

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 06/11/2022.



**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 Giroto 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.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rita de Cássia Loiola Cordeiro (FOAr/UNESP)

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

3º Examinadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> 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.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Patrícia Garcia**.

À minha caríssima orientadora **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> 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 Bussaneli**, 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.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> 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.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lourdes dos Santos-Pinto**, **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Angela Zuanon**, **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Josimeri Costa**, **Prof. Dr. Fábio Lima**, **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fernanda Brighenti** pela dedicação que dispensaram em minha formação e, especialmente, à estimada **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> 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.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> 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.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> 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 amelogênese 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

<b>Figura 1</b> - Aspecto do esfregaço vaginal de ratas antes e após o acasalamento com coloração de Shorr. ....	22
<b>Figura 2</b> - Esquematização do plano de administração de Bisfenol A no período perinatal de acordo com o grupo e tempo de exposição. ....	23
<b>Figura 3</b> - Esquematização do seccionamento dos dentes incisivos. ....	25
<b>Figura 4</b> - Germe dentário de molares superiores de ratos de 7 dias de idade corados em H&E. ....	27
<b>Figura 5</b> - Germe dentário de molares superiores de ratos de 12 dias de idade corados em H&E. ....	29
<b>Figura 6</b> - Aspecto do esmalte dentário de ratos de 60 dias de acordo com o grupo de exposição. ....	31
<b>Figura 7</b> - 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 ( $\mu\text{m}$ ) 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 ( $\mu\text{m}$ ) 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

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

## 1 INTRODUÇÃO

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

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 Tomes<sup>4</sup>. 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 enamulina que são produzidas em menor quantidade e estão envolvidas na formação dos cristais de hidroxiapatita<sup>1,4,6</sup>.

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<sup>4,7</sup>. Neste momento, os ameloblastos sofrem alterações estruturais, reordenando suas organelas e tornando suas bordas pregueadas ou lisas<sup>8</sup>.

Dada a cronologia definida da síntese do esmalte dentário<sup>1,9,10</sup> 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 ocorrido<sup>9-11</sup>, visto que estes são registrados permanentemente na superfície da estrutura dental, por causa da natureza não remodeladora deste tipo de tecido<sup>12</sup>.

Estudos em animais têm mostrado que, além dos fatores genéticos, traumáticos e hormonais<sup>1,9</sup>, agentes medicamentosos e alguns poluentes podem afetar a amelogênese<sup>5,9,11,12</sup>. Souza *et al.*<sup>13</sup> 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.*<sup>14</sup> 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<sup>15,16</sup>, utilizado como intermediário na produção de termoplásticos, como matéria-prima para vernizes, além de servir como antioxidante de óleos, plásticos e borracha<sup>17</sup>. 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<sup>15,18</sup>, inclusive em sistemas restauradores odontológicos<sup>19-21</sup>. No Brasil, o composto é proibido na composição de produtos para lactentes<sup>22</sup>, mas ainda é discutida sua utilização na produção de embalagem de alimentos.

Calafat et al.<sup>23</sup>, 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 Naiman<sup>18</sup> 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 prematuro<sup>24</sup> e ao baixo peso ao nascer<sup>25</sup>. Já em animais, este composto está relacionado a distúrbios no desenvolvimento dos sistemas nervoso, reprodutor e respiratório<sup>26</sup>. 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 composto<sup>16</sup>.

Estudos em animais também mostram a associação entre desreguladores endócrinos como o BPA e a formação dos tecidos duros, tanto no aumentando da massa óssea<sup>27</sup> quanto provocando defeitos qualitativos no esmalte dentário, semelhantes à HMI em humanos<sup>14,28</sup>.

O modelo animal proposto por Jedeon et al.<sup>20</sup> (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.

## **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 $\gamma$  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.