

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

ESCOLA DE VETERINÁRIA

Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

**EFEITOS DO HIPERTIREOIDISMO MATERNO NA
HISTOMORFOMETRIA DENTÁRIA E PERIODONTAL DA PROLE NOS
PERÍODOS PRÉ- E PÓS-NATAL EM MODELO MURINO**

Douglas Marinho Abreu

Belo Horizonte

2022

Douglas Marinho Abreu

**EFEITOS DO HIPERTIREOIDISMO MATERNO NA
HISTOMORFOMETRIA DENTÁRIA E PERIODONTAL DA PROLE NOS
PERÍODOS PRÉ- E PÓS-NATAL EM MODELO MURINO**

Dissertação apresentada à UFMG, Escola de
Veterinária, como requisito parcial para
obtenção de título de Mestre

Curso: Mestrado em Ciência Animal
Área de Concentração: Patologia Animal
Orientadora: Prof^a. Dra. Natália de Melo Ocarino
Coorientadora: Prof^a. Dra. Rogéria Serakides
Coorientador: Dr. Juneo F. Silva

Belo Horizonte

2022

A162e

Abreu, Douglas Marinho, 1994-
Efeitos do Hipertireoidismo materno na histomorfometria dentária e periodontal da prole nos períodos pré – e pós natal em modelo murino / Douglas Marinho Abreu . – 2022.
64f.:il.

Orientadora: Natália de Melo Ocarino

Coorientadores: Rogéria Serakides

Juneo F. Silva

Dissertação (Mestrado) apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do título de Mestre.

Bibliografia: f. 54 a 64.

1. Animais de laboratório – Teses - 2. Hipertireoidismo – Teses - 3. Tireóide – Doenças – Teses – I. Ocarino, Natália de Melo – II. Serakides, Rogéria – III. Silva, Juneo F. – IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – V. Título.

CDD – 636.089

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO
DOUGLAS MARINHO ABREU

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração Patologia Animal. Aprovado(a) em 24 de fevereiro de 2022, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Natalia de Melo Ocarino - Presidente - Orientador(a)

Dr.(a). Rogéria Serakides

Dr.(a). Jankerle Neves Boeloni

Dr.(a). Bruno Machado Bertassoli



Documento assinado eletronicamente por **Natalia de Melo Ocarino, Professora do Magistério Superior**, em 24/02/2022, às 11:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rogéria Serakides, Professora do Magistério Superior**, em 24/02/2022, às 11:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Machado Bertassoli, Usuário Externo**, em 24/02/2022, às 16:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jankerle Neves Boeloni, Usuário Externo**, em 25/02/2022, às 02:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?

acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1260872** e o código CRC

2EBF0262

Referência: Processo nº 23072.209442/2022-95

SEI nº 1260872

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à *Deus*, pelo dom da vida, por me permitir passar por mais esta etapa de estudos com saúde e por ter me dado energia e benefícios para concluir este trabalho.

Agradeço à minha família. Minha mãe (*in memoriam*), meu pai e irmãos por todo sacrifício, suporte e incentivo necessários para chegar até aqui e pela chance e privilégio de poder falar que não me faltou nada. Muitíssimo obrigado.

À minha orientadora e co-orientadora, Prof^a Natália de Melo Ocarino e Prof^a Rogéria Serakides, agradeço a orientação durante todo este trabalho e guiarem no estreito e gratificante caminho da pesquisa e docência. Obrigado pela confiança e pela generosidade em ensinar, compartilhando, sem restrições, o conhecimento, bem tão valioso. Guardarei e transmitirei cada lição aprendida. A vocês, o meu profundo respeito e admiração.

Agradeço aos meus companheiros do Laboratório Fabiana Rocha, Bruno Bertassoli, Gabriela Medeiros e as ICs Isabela e Ana Carolina. Pelos anos de muito aprendizado e por todo auxílio que me deram durante este trabalho.

À Universidade Federal de Minas Gerais, corpo docente da Escola de Veterinária e demais servidores, grandes responsáveis pela formação que recebi. A vocês, minha eterna gratidão pelos dois anos de aprendizado, os quais marcaram a minha história. Agradeço em especial às minhas amigas da 205: Leimar e Valéria. Vocês tornaram esse trabalho possível, obrigado de verdade.

Àos membros da banca, Prof^a Amanda Maria Sena Reis, Prof^a Rogéria Serakides e Bruno Bertassoli, pelos inúmeros esclarecimentos prestados neste trabalho, por toda ajuda, por serem sempre atenciosos e solícitos e por terem dedicado tempo na análise e correção deste trabalho.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) pelo auxílio financeiro para a realização deste projeto.

À família que encontrei em BH e todas as pessoas maravilhosas que fizeram parte desta história. Os meus amigos de turma: Paulo, Laice e Maira. Amigos da escola de veterinária: Jefferson, Leo, Sostenes, Harlan. E equipe Xeu Team TM. Agradeço imensamente a paciência, compreensão, palavras de incentivo e cumplicidade. Vocês foram fundamentais para mais uma conquista.

Aos meus amigos que, longe ou perto, não me deixaram faltar carinho e compreensão e que foram essenciais durante esse tempo.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste sonho, o meu muito obrigado!

RESUMO

Foram utilizadas 10 ratas Wistar gestantes, sendo cinco induzidas ao hipertireoidismo durante toda a gestação e lactação e cinco ratas mantidas em estado eutireoideo (controle). O hipertireoidismo foi induzido pela administração diária de L-tiroxina por sonda orogástrica, na dose de 50 µg/animal/dia, por todo o período da gestação e lactação. As fêmeas controle receberam placebo no mesmo esquema posológico. Três dias após o nascimento, foram selecionados três neonatos/mãe e o restante dos filhotes foram amamentados pelas mães controle e hipertireoideas até o desmame com 21 dias. No dia do desmame, foram selecionados aleatoriamente 3 filhotes/mãe. Foram totalizados 4 grupos experimentais 1) neonatos filhos de mães controle; 2) neonatos filhos de mães hipertireoideas; 3) filhotes ao desmame de mães controle; 4) filhotes ao desmame de mães hipertireoideas. O hipertireoidismo materno foi comprovado pela dosagem de T₄ livre no plasma das mães e a influência dos hormônios maternos sobre a prole foi comprovada pela histomorfometria da tireoide. Nos dentes molares dos neonatos foram realizadas a mensuração da espessura das camadas de ameloblastos, do esmalte, da dentina, pré-dentina e de odontoblastos na região da coroa e a espessura das camadas de dentina, pré-dentina e de odontoblastos na região da raiz. Nos dentes dos filhotes ao desmame, foi avaliada a espessura das camadas de dentina, pré-dentina e de odontoblastos, bem como a espessura do ligamento periodontal e a avaliação morfológica do osso alveolar. O delineamento foi inteiramente ao acaso e para cada variável foram determinados a média e o desvio padrão. Os dados foram submetidos ao teste *t Student* para comparação das médias. As diferenças foram consideradas significativas se $p < 0,05$. A dosagem de T₄ livre foi maior nas ratas mães tratadas e a altura do epitélio folicular da tireoide foi menor em toda a prole das mães hipertireoideas. Os molares dos neonatos controle e de mães hipertireoideas apresentaram morfologia condizente com normalidade não havendo diferenças entre grupos. Não houve diferença significativa também na espessura das camadas das regiões de coroa e raiz entre os grupos. Ao desmame, os filhotes das ratas hipertireoideas apresentaram características morfológicas semelhantes ao grupo controle, entretanto, a espessura das camadas de odontoblastos e pré-dentina foi significativamente menor ao contrário do ligamento periodontal que foi significativamente mais espesso quando comparado ao grupo controle. O osso alveolar apresentou características morfológicas semelhantes entre grupos. Conclui-se que os efeitos do hipertireoidismo materno no desenvolvimento dentário e periodontal da prole de ratos se manifestam morfológicamente somente no período pós-natal, ou seja, ao desmame, quando há redução da espessura das camadas de odontoblastos e de pré-dentina e aumento da espessura do ligamento periodontal.

Palavras-chave: odontogênese, disfunções tireoidianas, rato, morfometria, periodonto

ABSTRACT

Ten pregnant Wistar rats were used, five of which were induced to hyperthyroidism throughout pregnancy and lactation, and five rats were maintained in a euthyroid state (control). Hyperthyroidism was induced by the daily administration of L-thyroxine through an orogastric tube, at a dose of 50 µg/animal/day, throughout the entire period of pregnancy and lactation. Control females received a placebo in the same dosage schedule. Three days after birth, 3 newborns/mothers were selected and the rest of the pups were breastfed by the control and hyperthyroid mothers until weaning at 21 days. On the day of weaning, 3 pups/mothers were randomly selected. Four experimental groups were totaled 1) neonates born to control mothers; 2) newborns born to hyperthyroid mothers; 3) weanling offspring from control mothers; 4) weaning puppies from hyperthyroid mothers. Maternal hyperthyroidism was confirmed by the measurement of free T4 in the mother's plasma and the influence of maternal hormones on the offspring was confirmed by thyroid histomorphometry. The thickness of the ameloblasts, enamel, dentin, pre-dentin and odontoblasts layers in the crown region and the thickness of the dentin, pre-dentin, and odontoblasts layers in the region of the newborns were measured in the molar teeth of the newborns. In the pups' teeth at weaning, the thickness of the dentin, pre-dentin, and odontoblast layers was evaluated, as well as the thickness of the periodontal ligament and the morphological evaluation of the alveolar bone. The design was completely randomized and for each variable, the mean and standard deviation were determined. Data were submitted to the Student t-test for comparison of means. Differences were considered significant if $p < 0.05$. Free T4 dosage was higher in treated mother rats and the height of the thyroid follicular epithelium was lower in all offspring of hyperthyroid mothers. The molars of control neonates and hyperthyroid mothers presented a morphology consistent with normality, with no differences between groups. There was also no significant difference in the thickness of the layers of the crown and root regions between the groups. At weaning, the offspring of hyperthyroid rats showed morphological characteristics like the control group, however, the thickness of the odontoblast and pre-dentin layers was significantly smaller, unlike the periodontal ligament, which was significantly thicker when compared to the control group. The alveolar bone showed similar morphological characteristics between groups. It is concluded that the effects of maternal hyperthyroidism on the dental and periodontal development of the offspring of rats are morphologically manifested only in the postnatal period, that is, at weaning, when there is a reduction in the thickness of the odontoblast and pre-dentin layers and an increase in the thickness of the periodontal ligament.

