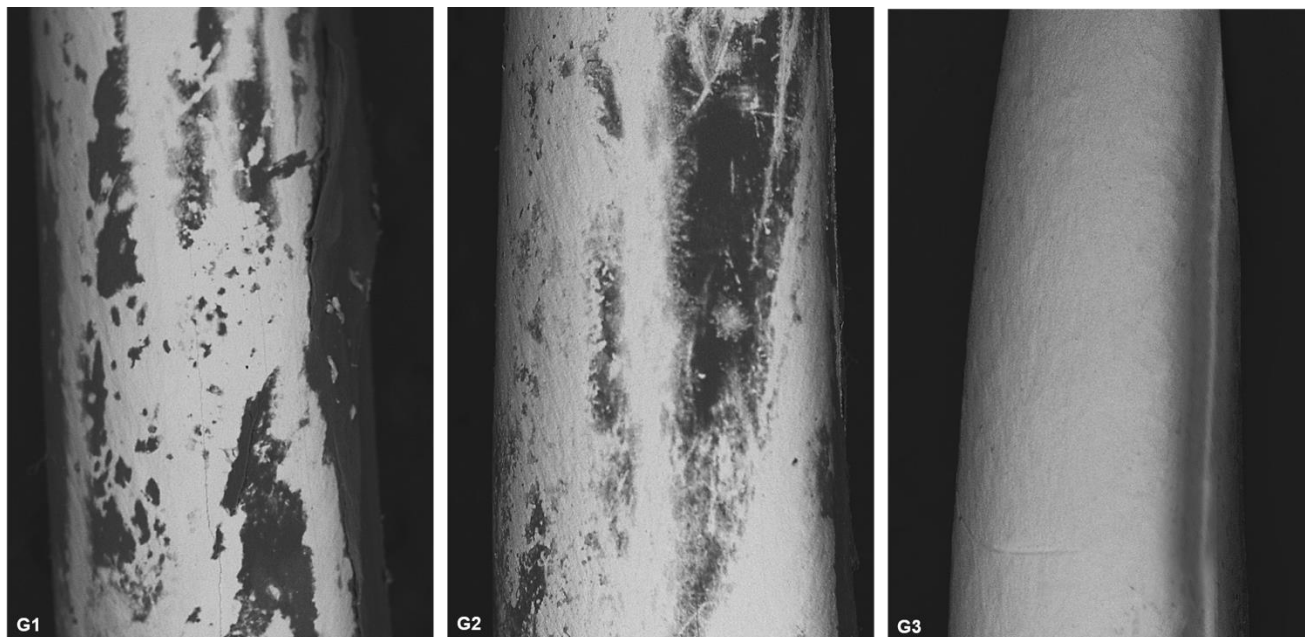
Figura 6 - Aspecto do esmalte dentário de ratos de 60 dias de acordo com o grupo de exposição.



G1 – Exposto ao BPA durante a gestação + amamentação; **G2** - Exposto ao BPA durante a amamentação; e **G3** - Exposto a óleo de milho durante a gestação + amamentação.
Fonte: Imagens obtidas no Biotério – FOAr/UNESP.

Nas imagens obtidas em microscopia eletrônica varredura, os dentes incisivos dos animais de 60 dias expostos ao BPA (G1 e G2) exibiram áreas escuras, dispostas irregularmente na superfície vestibular, sugestivas de defeitos de desenvolvimento do esmalte. No grupo controle (G3) a superfície do esmalte apresentou aspecto branco e uniforme, conforme a normalidade (Figura 7).

Figura 7 - Aspecto dos dentes incisivos de ratos de 60 dias de acordo com o grupo de exposição por microscopia eletrônica de varredura, magnificação 50x.