Keywords: odontogenesis, thyroid dysfunctions, rat, morphometry, periodontal

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Desenho esquemático das regiões e dos componentes dentários	13
Figura 2	Desenho esquemático dos estágios de desenvolvimento dentário. Fase de botão.	20
Figura 3	Desenho esquemático dos estágios de desenvolvimento dentário. Fase de capuz	21
Figura 4	Desenho esquemático dos estágios de desenvolvimento dentário. Fase de campânula	22
Figura 5	Desenho esquemático dos estágios de desenvolvimento dentário. Fase de raiz	23
Figura 6	Desenho esquemático dos estágios de desenvolvimento dentário. Fase de raiz	24
Figura 7	Organograma do manejo reprodutivo, indução do hipertireoidismo e seleção da prole nos grupos controle e tratado com L-tiroxina	34
Figura 8	Neonato de rato mostrando a região da mandíbula e maxila a ser processada para visualização dos dentes molares	36
Figura 9	Dente de rato neonato mostrando as camadas a serem mensuradas e as regiões de coroa e raiz	37
Figura 10	Dente de rato ao desmame mostrando as camadas a serem mensuradas	37
Figura 11	Concentrações plasmáticas de T ₄ livre (média±SD) de ratas controle e tratadas com L-tiroxina *(p<0,05)	39
Figura 12	Histomorfometria da tireoide (média±SD) dos neonatos e ratos com 21 dias de idade, filhos de mães controle e tratadas com L-tiroxina. A) Diâmetro folicular (µm) semelhante entre grupos (p>0,05). B Redução da altura do epitélio folicular (µm) da tireoide dos neonatos e dos ratos com 21 dias de idade do grupo tratado em comparação ao controle (P<0,05).	40
Figura 13	Fotomicrografia dos dentes dos neonatos de mães controle e de mães hipertireoideas das regiões de coroa e raiz. 1 - Camada de odontoblastos; 2 Camada de pré-dentina; 3 - Camada de dentina; 4 - Camada de matriz orgânica do esmalte e 5 - Camada de ameloblastos. H&E.	42
Figura 14	Média e desvio padrão (média±SD) da espessura das camadas (região de coroa) dos dentes de neonatos de mães controle e de mães hipertireoideas.	43

Figura 15	Média e desvio padrão (média±SD) da espessura das camadas (região de raiz) dos dentes de neonatos de mães controle e de mães hipertireoideas.	43
Figura 16	Fotomicrografia dos dentes dos filhotes com 21 dias de mães controle e de mães hipertireoideas. 1: Polpa dentária; 2: Camada de odontoblastos; 3: Camada de pré-dentina; 4: Camada dentina; 5: Ligamento periodontal e 6: Osso alveolar. H&E.	44
Figura 17	Média e desvio padrão (média±SD) da espessura das camadas dos dentes de filhotes com 21 dias de mães controle e de mães hipertireoideas. *p<0,05.	45
Figura 18	Fotomicrografia dos dentes dos filhotes com 21 dias de mães controle e de mães hipertireoideas. 1: Polpa dentária; 2: Camada de odontoblastos; 3: Camada de pré-dentina; 4: Camada dentina; 5: Ligamento periodontal e 6: Osso alveolar. H&E.	46
Figura 19	Média e desvio padrão (média±SD) da espessura do ligamento periodontal de filhotes com 21 dias de mães controle e de mães hipertireoideas. *p<0,05.	47

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. OBJETIVOS.....	13
3. REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1. Anatomia e estrutura dentária e periodontal	14
3.2 Odontogênese	20
3.3 Disfunções tireoidianas e alterações dentárias e periodontais	28
3.4. O rato como modelo para doenças dentárias humanas	33
4. MATERIAL E METODOS.....	34
4.1 Infraestrutura utilizada	34
4.2 Acasalamento e administração de tiroxina para indução do hipertireoidismo materno.....	34
4.3 Confirmação do hipertireoidismo materno e histomorfomea das tireoides da prole.....	36
4.4 Processamento histopatológico e histomorfometria dentária e periodontal.....	36
4.5 Análise estatística.....	39
5. RESULTADOS	40
5.1 Concentração plasmática de T4 livre e histomorfometria da tireoide.....	40
6. DISCUSSÃO.....	48
7. CONCLUSÃO.....	53
8. REFERÊNCIAS	54

1. INTRODUÇÃO

Os hormônios tireoidianos (HT), representados pela triiodotironina (T3) e pela tiroxina (T4), são essenciais para a formação, crescimento e funções metabólicas de vários órgãos e sistemas teciduais, incluindo tecidos mineralizados, como os ossos e os dentes (Pinto e Glick, 2002; Bassett e Williams, 2003; Bochukova *et al.*, 2012; Bassett *et al.*, 2014). Os dentes são constituídos pelo esmalte, dentina, pré-dentina, polpa dentária e pelo cimento. A dentina, formada pelos odontoblastos e o cimento, pelos cementoblastos são considerados variantes do tecido ósseo possuindo constituição semelhante à do osso e com morfologia variável e dependente da idade (Belting *et al.*, 1953; Pinzon *et al.*, 1967; Loushall *et al.*, 2002).

A formação do dente ou odontogênese é um processo complexo que envolve a interação recíproca entre o epitélio dental e o ectomesênquima originário das células da crista neural, envolvendo mudanças no potencial odontogênico desses tecidos (Silva e Alves, 2008) que começa com o desenvolvimento dos dentes decíduos durante o período pré-natal e termina no período pós-natal com a formação das raízes do terceiro molar (Nanci, 2014). A odontogênese envolve eventos celulares e moleculares altamente coordenados que promovem a formação dos elementos dentários (Cobourne, 1999) sendo que a forma do dente, o tamanho e a sua posição são determinados pela proliferação, diferenciação e apoptose de diferentes populações celulares (Matalova *et al.*, 2011).

Durante o desenvolvimento dentário, o dente será circundado e apoiado em estruturas/tecidos que constituem o periodonto cuja principal função é inserir o dente no osso alveolar além de manter a integridade da mucosa da cavidade oral. O periodonto é dividido em periodonto de proteção formado pela gengiva e mucosa alveolar e o periodonto de sustentação formado pelo ligamento periodontal, cimento e osso alveolar. A estrutura e função dos tecidos componentes do periodonto são dependentes e, sob condições normais, seus processos de renovação

e adaptação mantêm uma inter-relação importante. (Nanci, 2019)

Assim, os distúrbios do desenvolvimento e do crescimento dentários podem decorrer de anormalidades estruturais, morfológicas e posicionais (Crawford e Aldred, 2012) e de variações no tempo de formação do dente além da velocidade de erupção do mesmo (Suri *et al.*, 2004).

Além da odontogênese ser regulada por fatores genéticos (Nanci, 2014), os fatores sistêmicos e locais, incluindo os fatores hormonais, dentre eles os hormônios tireoidianos, são também essenciais no desenvolvimento do dente, bem como no processo de erupção dentária (Bochukova *et al.*, 2012; Bassett *et al.*, 2014).

Sabe-se que os hormônios tireoidianos modulam o desenvolvimento dos vários órgãos por atuarem diretamente por meio de receptores nucleares específicos denominados TR α e TR β (Wojcicka *et al.*, 2013). Assim, variações nos níveis séricos dos HT, como acontecem no hipo e no hipertireoidismo, podem resultar em um série de alterações incluindo os distúrbios cranioorofaciais (Waung *et al.*, 2012; Wojcicka *et al.*, 2013; Bassett e Williams, 2018).

Apesar de já serem conhecidas várias alterações induzidas pelo hipo e hipertireoidismo no tecido ósseo incluindo nos ossos do crânio, mandíbula e maxila (Bedi e Brook, 1984; Ferrazo *et al.*, 2014), pouco se sabe sobre seus efeitos na formação e no desenvolvimento dos dentes e do periodonto. Há algumas semelhanças entre o dente e o osso que vão além do fato de ambos serem mineralizados. A dentina e o cimento, por exemplo, são variantes do tecido ósseo responsivas a vários fatores sistêmicos que também atuam no osso. Por isso, a questão suscitada é se esses componentes do dente também apresentariam alterações frente às disfunções tireoidianas, à semelhança do que tem sido publicado no esqueleto de animais em crescimento submetidos às disfunções tireoidianas maternas no período pré- e pós-natal (Ribeiro *et al.*, 2018a; Ribeiro *et al.*, 2018b). Esta é uma das questões que se pretende esclarecer com a execução deste estudo. Há indícios de que essa hipótese possa vir a ser confirmada, diante dos efeitos que as disfunções tireoidianas causam nos dentes de indivíduos adultos,

como será descrito à frente.

As disfunções tireoidianas podem ocorrer em qualquer fase da vida, mas são comuns durante a gestação. Como a tireoide fetal não está funcionalmente madura até 18 a 20 semanas de idade gestacional nos humanos e até 17º dia de gestação no rato, a disfunção tireoidiana materna pode afetar o estágio inicial de desenvolvimento do dente, uma vez que o feto é dependente da transferência placentária dos hormônios tireoidianos maternos (Greenberg *et al.*, 1970; Thorpe-Beeston *et al.*, 1991).

O hipertireoidismo materno tem incidência estimada de 0,2%, podendo chegar até 2,5% quando são considerados os casos de hipertireoidismo materno subclínico (Taylor *et al.*, 2018). Assim, o hipertireoidismo materno pode levar ao desenvolvimento fetal anormal, uma vez que ocorre passagem transplacentária de T4 (Brent, 2000; Bassett e Williams, 2016; Gouveia *et al.*, 2004). Apesar dos distúrbios maternos funcionais da tireoide serem causas de alterações ósseas na prole (Ribeiro *et al.*, 2018a; Ribeiro *et al.*, 2018b; Milošević *et al.*, 2018), não há estudos que avaliaram os efeitos das disfunções tireoidianas maternas sobre o desenvolvimento dentário da prole. O que se sabe é que as disfunções tireoidianas congênitas ou adquiridas após a erupção dentária, influenciam a morfologia do dente, a velocidade de erupção dos mesmos e a predisposição à caries e às doenças periodontais, respectivamente (Ikeda *et al.*, 2008, Chandna e Bathla, 2011; Nanci 2014). No entanto, parece não haver pesquisas que tenham investigado o efeito das disfunções tireoidianas sobre o periodonto nas fases iniciais da vida, sendo este, mais um dos objetivos do presente estudo.

Apesar das disfunções tireoidianas serem comuns na infância e seus efeitos nas estruturas craniofaciais, dentais e orais já serem conhecidos, não se sabe quais seriam os efeitos e os mecanismos pelos quais as disfunções tireoidianas maternas alterariam a odontogênese e o periodonto da prole durante a gestação e a lactação, ou seja, nos períodos pré- e pós-natal, respectivamente.

2. OBJETIVOS

- Avaliar o desenvolvimento e o crescimento dentários da prole de mães com hipertireoidismo nos períodos pré- e pós-natal, por morfologia e histomorfometria com mensuração da espessura das camadas de ameloblastos, da matriz orgânica do esmalte, dentina, pré-dentina e de odontoblastos das regiões de coroa e raiz (neonatos) e a espessura das camadas de dentina, pré-dentina e de odontoblastos (filhotes ao desmame)
- Avaliar o periodonto de sustentação por meio da mensuração da espessura do ligamento periodontal bem como avaliar a morfologia do osso alveolar da prole ao desmame.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Anatomia e estrutura dentária e periodontal

Os dentes são órgãos que compõem a cavidade oral fazendo parte do sistema digestório, possuem as funções de trituração e/ou mastigação do alimento além de apreensão, de objetos e filhotes, no caso de cães e gatos (Kowalesky, 2005). Dentre os animais domésticos, o hábito alimentar de cada espécie reflete na sua dentição no que diz respeito aos padrões de crescimento e no número de dentes (Vieira *et al.*, 2009).

Os dentes são constituídos por estruturas como esmalte, dentina, cemento e polpa dentária e cada dente é formado pela coroa e raiz (Figura 1). A coroa é a parte livre do dente, que se projeta acima da linha da gengiva e se forma dentro do processo alveolar da mandíbula e maxila e a raiz é a parte implantada no alvéolo dental (Dangelo e Fattini, 2007; Kardong, 2010). A região da coroa que apresenta o tecido pulpar é denominada câmara pulpar. Já os canais radiculares, referem-se à porção da raiz que contém o tecido pulpar (Kowalesky, 2005; Gorrel e Larsson 2002).

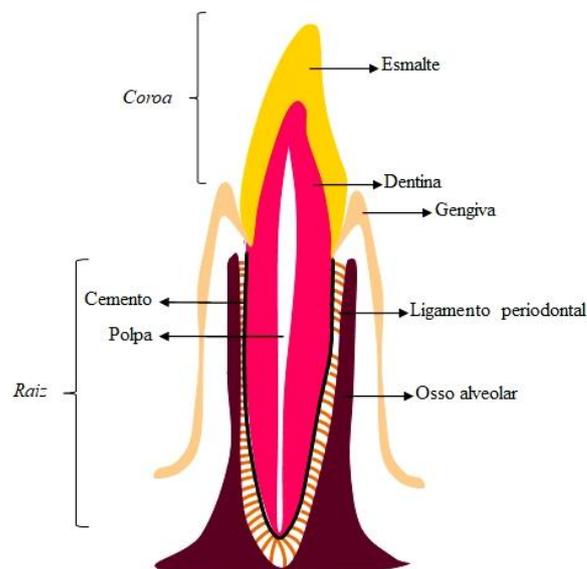


Figura 1. Desenho esquemático das regiões e dos componentes dentários. Arquivo pessoal

A *polpa dentária* é o único tecido dentário conjuntivo não mineralizado do dente (Arana-Chavez e Massa, 2004) e se localiza no centro do órgão e é constituída por fibroblastos, nervos e vasos sanguíneos tendo como principal função a nutrição do dente (Silva *et al.*, 2019; Okajcekova *et al.*, 2020). Outros tipos celulares também são encontrados na polpa como células de defesa (macrófagos, linfócitos e células dendríticas); células neurais e células mesenquimais indiferenciadas (Souza, 2008; Araújo, 2011; Vasconcelos *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2019; Weiss *et al.*, 2020). Algumas dessas células mantêm a capacidade de se diferenciar e participam do processo de reparação das estruturas dentais (Souza, 2008; Vasconcelos *et al.*, 2011). A polpa se encontra em uma câmara rígida, denominada cavidade pulpar, envolta pela dentina, esmalte e cimento, que proporcionam suporte mecânico e proteção contra microrganismos. Entretanto se esse revestimento perder sua integridade estrutural, a polpa estará vulnerável a estímulos adversos da cavidade oral (Yu *et al.*, 2007).

Na parte externa da superfície da polpa dental (região da junção da polpa com a dentina), encontra-se uma camada de células colunares dispostas em forma de paliçada. Estas células são denominadas odontoblastos cuja função é sintetizar a pré-dentina que vai se mineralizando formando a dentina em um processo denominado dentinogênese (Murray *et al.*, 2000). Os odontoblastos têm origem na crista neural e permanecem sintetizando a dentina por toda a vida do indivíduo. Além da síntese de matriz, o odontoblasto participa também da remoção por endocitose e da degradação intracelular da matriz orgânica e dos produtos gerados durante a conversão de pré-dentina em dentina (Sasaki *et al.*, 1996; Arana-Chaves *et al.*, 2004). Além disso, os odontoblastos também são células que representam, no dente, a primeira linha de defesa, ou seja, eles podem reconhecer uma invasão bacteriana e conseqüentemente provocar reações inflamatórias e imunológicas da polpa, secretando quimiocinas (Bleicher *et al.*, 2015).

A *dentina* é formada por glicoproteínas, colágeno I (Linde e Goldberg, 1993; Avery e Chiego, 2006; Nanci, 2019) e por cristais de hidroxiapatita (Nanci, 2019) e

contem inúmeros canalículos que convergem para a polpa, por onde transcorre fluido extracelular importante para a nutrição dentária (Magloire *et al.*, 2009). Existem três tipos de dentina: dentina primária, secundária e terciária. O dente é formado na sua maioria por dentina primária (ou dentina circumpulpar, pois rodeia a polpa) que é sintetizada até a formação completa da raiz (Nanci *et al.*, 2013; Bleicher *et al.*, 2015). A dentina circumpulpar pode ser dividida em intertubular e peritubular: a dentina intertubular é a produzida pelos odontoblastos em maior quantidade durante a dentinogênese e encontra-se perto da zona de mineralização; a dentina peritubular encontra-se em menor volume e é sintetizada ao redor dos túbulos dentinários, distante da junção pré-dentina/dentina (Linde e Goldberg, 1993). A dentina secundária desenvolve-se após a completa formação da dentina radicular, sendo formada ao longo da superfície da dentina circumpulpar (Linde e Goldberg, 1993; Smith *et al.*, 1995; Nanci, 2019). Este tipo de dentina tem uma estrutura tubular menos regular que a dentina primária. A composição química e a organização estrutural desta dentina secundária são idênticas à da dentina primária (Nanci *et al.*, 2013; Bleicher *et al.*, 2015). A dentina terciária (chamada de reativa ou reparadora) é produzida em reação a estímulos externos, tais como atrito ou durante processos patológicos (Linde e Goldberg, 1993; Smith *et al.*, 1995; Nanci, 2014).

Vasos sanguíneos não estão presentes na dentina; as artérias, que penetram pelo ápex do dente, migram coronariamente até o centro da polpa e dividem-se em artérias terminais que formam uma rede de capilares sob a camada odontoblástica (Linde e Goldberg, 1993). Quanto à inervação, esta é feita por terminações nervosas provenientes da polpa dentária, acompanhando entre 30 a 70% o trajeto dos prolongamentos odontoblásticos ao longo dos túbulos dentinários (Kumar, 2011).

O *esmalte* é um tecido mineralizado que recobre a dentina sendo secretado pelos ameloblastos somente durante o desenvolvimento dentário, ou seja, antes da erupção dentária. O esmalte, em média, contem 96% de hidroxiapatita e 4% de

material orgânico e água. O elevado teor de mineral associado a estrutura complexa desta camada, faz com que o esmalte resista às forças mecânicas aplicadas durante a mastigação formando uma barreira que protege o dente das forças físicas, térmicas e químicas (Nanci *et al.*, 2013; Lacruz *et al.*, 2017).

A formação do esmalte, conhecida como amelogênese, é complexa e envolve duas fases: secreção e maturação (Park *et al.*, 2007). Durante a fase de secreção, os ameloblastos sintetizam e secretam proteínas da matriz do esmalte, tais como amelogenina, ameloblastina e enamelin; e da enzima enamelinase (Moffat *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2007) mantendo a espessura do esmalte, formando um tecido altamente especializado. Durante a fase de maturação, fase em que ocorre a mineralização da matriz, os ameloblastos sintetizam amelotina (Iwasaki *et al.*, 2005; Moffat *et al.*, 2008) e apina (Moffat *et al.*, 2006; Moffat *et al.*, 2008) proteínas importantes nesta fase que é responsável pela dureza do esmalte pois modulam e transportam íons específicos para a deposição de minerais (Nanci *et al.*, 2013). Por ser um tecido acelular, uma vez mineralizado o esmalte não é remodelado ou regenerado o que faz com que os insultos ou danos no seu desenvolvimento sejam críticos (Lacruz *et al.*, 2017).

Por indução da dentina recém-mineralizada, as células indiferenciadas mais próximas do saco dentário se transformam em cementoblastos e assim se dá o início à formação da matriz orgânica do *cemento* (Carranza, 1983; Lindhe *et al.*, 2010). O cemento é um tecido mineralizado que cobre toda a superfície da raiz do dente. A formação do cemento começa quando ambos os epitélios das células da bainha radicular de Hertwig (HERS) e das células mesenquimais do folículo dental estão próximas da superfície radicular em desenvolvimento (Diekwisch, 2001). Devido à sua posição intermediária entre a dentina radicular e o ligamento periodontal, o cemento é um componente do próprio dente, mas pertence funcionalmente ao aparelho de fixação dentária, isto é, o periodonto (Bosshardt *et al.*, 1997; Bosshardt, 2005). O cemento, que possui estrutura semelhante ao tecido ósseo é um tecido constituído de matriz orgânica mineralizada onde 45% a 50% são de hidroxiapatita

e a porção restante representada por colágeno tipo I, III e XII e por proteínas não colagênicas da matriz, como fosfatase alcalina, sialoproteína óssea, fibronectina, osteonectina, osteopontina e proteoglicanos (Nanci *et al.*, 2013; Yamamoto *et al.*, 2016). A mineralização da matriz se dá pela deposição de cristais de hidroxiapatita cuja deposição é contínua. O cemento possui as funções de proteger a raiz e unir a mesma ao osso alveolar por meio da inserção das microfibras colagênicas do ligamento periodontal; além de apresentar importante função de reparação aos danos nas superfícies das raízes dentárias. Pela ausência de vascularização, o cemento é nutrido pela difusão de substâncias advindas do ligamento periodontal (Bosshardt *et al.*, 1997).