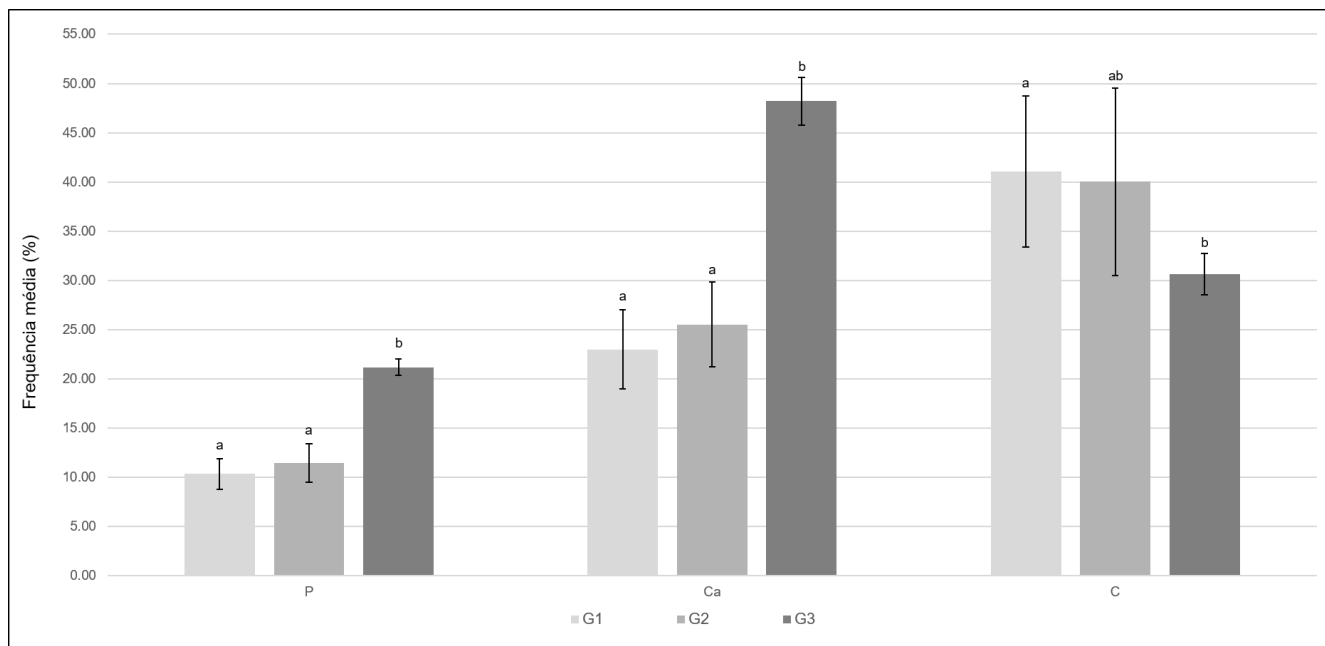


G1 – Exposto ao BPA durante a gestação + amamentação; **G2** - Exposto ao BPA durante a amamentação; e **G3** - Exposto a óleo de milho durante a gestação + amamentação.

Fonte: Imagens obtidas no Laboratório de Materiais Dentários – UFMA.

Na análise quantitativa do conteúdo superficial de fósforo, cálcio e carbono nos dentes incisivos (Gráfico 3), foi possível observar que os grupos G1 e G2 (expostos ao BPA) não diferiram entre si quanto aos elementos avaliados, sendo ambos menores que o grupo G3 (controle) para os elementos fósforo e cálcio ($p < 0.001$). A frequência média de carbono não diferiu estatisticamente entre os grupos G2 (exposto ao BPA pela amamentação) e o grupo G3 (controle).

Gráfico 3 - Frequência média do conteúdo de fósforo, cálcio e carbono na superfície do esmalte de dentes de ratos de 60 dias.



P - fósforo; **Ca** - cálcio; **C** - carbono; **G1** – Exposto ao BPA durante a gestação + amamentação; **G2** - Exposto ao BPA durante a amamentação; e **G3** - Exposto a óleo de milho durante a gestação + amamentação.

* Letras iguais significam igualdade, ANOVA e pós-teste Tukey ($\alpha=0.05$).

** Intervalos correspondentes ao desvio-padrão.

Fonte: Elaboração própria.