Existem dois tipos de cemento: cemento celular e o cemento acelular (Nanci *et al.*, 2013). O cemento celular é composto pelos cementoblastos e cementócitos, sendo as primeiras precursoras das segundas, as quais se encontram aprisionadas em lacunas. Os cementócitos comunicam-se através de canalículos e através destes, recebem os nutrientes provenientes do ligamento periodontal. A porção cervical do cemento é acelular, a matriz é produzida pelos cementoblastos mas não possui cementócitos. O cemento acelular está presente no momento de erupção dos dentes e o celular, se forma após a erupção dos mesmos em resposta às demandas funcionais (Consolaro *et al.*, 2012).

O dente é fixo a cavidade oral por meio do periodonto que se caracteriza por um conjunto de tecidos que circundam o dente; representado pela gengiva, osso alveolar, cemento e ligamento periodontal (Junqueira e Carneiro, 2017). O periodonto é dividido em periodonto de proteção e de sustentação. O periodonto de proteção é formado pela gengiva (gengiva marginal, gengiva inserida e gengiva interdentária) e pela mucosa alveolar. Sua principal função é promover a homeostasia, ou seja, proteger a articulação alvéolo-dentinária dos traumas da mastigação e também da invasão microbiana, pois ela isola o tecido subjacente das bactérias e suas toxinas (Lindhe *et al.*, 2010). Já o periodonto de sustentação ou suporte é constituído pelo ligamento periodontal, osso alveolar e cemento radicular

e tem a função essencial de sustentação dos dentes, bem como uma função sensorial, formativa, nutricional e de inervação (Carranza, 1983; Lindhe *et al.*, 2010).

O ligamento periodontal é formado por tecido conjuntivo frouxo, altamente vascularizado e celular, que circunda as raízes dos dentes e une o cemento radicular ao osso alveolar (Junqueira e Carneiro, 2017). Em direção à coroa, o ligamento periodontal é contínuo com a lâmina própria da gengiva e está separado desta por feixes de fibras colágenas que conectam à crista do osso alveolar com a raiz. À medida que o dente se forma e ocorre sua erupção, o ligamento periodontal vai se formando e sua estrutura vai se moldando a partir do momento que as cargas funcionais vão sendo aplicadas. O ligamento periodontal possui a função de atuar na mobilidade dentária e essa função é determinada pela largura, altura e qualidade do ligamento. Além disso, participa com função sensorial devido a sua grande inervação (Lanza *et al.*, 2003).

O osso alveolar (OA) que também compõe o periodonto de sustentação é a camada de tecido ósseo que reveste o alvéolo dentário. Se forma durante a vida fetal por ossificação intramembranosa e se desenvolve até a erupção dos dentes sendo reabsorvido quando os mesmos são perdidos (Carranza, 1983). Como os ossos do esqueleto, o osso alveolar é constantemente remodelado em resposta às forças mecânicas do dente e à processos inflamatórios (Lindhe *et al.*, 2010). Como os demais ossos do esqueleto, é formado de uma matriz orgânica composta por predominantemente por colágeno tipo I que vai se mineralizando devido a incorporação de cristais de hidroxiapatita (Lindhe *et al.*, 2010). O osso alveolar é formado por dois componentes: a cortical alveolar, que representa uma porção lamelar e fasciculada e a cortical externa vestibular, que reveste o alvéolo, contendo canais de Volkman, através dos quais vasos sanguíneos, linfáticos e fibras nervosas passam do osso alveolar para o ligamento periodontal (Lindhe *et al.*, 2010).

3.2 Odontogênese

A formação do dente ou odontogênese é um processo complexo que envolve a interação recíproca entre o epitélio dental e o ectomesênquima originário das células da crista neural, envolvendo mudanças no potencial odontogênico desses tecidos (Silva e Alves, 2008; Frazier e Vora, 2017) que começa com o desenvolvimento dos dentes decíduos durante o período pré-natal e termina no período pós-natal com a formação das raízes do terceiro molar (Nanci, 2014). A odontogênese envolve eventos celulares e moleculares altamente coordenados que promovem a formação dos elementos dentários (Cobourne, 1999) sendo que a forma do dente, o tamanho e a sua posição são determinados pela proliferação, diferenciação e apoptose de diferentes populações celulares (Matalova *et al.*, 2011).

O desenvolvimento do dente, que tem origem mista, ou seja, epitelial e mesenquimal passa por estágios que costumam ser divididos em fases de acordo com a morfologia do germe dental em desenvolvimento. São elas: fase de botão, fase de capuz, fase de campânula, fase de coroa e fase de raiz (Ross, 2016; Katchburian, 2017).

Na fase de botão ou broto observa-se um crescimento em volume da borda livre da lâmina dentária para dentro do ectomesênquima dos maxilares (Lumsden, 1988). A lâmina dentária apresenta, em alguns locais, atividades mitóticas diferenciadas (Huang *et al.*, 2010). A estrutura epitelial invagina para o ectomesênquima subjacente para formar um botão. Células ectomesenquimais condensam ao redor do botão e futuramente originam a papila dentária (Kettunen *et al.*, 2000; Nanci, 2019; Katchburian, 2017) (Figura 2).

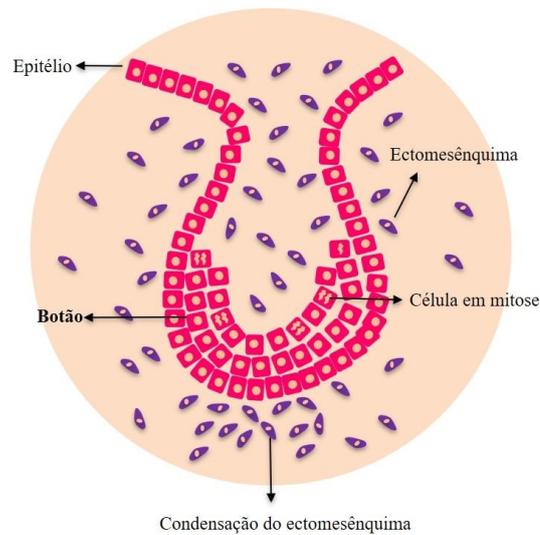


Figura 2. Desenho esquemático dos estágios de desenvolvimento dentário. Fase de botão.

Acredita-se que esta condensação celular seja mediada pela ligação da molécula de superfície celular denominada Sindecan-1 à tenascina uma proteína presente na matriz extra-celular (Katchburian e Arana, 2004).

Durante a fase de botão, vários sinais para o prosseguimento da odontogênese partem principalmente do epitélio oral para o ectomesênquima. Estes sinais são mediados por moléculas como proteínas morfogenéticas do osso (BMPs), fatores de crescimento fibroblástico (FGFs), Sonic hedgehog (Shh) e as vias de sinalização Wnts. O ectomesênquima ao receber estes sinais, adquire o potencial de estimular os processos de morfogênese e citodiferenciação (Yen, 2008; Yu, 2008).

Com a continuação da proliferação epitelial, o botão apresenta um crescimento desigual, adotando forma semelhante a um **capuz**, que dá o nome da etapa. O capuz epitelial também denominado de órgão epitelial do esmalte constitui-se pela identificação de 3 estratos celulares (epitélio interno e externo do órgão do esmalte e retículo estrelado) (Peters, 1999; Camilleri e McDonald 2006; Berkovitz, 2004). São as células do epitélio interno que irão diferenciar-se em ameloblastos para deposição de matriz de esmalte (Miletich *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2005). No centro de sua parte mais profunda, apresenta uma concavidade, sob a qual é

observada uma concentração maior de células ectomesenquimais em comparação com a etapa anterior (Nanci, 2019) a papila dentária. O ectomesênquima também se condensa e envolve o órgão do esmalte e a papila dentária formando o saco ou folículo dentário (Figura 3).

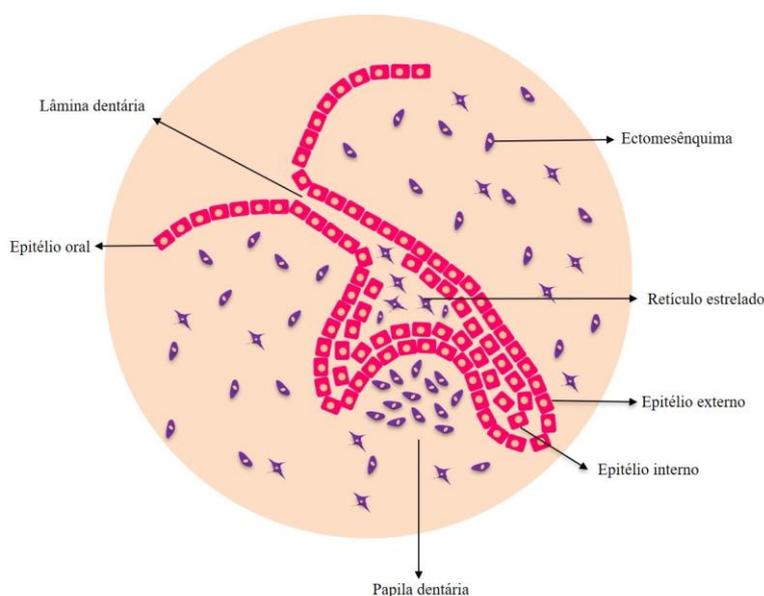


Figura 3. Desenho esquemático dos estágios de desenvolvimento dentário. Fase de capuz.

A fase de **sino ou campânula** (recebe esse nome pois a parte epitelial do germe dentário apresenta aspecto de sino, com sua concavidade mais acentuada e margens mais aprofundadas) é caracterizado pela redução da proliferação das células epiteliais e do crescimento do órgão do esmalte (Katchburian, 2017). Nesta fase, entre o epitélio interno e o retículo estrelado surge uma camada de epitélio escamoso composto por duas a três células achatadas denominado de estrato intermediário. Estas células caracterizam-se por exercer uma alta atividade de fosfatase alcalina, sendo essenciais para o desenvolvimento do esmalte, provavelmente contribuindo para o processo de mineralização ou produzindo substâncias que sejam repassadas aos ameloblastos e destes para a matriz do esmalte durante a amelogênese. Tanto no órgão do esmalte quanto nas células ectomesenquimais, ocorre a diferenciação das diversas células do germe dentário.

Por isso, essa fase também é conhecida por fase de morfo ou histodiferenciação (Jernval, 2000; Ross, 2016; Nanci, 2019) (Figura 4).

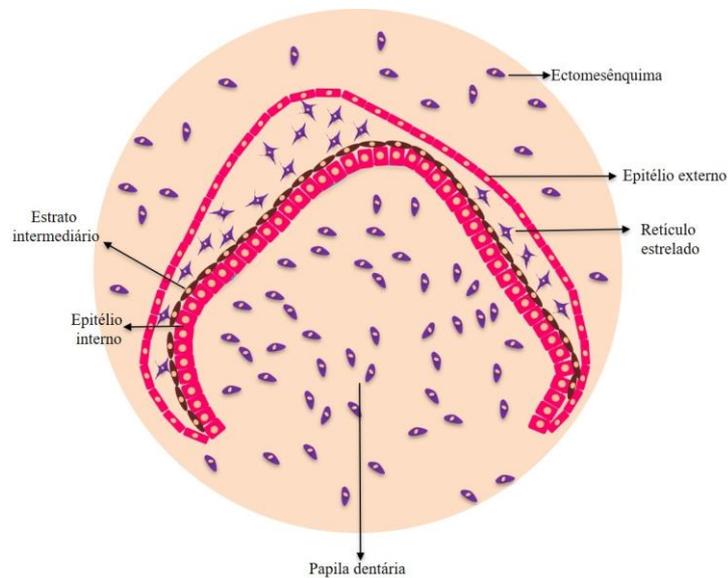


Figura 4. Desenho esquemático dos estágios de desenvolvimento dentário. Fase de campânula.

O início da deposição da matriz da dentina caracteriza o fim da fase de campânula e o início da fase de **coroa**. A fase de coroa corresponde ao período em que os tecidos mineralizados da coroa do futuro dente estão se formando, ou seja, os processos de dentinogênese e amelogênese. Após a deposição da primeira camada de dentina do manto, os pré-ameloblastos terminam sua diferenciação para ameloblastos assumindo todas as características de uma célula secretora (Jernval, 2000; Katchburian, 2017; Nanci, 2019) (Figura 5). A polpa também inicia sua caracterização por mudanças das células da papila dentária e organização funcional dos odontoblastos. A deposição de dentina pelos odontoblastos ocorre de forma centrípeta, enquanto a deposição de esmalte pelos ameloblastos ocorre de forma centrífuga (Jernval, 2000; Katchburian, 2017; Nanci, 2019).

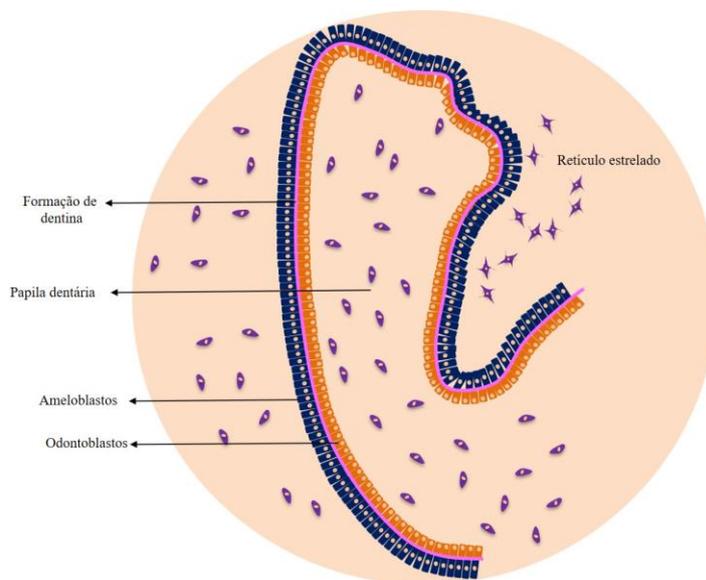


Figura 5. Desenho esquemático dos estágios de desenvolvimento dentário. Fase de raiz.

Uma vez finalizada a deposição do esmalte e da dentina na coroa, o dente inicia a fase de formação da raiz; fase importante para o processo de erupção dentária (Silva e Alves, 2008). Na fase de **raiz**, os epitélios interno e externo do órgão do esmalte proliferam em direção apical para induzir a formação da raiz do dente. O epitélio resultante dessa proliferação denomina-se bainha epitelial de Hertwig (Katchburian, 2004; Bluteau, 2008). Inicia-se a formação da dentina radicular devido a presença dessa bainha que estimula o aparecimento dos odontoblastos a partir das células da papila dentária. As dimensões e a quantidade de raiz do dente em formação são determinadas por uma dobra perpendicular da extremidade da bainha que forma um colarinho, o diafragma epitelial. Essa fase é caracterizada também, pela movimentação do dente em direção à cavidade bucal, pela erupção dentária pré-oclusal, formação da polpa radicular pela papila dentária e formação dos tecidos de inserção ou sustentação do dente; o cimento, ligamento periodontal e o osso alveolar fasciculado - a partir do folículo dentário (Bluteau, 2008) (Figura 6).

Após o início da formação da raiz, as células da bainha epitelial de Hertwig secretam uma matriz orgânica que fica sobre a dentina. Simultaneamente, começa a

deposição dos constituintes orgânicos do cimento (Bartold *et al.*, 2000) o que induz a fragmentação da bainha epitelial de Hertwig, promovendo o contato entre a dentina radicular e o ectomesênquima do folículo dentário. Esse contato induz a diferenciação das células ectomesenquimais. Uma vez diferenciados, os fibroblastos e cementoblastos produzem e secretam a matriz orgânica constituinte do cimento que vai sendo mineralizada pela deposição de fosfato de cálcio (Nanci, 2013). Os fibroblastos participam também da formação do ligamento periodontal. Uma vez diferenciados, os fibroblastos dispõem-se obliquamente e passam a sintetizar a matriz do ligamento periodontal. Do lado oposto ao cimento, os fibroblastos formam as fibras que ficam inseridas no osso alveolar (Nanci, 2013)

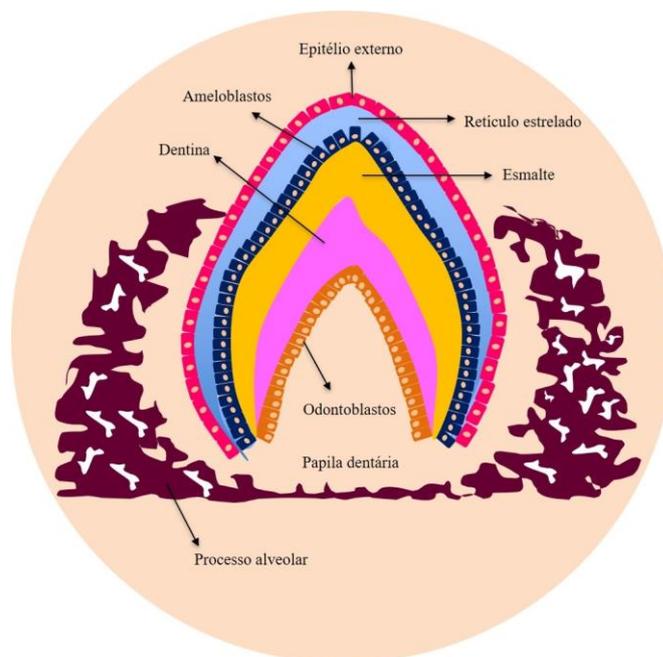


Figura 6. Desenho esquemático dos estágios de desenvolvimento dentário. Fase de raiz.

Antes da formação do osso alveolar propriamente dito, na fase de capuz ocorre a formação do osso basal, já que sua formação independe da formação do germe dental. Na fase de campânula, o osso basal se expande e rodeia o germe dental formando uma cripta óssea. Entre a cripta óssea e a raiz do germe dental (em formação) está o folículo dentário, que já está sofrendo sua transformação nas outras estruturas do periodonto de sustentação. As células mais externas do folículo

dentário diferenciam-se em osteoblastos que iniciam a formação do osso alveolar propriamente dito sobre as paredes internas da cripta óssea.

A estrutura e função dos tecidos componentes do periodonto são dependentes e, sob condições normais, seus processos de renovação e adaptação mantêm uma inter-relação importante. Assim, os distúrbios do desenvolvimento e do crescimento dentários podem decorrer de anormalidades estruturais, morfológicas e posicionais (Crawford e Aldred, 2012) e de variações no tempo de formação do dente além da velocidade de erupção do mesmo (Suri *et al.*, 2004).

Apesar do mecanismo molecular relacionado à odontogênese, em humanos, não ser completamente conhecido, mais de 200 genes, além de alguns fatores de transcrição e de crescimento já foram identificados no desenvolvimento do dente em mamíferos (Parr e McMahon, 1994; Jernvall e Thesleff, 2000). Sabe-se que a expressão de diversos genes envolvidos na interação entre o epitélio e o ectomesênquima e, que são expressos antes do desenvolvimento dos componentes dentários, é fundamental para a determinação do formato do dente (Yen e Sharpe, 2008; Yu *et al.*, 2008). Srisuwan *et al.* (2006) descrevem que a modulação da expressão destes genes é resultado da interação de componentes da matriz extracelular com receptores de superfície celular (integrinas), pois esta interação é fundamental para a proliferação, migração, diferenciação e apoptose das células.

O MSX (Muscle segment box) é um fator de transcrição estreitamente envolvido na odontogênese (Maas e Bei, 1997) e consiste em três membros denominados Msx1, Msx2 e Msx3 (Davidson e Hill, 1991; Davidson, 1995). No desenvolvimento de embriões de vertebrados, o Msx1 e Msx2 são amplamente expressos em muitos órgãos; particularmente nos locais onde ocorrem as interações epitelial-mesenquimal (Davidson, 1994) e são fortemente expressos nas regiões craniofaciais em desenvolvimento (MacKenzie *et al.*, 1991a; Mackenzie *et al.*, 1992b; Sarapura *et al.*, 1997; Shetty *et al.*, 1999). O Msx1 é expresso no ectomesênquima do germe dental, especialmente nos estágios de botão e capuz, como resposta aos sinais moleculares do epitélio odontogênico (Thesleff, 2003). Ratos com mutações do

gene *Msx1* têm os dentes molares paralisados no estágio de botão, gerando anodontia mais especificamente no desenvolvimento de terceiros molares e segundos pré-molares (Vastardis *et al.*, 1996; Nieminen, 2009; Mostowska *et al.*, 2012). Já ratos com mutações no *Msx2*, têm defeitos na morfogênese das cúspides, na formação da raiz e na diferenciação do órgão do esmalte (Satokata e Maas, 1994; Thesleff, 1996; Maas e Bei, 1997).