5 DISCUSSÃO

Este trabalho *in vivo* mostra alterações significativas causadas por Bisfenol A no desenvolvimento do esmalte dentário de ratos em três momentos distintos da sua formação, a saber: estágio de secreção (7 dias), início do estágio de maturação (12 dias) e o estágio de maturação completa (60 dias). Além disso, de acordo com a literatura consultada, este é o primeiro estudo que apresenta o leite materno como veículo de BPA capaz de produzir defeitos no esmalte.

As alterações na formação do esmalte dentário são comuns em humanos e algumas, como o HMI, ainda não apresentam uma relação de causalidade bem estabelecida³²⁻³⁴. Assim, o desenvolvimento de modelos experimentais animais para a indução de defeitos de desenvolvimento do esmalte é necessário para auxiliar na compreensão dos processos relacionados à essas alterações. O protocolo adotado neste estudo para reproduzir o defeito do esmalte dentário de ratos a partir do BPA foi baseado no trabalho de Jedeon et al.¹⁴ e é precedido por outros estudos *in vivo* do nosso grupo de pesquisa^{13,35}. Os procedimentos executados seguiram rígidos protocolos metodológicos, considerando os aspectos sanitários e humanísticos, afim de praticar ao máximo os princípios éticos para o uso dos animais em pesquisa^{36,37}.

A amelogênese é um processo complexo e extremamente sensível, uma vez que pode ser influenciada por diversos fatores, como por exemplo a deficiência de cálcio e vitamina D, febre alta, hipóxia, exposição a antibióticos e a poluentes ambientais^{1,9,12,38}. Os desreguladores endócrinos, como o Bisfenol A, apresentam potencial de interferência na amelogênese e por esta razão vêm sendo estudados^{14,28}. O consumo de BPA e seus análogos entre mulheres grávidas é amplo e frequente, assim como para a população em geral, variando proporcionalmente ao consumo de

alimentos em recipientes plásticos ou enlatados^{18,23,39,40}. Considerando que a ingestão diária de BPA por via oral é expelida totalmente pela urina em até 24 horas⁴¹, um estudo realizado por Liu et al.³⁹ mostrou que a exposição média ao BPA livre diariamente durante o segundo trimestre de gravidez no Canadá é de 32 ng/kg, não diferindo das estimativas para mulheres canadenses de 19 a 30 anos (42 ng/kg/dia)⁴².

O BPA é normalmente eliminado na bile através de um transportador canalicular de ânions orgânicos (mrp2) que o libera conjugado a um derivado do ácido glicurônico (BPA-GA), sendo esta ligação possível pela ação da 5'-difosfoglucuronosiltransferase (UGT2B1) que tem a função de inativar e posteriormente eliminar xenobióticos potencialmente tóxicos do corpo⁴³. Em ratas prenhas, a expressão hepática do mrp2 é diminuída⁴⁴ e o BPA-GA deixa de ser depositado na bile e passa a ser eliminado diretamente na circulação sistêmica, atravessando a barreira placentária e posteriormente desfazendo a conjugação, o que libera o BPA para agir sobre os órgãos do feto⁴³.

A exposição ao BPA por meio da amamentação também é possível entre humanos⁴⁵, como mostra Dualde et al.⁴⁶ num estudo com 120 lactantes espanholas, as quais apresentaram em média 0,29 ngBPA/ml de leite materno, já a ingestão diária dos respectivos bebês atingiu 0,04 µgBPA/kg. Nossos resultados sugerem que o BPA transmitido através do leite materno pode ser capaz de causar DDEs, já que os animais que foram expostos ao BPA apenas pelo leite (G2) apresentaram resultados semelhantes aos animais que receberam BPA desde a gestação (G1), em todos os estágios observados.

Mesmo que a formação do incisivo inferior de ratos seja contínua, a interferência do BPA na síntese de andrógeno, e consequentemente sobre a amelogênese, é observada apenas nos primeiros dias de vida¹⁴. Isto porque a proteína UGT2B1, que realiza a inativação e eliminação do BPA na forma de BPA-GA, não é observada em filhotes antes dos 21 dias de vida⁴⁷, período que coincide com o final da amamentação.