A família de genes PAX, que engloba um grupo de fatores de transcrição que atuam durante o início do desenvolvimento do embrião está envolvida na formação do palato e dos dentes sendo o PAX9 expresso no mesênquima derivado da crista neural dos arcos mandibular e maxilar (Klein *et al.*, 2005). Experimentos com ratos em que o gene *Pax9* foi deletado, a odontogênese dos molares apresentou-se interrompida na fase de botão (Strachan e Read, 1994; Maas e Bei, 1997). Recentemente também foi demonstrado que mutação no gene PAX9 está associado com a oligodontia em humanos, afetando principalmente os dentes posteriores da dentição permanente (Stockton *et al.*, 2000).

Os fatores de transcrição do grupo DLX (Distal-less homeobox) são representados pelo *Dlx1*, *Dlx2*, *Dlx3*, *Dlx5*, *Dlx6* e *Dlx7* e são expressos nos processos mandibulares e maxilares. Pesquisas têm demonstrado que mutações e inativações destes genes, têm sido associadas com as alterações de esmalte como hipoplasia (Price *et al.*, 1998) e alterações na maturação do esmalte (Depew *et al.*, 1999).

Outro fator de transcrição importante na odontogênese é o LEF (lymphoid enhancer-binding factor 1) sendo o LEF1 expresso em germes dentais. Estudos sugerem papel importante do *Lef1* na formação de vários órgãos e estruturas incluindo os dentes (Travis *et al.*, 1991; Milatovich *et al.*, 1991; Vangenderen, *et al.*, 1994; Zhou *et al.*, 1995). Pesquisas demonstraram que em ratos mutantes para *Lef1*, apesar do desenvolvimento do dente ser iniciado, o mesmo é interrompido antes da formação da papila dental gerando perda dentária. Já a super-expressão forçada de *Lef1* em células ectodermis de ratos transgênicos resultou em formação aberrante de estruturas parecidas com dentes na região do sulco labial (Zhou *et al.*,

1995; Kratochwil *et al.*, 1996).

Outro fator de transcrição bastante reconhecido é o Runx2, o qual é expresso na papila e folículo dentários, participando na diferenciação dos odontoblastos e na manutenção do funcionamento dos componentes do ligamento periodontal (Camilleri e McDonald, 2006). Fatores de crescimento como as proteínas morfogenéticas do osso (BMPs) também apresentam papel importante na odontogênese (Maas e Bei, 1997; Thesleff, 1995). É sabido que as BMPs atuam nas fases de iniciação e morfogênese dos dentes (Silva e Alves, 2008), bem como no desenvolvimento do ectomesênquima (Berkovitz *et al.*, 2004). Maas e Bei (1997) demonstraram que a expressão da BMP-2 apresenta forte correlação com o gene Msx2 na formação dos dentes, de maneira que pode haver uma regulação recíproca entre eles. As moléculas da família FGF induzem a proliferação do epitélio e do ectomesênquima tendo várias de suas funções desempenhadas em associação aos fatores BMP. Por último, os EGFs constituem agentes mitógenos, responsáveis por estimular ou manter a proliferação de células indiferenciadas de origem ectodérmica, mesodérmica e endodérmica (Silva e Alves 2008).

Além da odontogênese ser regulada por fatores genéticos (Nanci, 2014), os fatores sistêmicos e locais, incluindo os fatores hormonais, dentre eles os hormônios tireoidianos, são também essenciais no desenvolvimento do dente, bem como no processo de erupção dentária (Bochukova *et al.*, 2012; Bassett *et al.*, 2014).

3.3 Disfunções tireoidianas e alterações dentárias e periodontais

Os hormônios tireoidianos (HT), representados pela triiodotironina (T3) e pela tiroxina (T4), são essenciais para a formação, crescimento e funções metabólicas de vários órgãos e sistemas teciduais, incluindo tecidos mineralizados, como os ossos e os dentes (Pinto e Glick, 2002; Bassett e Williams, 2003; Bochukova *et al.*, 2012; Bassett *et al.*, 2014).

A T_4 e a T_3 são assim denominadas devido a quantidade de iodo presente em sua molécula. Cada molécula de T_4 apresenta quatro iodios e a T_3 apresenta três iodios por molécula. A síntese dos hormônios tireoidianos é dependente do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide; o hormônio liberador de tirotrófina (TRH), produzido pelo hipotálamo, atua em receptores específicos de membrana presentes nos tireotrófos da hipófise estimulando a transcrição gênica e a secreção do hormônio tireotrófico (TSH) (Nunes, 2003). O TSH é o principal regulador da função da tireoide, pois interage com os receptores presentes na membrana da célula folicular tireoidiana, induzindo a expressão de proteínas envolvidas na biossíntese dos HTs, com aumento na atividade celular e consequente secreção hormonal (Bassett e Williams, 2003; Nunes, 2003).

A tiroxina é o principal hormônio secretado pela tireoide; entretanto, a T_3 é o hormônio mais ativo, uma vez que possui maior afinidade pelos receptores nucleares tireoidianos (TRs), os quais medeiam a maioria das ações desses hormônios (Flamant e Samarut, 2003). A conversão da T_4 em T_3 nos tecidos alvos é catalisada por uma selenioproteína denominada iodotironina desidase, a qual apresenta três isoformas, a tipo I (D1), a tipo II (D2) e a tipo III (D3), codificadas por diferentes genes (Bianco *et al.*, 2002; Bassett e Williams, 2003). As desidases são divididas em duas classes, as ativadoras (D1e D2) e as inativadoras (D3 e D1) dos hormônios tireoidianos (Kuiper *et al.*, 2005).

Uma vez liberada na circulação, a tiroxina é carregada por proteínas transportadoras, como a globulina de ligação à tiroxina, a transtirretina e a albumina do soro (Boelaert e Franklin, 2005; Pascual e Aranda, 2013). Sabe-se que os HT modulam o desenvolvimento dos vários órgãos por atuarem diretamente por meio de receptores nucleares específicos denominados $TR\alpha$ e $TR\beta$ (Wojcicka *et al.*, 2013). Estes receptores são codificados pelos genes $TR\alpha$ e $TR\beta$, respectivamente, e são fatores de transcrição modulados pelo ligante, que atuam diretamente em sequências específicas do DNA, denominadas elementos responsivos ao hormônio, que ativam ou suprimem a expressão gênica (Sap *et al.*, 1986; Adams *et al.*, 2007). Assim,

variações nos níveis séricos dos HT, como acontecem no hipo e no hipertireoidismo, podem resultar em um série de alterações incluindo os distúrbios cranioorofaciais (Waung *et al.*, 2012; Wojcicka *et al.*, 2013; Bassett e Williams, 2018).

O hipotireoidismo é uma disfunção que se caracteriza pela produção insuficiente dos hormônios da tireoide, que pode advir da deficiência na síntese dos HT ou da resistência a ação dos mesmos (Castro e Soares, 2014) Já o hipertireoidismo é uma síndrome na qual os tecidos são expostos a uma quantidade excessiva de hormônios tireoidianos tendo como principais causas a doença de Graves, uma condição autoimune onde ocorre hiperestimulação dos receptores de tireotropina por auto-anticorpos; nódulos funcionais na tireoide, os quais produzem quantidades excessivas de hormônios tireoidianos e algumas formas de tireoidites (Cooper, 2003). Dependendo dos níveis de hormônios circulantes, os indivíduos podem apresentar uma variedade de sintomas clínicos (Trzepacz *et al.*, 1989).

As disfunções tireoidianas podem ocorrer em qualquer fase da vida, mas são comuns durante a gestação. Como a tireoide fetal não está funcionalmente madura até 18 a 20 semanas de idade gestacional nos humanos (Greenberg *et al.*, 1970; Thorpe-Beeston *et al.*, 1991) e até 17º dia de gestação no rato, a disfunção tireoidiana materna pode afetar o estágio inicial de desenvolvimento da prole, uma vez que o feto é dependente da transferência placentária dos hormônios tireoidianos maternos (Greenberg *et al.*, 1970; Thorpe-Beeston *et al.*, 1991).

O hipotireoidismo materno apresenta incidência mais elevada quando comparada ao hipertireoidismo materno com frequência estimada de 0,3% a 25% sendo comumente causado pela tireoidite autoimune (Costa *et al.*, 2004). Já o hipertireoidismo materno tem incidência estimada de 0,2%, podendo chegar até 2,5% quando são considerados os casos de hipertireoidismo materno subclínico (Taylor *et al.*, 2018). As duas principais causas de hipertireoidismo durante a gestação são a doença de Graves e a tireotoxicose transitória gestacional (Krassas *et al.*, 2010; Bártholo *et al.*, 2014). Assim, o hipertireoidismo materno pode levar ao

desenvolvimento fetal anormal, uma vez que os tecidos fetais são expostos a quantidades excessivas de hormônios tireoidianos (Cooper, 2003) que podem prejudicar a capacidade do feto e do neonato em regular seus níveis de TSH e de T₄ (Patel *et al.*, 2011). Nesta condição, pode ocorrer morte intra-uterina, aborto espontâneo, parto prematuro, baixo peso ao nascimento (Millar *et al.*, 1994; Phoojaroenchanachai *et al.*, 2001; Mestman, 2004; Medici *et al.*, 2013) e alteração da maturidade óssea (Segni *et al.*, 1999; Polak *et al.*, 2006) incluindo os ossos da mandíbula e maxila. Além disso, o hipertireoidismo materno pode ocasionar hipertireoidismo transitório fetal e neonatal, os quais são causados pela passagem de anticorpos tireoestimulantes da mãe com doença de Graves para o feto. Essa alteração geralmente ocorre em 1% dos neonatos de mães com hipertireoidismo (Péter e Muzsnai, 2011). Embora raros, os casos de hipertireoidismo congênito persistente também têm sido descritos por alterações genéticas e hereditárias do receptor para tireotropina (Polak *et al.*, 2006).