Nossos resultados mostram que nos estágios iniciais (7 e 12 dias), a exposição ao BPA causou redução na matriz de esmalte. Souza et al.¹³ observaram efeito semelhante aos nossos em animais com 7 dias de vida, a partir da administração de amoxicilina (100 e 500 mg/kg/dia) em ratas prenhas e a seus filhotes. Neste estudo, observamos ainda manchas com aspecto branco-amarelado, dispostas irregularmente ao longo da face vestibular nos dentes incisivos dos animais de 60 dias. Quando analisados quanto ao conteúdo elementar superficial destes dentes, foram observadas regiões hipomineralizadas, sugestivas de defeitos do esmalte. Souza et al.³⁵, apesar de não observarem diferença estatística na concentração de cálcio e fósforo, a partir da administração de amoxicilina em ratos, notaram que a maior dose do antibiótico afetava consideravelmente o esmalte de alguns animais, sinalizando que agentes extrínsecos podem afetar o esmalte completamente formado. Os nossos achados corroboram com Jedeon et al.¹⁴, que encontraram deficiência no conteúdo de cálcio e fósforo, além do aumento do conteúdo orgânico refletidos em manchas clinicamente visíveis em dentes de ratos Wistar Han aos 30 dias de vida, semelhantes a HMI em humanos, a partir da exposição de ratas prenhas ao BPA durante a gestação e amamentação.

As manchas e a deficiência elementar de cálcio e fósforo, observadas nos dentes completamente formados podem ter sido causadas pela redução da matriz de esmalte observada nos estágios iniciais da amelogênese¹³, ou podem ter ocorrido em paralelo, como fator adicional decorrente da exposição perinatal ao BPA¹⁴. Isto porque uma vez em contato com o organismo, seja por via placenta, seja pela amamentação, o BPA inibe a síntese do hormônio sexual andrógeno⁴⁸. Jeedon et al.⁴⁹ mostra a presença de receptores de andrógeno preferencialmente em ameloblastos maduros, sugerindo seu envolvimento no estágio final de mineralização do desenvolvimento do esmalte⁴⁹. Por outro lado, a literatura evidencia que alterações nos estágios iniciais de formação da matriz de esmalte podem afetar a sua composição e causar lesões visíveis clinicamente^{50,51}.

A avaliação de alteração na amelogênese não levando em consideração a distinção entre os grupos dos filhotes machos e fêmeas é uma limitação deste estudo, visto que a ação de desreguladores endócrinos sobre a amelogênese parece estar relacionadas aos receptores de hormônios ligados ao sexo^{49,52}. Ademais, ainda é limitado extrapolar a ligação etiológica do BPA à alterações dentárias em humanos, a partir de DDEs observadas em modelo animal. Assim, estudos que observem o consumo de BPA por mulheres no período da gestação e lactação, e posteriormente o aparecimento de DDEs em seus filhos podem endossar esta hipótese. O momento adverso atual também limitou o desenvolvimento deste estudo, contudo, o material sanguíneo e os anticorpos para análises de imunoexpressão estão acondicionados para que no momento oportuno, os dados possam ser analisados e discutidos com mais embasamento e plenitude.

6 CONCLUSÃO

Os animais expostos ao BPA no período gestacional e/ou na amamentação sofreram redução da espessura da matriz de esmalte dos germes dos dentes molares e apresentaram alterações no conteúdo de cálcio, fósforo e carbono na superfície do esmalte dos dentes incisivos.