Apesar de ambas as condições serem relevantes, uma vez que os distúrbios maternos funcionais da tireoide são causas de alterações ósseas na prole (Ribeiro *et al.*, 2018a; Ribeiro *et al.*, 2018b; Milošević *et al.*, 2018), incluindo nos ossos do crânio, mandíbula e maxila (Bedi e Brook, 1984; Ferrazo *et al.*, 2014), pouco se sabe sobre seus efeitos na formação e no desenvolvimento dos dentes e do periodonto. A dentina e o cemento por serem variantes do tecido ósseo, são responsivos a vários fatores sistêmicos que também atuam no osso. Assim, acredita-se que esses componentes do dente também apresentariam alterações frente às disfunções tireoidianas, à semelhança do que tem sido publicado no esqueleto de animais em crescimento submetidos às disfunções tireoidianas maternas no período pré- e pós-natal (Ribeiro *et al.*, 2018a; Ribeiro *et al.*, 2018b).

O que se sabe é que as disfunções tireoidianas congênitas ou adquiridas após a erupção dentária, influenciam a morfologia do dente, a velocidade de erupção dos mesmos e a predisposição à caries e às doenças periodontais, respectivamente (Ikeda *et al.*, 2008, Chandna e Bathla, 2011; Nanci, 2014).

No hipotireoidismo congênito as manifestações orais mais comuns são lábios grossos, macroglossia, maloclusão e atraso na erupção dentária de ambas as dentições (Loevy *et al.*, 1987). Também já foram descritos a presença de má-oclusão, câmaras pulpares amplas, hipoplasia do esmalte, presença de lesões periapicais, prognatismo mandibular, aumento da susceptibilidade à cárie e a periodontite (Atienza *et al.*, 2012; Gupta *et al.*, 2014) e perda óssea alveolar (Yussif *et al.*, 2017). No hipotireoidismo adquirido após a erupção dentária, observaram-se retardo da erupção o que leva à retenção prolongada de dentes decíduos e impactação de dentes permanentes, resultando em má oclusão e variações na mineralização do esmalte decíduo, respectivamente (Norén, 1983; Norén e Aim, 1983). Em roedores, estudos apontaram que ratos hipotireoideos adultos apresentaram aumento da incidência e da extensão de cáries; achados revertidos quando os ratos foram tratados com tiroxina (Bixler e Muhler, 1957; Haldi *et al.*, 1962; Xhonga e Van Herle, 1973). Guimarães *et al.*, 2004 relataram que o hipotireoidismo induzido em ratos após a erupção dentária reduziu a porcentagem de células da polpa dentária e a espessura da camada de odontoblastos, porém houve aumento da espessura da camada de dentina com formação de dentina reacional e necrose.

No hipertireoidismo congênito ou adquirido após a erupção dos dentes, ocorre erupção dentária acelerada, aumento da suscetibilidade a cáries e às doenças periodontais, respectivamente (Poumpros *et al.*, 1994). Em ratos, Guimarães *et al.*, 2004 demonstraram que o hipertireoidismo quando induzido em ratos durante a erupção dos dentes molares, alterou a morfologia dentária, acelerando o desenvolvimento das raízes, mas não alterou o dente incisivo de ratas tratadas com tiroxina após a erupção.

Resultados preliminares desta equipe de pesquisa demonstraram, por histomorfometria, que o hipertireoidismo materno em ratas resulta em redução significativa da formação e do crescimento ósseo endocondral na prole ao

nascimento e ao desmame (Maia *et al.*, 2016) mas pouco se sabe sobre os efeitos das disfunções tireoidianas maternas sobre periodonto da prole.

3.4. O rato como modelo para doenças dentárias humanas

O hábito alimentar de cada espécie reflete na sua dentição no que diz respeito aos padrões de crescimento e no número de dentes. A espécie humana apresenta em média, 32 dentes sendo oito incisivos, quatro caninos, oito pré-molares e doze molares (incluindo os quatro dentes do siso). O rato possui dentição única, com 16 dentes, sendo 4 incisivos e 12 molares (Dammaschke 2010).

Quanto ao número de substituições dentárias ao longo da vida, os humanos são classificados como *difiodontes*, pois possuem apenas duas gerações de dentes; dentes decíduos e os dentes permanentes. Os roedores, por apresentarem dentes que são substituídos continuamente, são classificados como *polifiodontes*. Tanto o homem como o rato, são classificados como *tecodontes* pois possuem dentes fixados na maxila e mandíbula através de raízes (Kardong, 2010) e como *heterodontes*, pois apresentam, no mesmo animal, dentes com características morfológicas distintas (Dangelo e Fattini, 2007; Kardong, 2010; Thomaz *et al.*, 2006). Quanto ao crescimento dos dentes após erupção, o homem é classificado como *braquiodonte*, possuem dentes com coroa baixa, e os ratos são *hipsodontes*, por apresentam dentes com coroa desenvolvida (Thomaz *et al.*, 2006).

As dentições humana e do rato, possuem semelhanças e diferenças, contudo o rato pode ser utilizado como modelo para o estudo de doenças dentárias humanas. Segundo Dammaschke (2010), os incisivos dos roedores por possuírem crescimento permanente não podem ser comparados aos dentes humanos. Entretanto, os dentes molares dos ratos possuem desenvolvimento análogo ao dos dentes molares humanos com características anatômicas, histológicas, biológicas e fisiológicas semelhantes. Assim, os resultados de pesquisas realizadas em dentes molares de ratos têm sido extrapolados para seres humanos e para outras espécies.

4. MATERIAL E METODOS

4.1 Infraestrutura utilizada

Foram utilizados os Laboratórios de Histopatologia e de Experimentação Animal do Complexo de Pesquisa Avançada em Medicina Veterinária da Escola de Veterinária da UFMG. Os procedimentos adotados no projeto, foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG (protocolo: 156/2020).

4.2 Acasalamento e administração de tiroxina para indução do hipertireoidismo materno

Foram utilizadas 10 ratas Wistar com dois meses de idade, que foram alojadas em caixas plásticas coletivas (5 ratas/caixa) e recebendo ração comercial e água *ad libitum*. As ratas foram mantidas em ambiente controlado, sob regime de 12 horas de luz e 12 horas de escuro e em temperatura de 18-22°C, durante todo o ensaio experimental. Após adaptação de uma semana, todas as fêmeas foram submetidas diariamente à citologia vaginal para determinar a fase do ciclo estral. As ratas em proestro e estro foram alojadas em caixas plásticas com ratos adultos por 12 horas numa proporção de três fêmeas para cada macho. O dia em que foi detectada a presença de espermatozoides na citologia vaginal, foi considerado dia 0 de gestação, e as ratas foram separadas em caixas individuais compondo o grupo tratado (n=5) e o grupo controle (n=5). As ratas tratadas receberam a administração diária de L-tiroxina (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA), por sonda oro-gástrica, na dose de 50 µg/animal/dia, diluída em 5 mL de água destilada de acordo com protocolos previamente estabelecidos (Serakides *et al.*, 2004, 2008; Ribeiro *et al.*, 2018a) por todo período da gestação e da lactação. As fêmeas do grupo controle

receberam o mesmo volume de água destilada, por sonda oro-gástrica, durante todo o período experimental.

Três dias após o nascimento, foram selecionados, aleatoriamente, três neonatos de cada mãe. O restante dos filhotes foi amamentado pelas mães controle e hipertireoideas até o desmame com 21 dias. No dia do desmame, foram selecionados aleatoriamente três filhotes por mãe, totalizando 4 grupos experimentais: 1) neonatos filhos de mães controle; 2) neonatos filhos de mães hipertireoideas; 3) filhotes ao desmame de mães controle e 4) filhotes ao desmame de mães hipertireoideas. A eutanásia dos animais foi realizada por sobredose anestésica com quetamina (120 mg/Kg) e xilazina (30 mg/Kg) via intraperitoneal (Figura 7).

As carcaças e vísceras dos animais foram recolhidas e incineradas por empresa particular contratada pelo Hospital Veterinário. A mesma empresa que recolhe todas as carcaças e vísceras dos animais necropsiados pelo Setor de Patologia do Hospital Veterinário da UFMG.

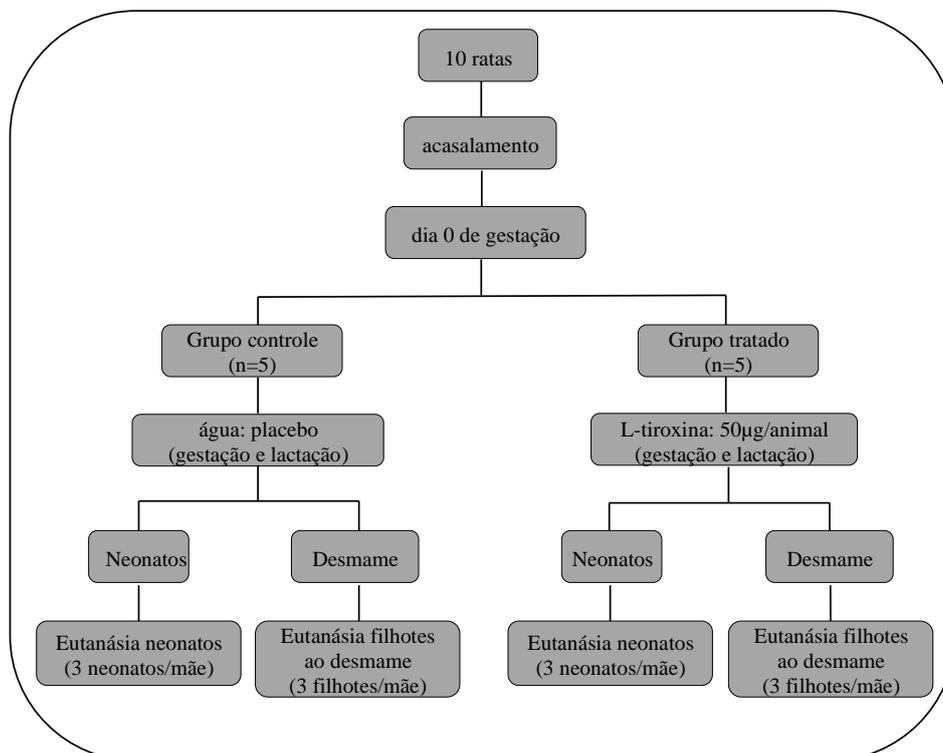


Figura 7. Organograma do manejo reprodutivo, indução do hipertireoidismo e seleção da prole nos grupos controle e tratado com L-tiroxina.