REFERÊNCIAS

1. Yamaguti PM, Arana-Chavez VE, Acevedo AC. Changes in amelogenesis in the rat incisor following short-term hypocalcaemia. *Arch Oral Biol.* 2005;50(2 Spec iss.):185–8.
2. Thesleff I, Keranen S, Jernvall J. Linking tooth morphogenesis and odontoblast differentiation. *Adv Dent Res.* 2001;15(1):14–8.
3. Hu JCC, Chun Y-HP, Al Hazzazzi T, Simmer JP. Enamel formation and Amelogenesis Imperfecta. *Cells Tissues Organs.* 2007;186(1):78–85.
4. Gibson CW. The amelogenin proteins and enamel development in humans and mice. *J Oral Biosci.* 2011;53(3):248–56.
5. Massa LF, Bradaschia-Correa V, Arana-Chavez VE. Immunocytochemical study of amelogenin deposition during the early odontogenesis of molars in alendronate-treated newborn rats. *J Histochem Cytochem.* 2006;54(6):713–25.
6. Fincham AG, Moradian-Oldak J, Simmer JP. The structural biology of the developing dental enamel matrix. *J Struct Biol.* 1999;126(3):270–99.
7. Lu Y, Papagerakis P, Yamakoshi Y, Hu JCC, Bartlett JD, Simmer JP. Functions of KLK4 and MMP-20 in dental enamel formation. *Biol Chem.* 2008;389(6):695–700.
8. Simmer JP, Hu JCC. Expression, structure, and function of enamel proteinases. *Connect Tissue Res.* 2002;43(2–3):441–9.
9. Alaluusua S. Aetiology of molar-incisor hypomineralisation: a systematic review. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2010;11(2):53–8.
10. Reid DJ, Dean MC. Brief communication: the timing of linear hypoplasias on human anterior teeth. *Am J Phys Anthropol.* 2000;113(1):135–9.
11. Teixeira RJPB, Andrade NS, Queiroz LCC, Mendes FM, Moura MS, Moura L de FA de D, et al. Exploring the association between genetic and environmental factors and Molar Incisor Hypomineralization: evidence from a twin study. *Int J Paediatr Dent.* 2018;28(2):198–206.

12. Seow WK. Clinical diagnosis of enamel defects: Pitfalls and practical guidelines. *Int Dent J*. 1997;47(3):173–82.
13. de Souza JF, Gramasco M, Jeremias F, Santos-Pinto L, Giovanini AF, Cerri PS, et al. Amoxicillin diminishes the thickness of the enamel matrix that is deposited during the secretory stage in rats. *Int J Paediatr Dent*. 2016;26(3):199–210.
14. Jedeon K, Dure-Molla MD Ia, Brookes SJ, Liodice S, Marciano C, Kirkham J, et al. Enamel defects reflect perinatal exposure to bisphenol A. *Am J Pathol*. 2012;183(1):108–18.
15. vom Saal FS, Nagel SC, Coe BL, Angle BM, Taylor JA. The estrogenic endocrine disrupting chemical bisphenol A (BPA) and obesity. *Mol Cell Endocrinol*. 2012;354(1–2):74–84.
16. Doerge DR, Twaddle NC, Vanlandingham M, Brown RP, Fisher JW. Distribution of bisphenol A into tissues of adult, neonatal, and fetal Sprague-Dawley rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2011;255(3):261–70.
17. Fiege H, Voges H-W, Hamamoto T, Umemura S, Iwata T, Miki H, et al. Phenol Derivates. Weinheim: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry; 2012. 26v.
18. Lakind JS, Naiman DQ. Daily intake of bisphenol A and potential sources of exposure: 2005-2006 National Health and Nutrition Examination Survey. *J Expo Sci Environ Epidemiol*. 2011;21(3):272–9.
19. Sasaki N, Okuda K, Kato T, Kakishima H, Okuma H, Abe K, et al. Salivary bisphenol-A levels detected by ELISA after restoration with composite resin. *J Mater Sci Mater Med*. 2005;16(4):297–300.
20. Lee J-H, Yi S-K, Kim S-Y, Kim J-S, Son S-A, Jeong S-H, et al. Salivary bisphenol A levels and their association with composite resin restoration. *Chemosphere*. 2017;172:46–51.
21. Zimmerman-Downs JM, Shuman D, Stull SC, Ratzlaff RE. Bisphenol A blood and saliva levels prior to and after dental sealant placement in adults. *J Dent Hyg*. 2010;84(3):145–50.

22. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada - RDC no 41 de 16 de setembro de 2011. Dispõe sobre a proibição de uso de bisfenol A em mamadeiras destinadas a alimentação de lactentes e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília (2011 set 16).
23. Calafat AM, Ye X, Wong LY, Reidy JA, Needham LL. Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-2004. *Environ Health Perspect.* 2008;116(1):39–44.
24. Mustieles V, Williams PL, Fernandez M, Mnguez-Alarcn L, Ford JB, Calafat AM, et al. Maternal and paternal preconception exposure to bisphenols and size at birth. *Hum Reprod.* 2018;33(8):1528–37.
25. Huang S, Li J, Xu S, Zhao H, Li Y, Zhou Y, et al. Bisphenol A and bisphenol S exposures during pregnancy and gestational age – a longitudinal study in China. *Chemosphere.* 2019;237:124426.
26. Richter CA, Birnbaum LS, Farabollini F, Newbold RR, Rubin BS, Talsness CE, et al. In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reprod Toxicol.* 2007;24(2):199–224.
27. Wang Y, Pan Z, Chen F. Inhibition of PPAR γ by bisphenol A diglycidyl ether ameliorates dexamethasone-induced osteoporosis in a mouse model. *J Int Med Res.* 2019;47(12):6268–77.
28. Jedeon K, Marciano C, Loiodice S, Boudalia S, Canivenc Lavier MC, Berdal A, et al. Enamel hypomineralization due to endocrine disruptors. *Connect Tissue Res.* 2014;55(Suppl. 1):43–7.
29. Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian J Biol.* 2002:609–14.
30. Mostafa H, Shehata F, Omar S, Kawana K. The effect of amoxicillin on the secretory stage of amelogenesis in rats. *Alexandria Dent J.* 2020;45(1):34–8.
31. Schours I, Massler M. The teeth. In: Farris E, Griffith J. *The rat in laboratory investigation.* Nova Iorque: Hafner; 1963. p. 104–60.

32. Zhao D, Dong B, Yu D, Ren Q, Sun Y. The prevalence of Molar Incisor Hypomineralization: evidence from 70 studies. *Int J Paediatr Dent*. 2018;28(2):170–9.
33. Elhennawy K, Manton DJ, Crombie F, Zaslansky P, Radlanski RJ, Jost-Brinkmann PG, et al. Structural, mechanical and chemical evaluation of molar-incisor hypomineralization-affected enamel: a systematic review. *Arch Oral Biol*. 2017;83:272–81.
34. Jälevik B. Prevalence and diagnosis of molar-incisor-hypomineralisation (MIH): a systematic review. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2010;11(2):59–64.
35. Souza JF, Jeremias F, Alaluusua S, Sahlberg C, Santos-Pinto L, Jernvall J, et al. The effect of amoxicillin on dental enamel development in vivo. *Braz Oral Res*. 2020;34:1–9.
36. Miziara ID, Magalhães AT de M, Santos M d'Aparecida, Gomes ÉF, Oliveira RA de. Research ethics in animal models. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2012; 78(2): 128–31.
37. Guimarães MV, Freire JE da C, Menezes LMB de. Use of animals in research: a brief review of legislation in Brazil. *Rev Bioetica*. 2016;24(2):217–24.
38. Silva MJ, Scurrah KJ, Craig JM, Manton DJ, Kilpatrick N. Etiology of molar incisor hypomineralization - a systematic review. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2016;44(4):342–53.
39. Liu J, Wattar N, Field CJ, Dinu I, Dewey D. Exposure and dietary sources of bisphenol A (BPA) and BPA-alternatives among mothers in the APrON cohort study. *Environ Int*. 2018;119:319–26.
40. Hartle JC, Navas-acien A, Lawrence RS. The consumption of canned food and beverages and urinary bisphenol A concentrations in NHANES 2003 – 2008. *Environ Res*. 2016;150:375–82.
41. Thayer KA, Doerge DR, Hunt D, Schurman SH, Twaddle NC, Churchwell MI, et al. Pharmacokinetics of bisphenol A in humans following a single oral administration. *Environ Int*. 2015;83:107–15.

42. Bureau of Chemical Safety, Food Directorate, Health Products and Food Branch. Health Canada's updated assessment of bisphenol A (BPA) exposure from food sources. Ottawa: Health Canada; 2012.
43. Nishikawa M, Iwano H, Yanagisawa R, Koike N, Inoue H, Yokota H. Placental transfer of conjugated bisphenol A and subsequent reactivation in the rat fetus. *Environ Health Perspect.* 2010;118(9):1196–203.
44. Cao J, Stieger B, Meier PJ, Vore M. Expression of rat hepatic multidrug resistance-associated proteins and organic anion transporters in pregnancy. *Am J Physiol Liver Physiol.* 2002;283(3):G757–66.
45. Niu Y, Wang B, Zhao Y, Zhang J, Shao B. Highly sensitive and high-throughput method for the analysis of bisphenol analogues and their halogenated derivatives in breast milk. *J Agric Food Chem.* 2017;65(48):10452–63.
46. Dualde P, Pardo O, Corpas-burgos F, Kuligowski J, Gormaz M, Vento M, et al. Science of the total environment biomonitoring of bisphenols A , F , S in human milk and probabilistic risk assessment for breastfed infants. *Sci Total Environ.* 2019;668:797–805.
47. Matsumoto J, Yokota H, Yuasa A. Developmental increases in rat hepatic microsomal UDP-glucuronosyltransferase activities toward xenoestrogens and decreases during pregnancy. *Environ Health Perspect.* 2002;110(2):193–6.
48. Akingbemi BT, Sottas CM, Koulova AI, Klinefelter GR, Hardy MP. Inhibition of testicular steroidogenesis by the xenoestrogen bisphenol a is associated with reduced pituitary luteinizing hormone secretion and decreased steroidogenic enzyme gene expression in rat leydig cells. *Endocrinology.* 2004;145(2):592–603.
49. Jedeon K, Loiodice S, Salhi K, Le Normand M, Houari S, Chaloyard J, et al. Androgen receptor involvement in rat amelogenesis: an additional way for endocrine-disrupting chemicals to affect enamel synthesis. *Endocrinology.* 2016;157(11):4287–96.
50. Westergaard J. Structural changes induced by tetracycline in secretory ameloblasts in young rats. *Eur J Oral Sci.* 2007;88(6):481–95

51. Fuangtharnthip P, Yamada Y, Takagi Y, Ohya K. Autoradiographic investigation of the effect of 1-hydroxyethylidene-1, 1-bisphosphonate on matrix protein synthesis and secretion by secretory ameloblasts in rat incisors. *Arch Oral Biol.* 2000;45(6):495–506.
52. Jedeon K, Loiodice S, Marciano C, Vinel A, Lavier MCC, Berdal A, et al. Estrogen and bisphenol a affect male rat enamel formation and promote ameloblast proliferation. *Endocrinology.* 2014;155(9):3365–75.

ANEXO A – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara

FACULDADE DE ODONTOLOGIA



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada ***"EFETIVIDADE DE TRATAMENTOS PREVENTIVOS EM DENTES AFETADOS POR HMI A PARTIR DE UM MODELO ANIMAL EXPERIMENTAL"***, registrada com o nº 29/2018, sob a responsabilidade do(a) **Prof(a). Dr(a). Rita de Cássia Loiola Cordeiro** – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA** em reunião de 14/12/2018.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Dezembro/2019
Espécie/linhagem/raça	Rato – Holtzmann
Nº de animais	105
Peso/Idade	90-110g – 08 semanas
Sexo	Macho (09) / Fêmea (24)/Filhotes (72)
Origem	Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Prof. Dra. CARINA APARECIDA FABRÍCIO DE ANDRADE
Coordenadora da CEUA

Não autorizo a publicação deste trabalho pelo prazo de 2 anos após a data da defesa.

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 06 de novembro de 2020.

Silas Alves Costa