4.3 Confirmação do hipertireoidismo materno e histomorfomea das tireoides da prole

No dia da eutanásia da prole ao desmame, foi colhido o sangue das mães por punção cardíaca em tubos contendo heparina seguido de centrifugação para obtenção do plasma que foi armazenado a -20°C para dosagem de T4 livre. Foi realizada a técnica de quimioluminescência (IMMULITE, Siemens Medical Solutions Diagnostics, Malvern, PA, EUA) (sensibilidade: 0,4 ng/dL) em sistema totalmente automático (Serakides *et al.*, 2004; Serakides *et al.*, 2008).

Na prole, tanto ao nascimento quanto ao desmame, a comprovação do efeito do excesso de hormônios tireoidianos maternos sobre eles, foi feita pela análise morfométrica da tireóide. As tireoides foram dissecadas, fixadas em formalina 10% neutra e tamponada com fosfato de sódio monobásico e dibásico e processadas de acordo com a técnica rotineira de inclusão em parafina. Secções histológicas de $4\mu\text{m}$ foram coradas pela técnica da hematoxilina-eosina para avaliação morfométrica. A altura do epitélio foi mensurada em 20 folículos. Em cada folículo, foram mensurados quatro pontos distintos e equidistantes, obtendo-se o valor médio das quatro medidas. Esta mensuração foi realizada com auxílio de uma ocular micrométrica com régua acoplada ao microscópio em objetiva de 100x. Os valores obtidos para altura do epitélio foram transformados em micrômetro, utilizando-se a escala de uma lâmina micrométrica (Serakides *et al.*, 2000).

4.4 Processamento histopatológico e histomorfometria dentária e periodontal

As mandíbulas e maxilas, foram conservadas em solução de formol à 10% diluído e tamponado com solução de sódio dibásica e monobásica e posteriormente,

submetidas ao processo de descalcificação, por meio da imersão em solução de ácido fórmico à 24%, com duas trocas semanais da solução. Após completa desmineralização, os ossos foram lavados em água corrente por aproximadamente 24 horas. Foram realizadas secções transversais, abaixo da região ocular, região dos dentes molares (Figura 8). Os molares serão escolhidos por apresentar crescimento limitado semelhante ao dente humano possibilitando extrapolar os resultados para o homem. (Dammaschke, 2010)

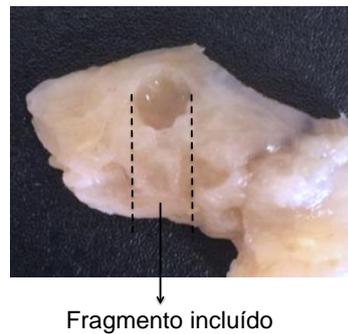


Figura 8. Visão macroscópica da cabeça do rato (Neonato). mostrando a região da mandíbula e maxila a ser processada para visualização dos dentes molares. A linha tracejada (esquerda) indica o plano frontal de corte. A localização de germes molares é indicada pela linha dos olhos. (Fonte: Arquivo pessoal).

Os fragmentos foram desidratados em álcool 70%,80%,90% e absoluto, diafanizados em xilol e posteriormente incluídos em parafina. Secções de 4,0µm foram obtidas e coradas pela Hematoxilina e Eosina (HE). As alterações histológicas foram avaliadas com relação à morfologia dos constituintes e das regiões do dente. Nos neonatos, na região correspondente à coroa dentária, foi realizada a mensuração da espessura das camadas de ameloblastos, do esmalte, dentina, pré-dentina e de odontoblastos (Figura 9). Na região correspondente á raiz dentária, foi realizada a mensuração da espessura das camadas de dentina, pré-dentina e de odontoblastos (Figura 9). As mensurações foram realizadas em 20 pontos ao longo de cada camada utilizando uma régua e objetiva de 40×. Nos dentes dos animais ao desmame, a espessura das camadas de dentina, pré-dentina e de odontoblastos (Figura 10) foi realizada em 25 pontos ao longo de cada camada

utilizando uma régua e objetiva de 40×. Ao final, foi aplicado às médias, um fator de correção obtido pela escala de uma lâmina micrométrica e os resultados foram expressos em micrômetros.

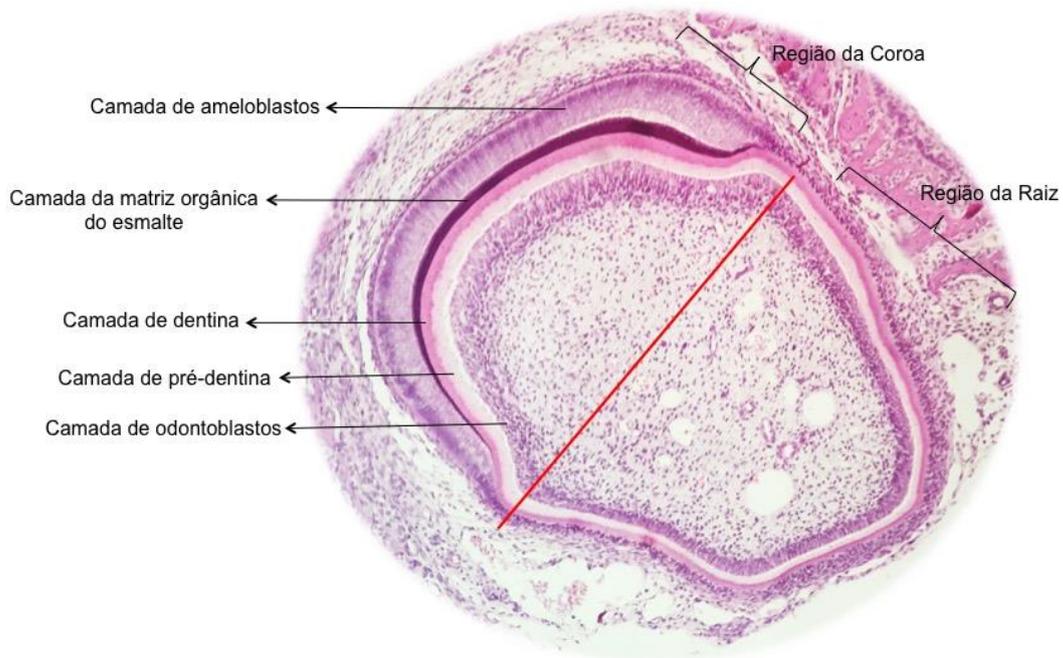


Figura 9. Dente de rato neonato mostrando as camadas a serem mensuradas e as regiões de coroa e raiz. (Fonte: Arquivo pessoal)

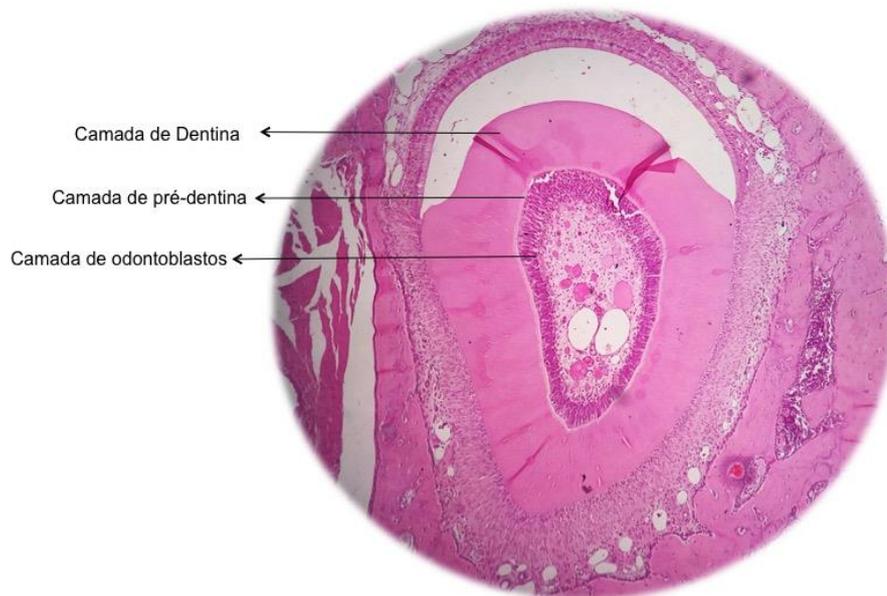


Figura 10. Dente de rato ao desmame mostrando as camadas a serem mensuradas. (Fonte: Arquivo pessoal)

O ligamento periodontal foi avaliado quanto à morfologia e espessura. A espessura foi realizada em 50 pontos ao longo do ligamento utilizando uma régua e objetiva de 40 \times . Ao final, foi aplicado às médias, um fator de correção obtido pela escala de uma lâmina micrométrica e os resultados foram expressos em micrômetros. Em cada secção histológica o tecido ósseo alveolar foi avaliado quanto à morfologia.

4.5 Análise estatística

O delineamento foi inteiramente ao acaso e para cada variável foram determinados a média e o desvio padrão. Os dados foram submetidos ao teste t de Student para comparação das médias. Os dados passaram pelos testes de normalidade (Shapiro-Wilk). Para as análises foi utilizado o software GraphPad Prism 8.0.2 e as diferenças foram consideradas significativas se $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Concentração plasmática de T₄ livre e histomorfometria da tireoide

O tratamento com tiroxina elevou significativamente as concentrações plasmáticas de T₄ livre nas ratas tratadas quando comparadas com as ratas do grupo controle (Figura 11). Além disso, as ratas tratadas com L-tiroxina exibiram sinais clínicos caracterizados por hiperatividade e agressividade.

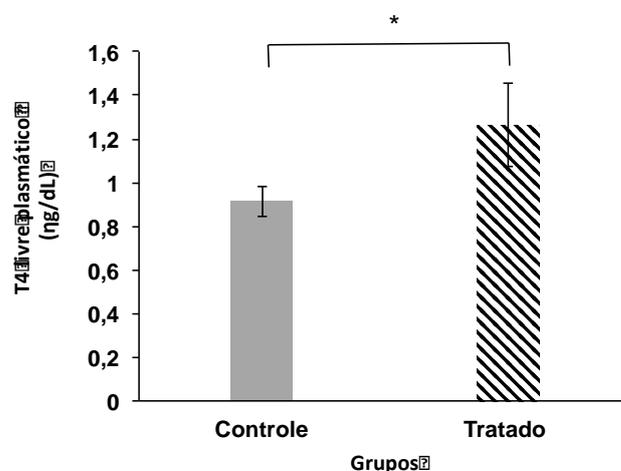


Figura 11. Concentrações plasmáticas de T₄ livre (média±SD) de ratas controle e tratadas com L-tiroxina *(p<0,05).

As tireoides dos neonatos e dos ratos ao desmame apresentaram folículos variando de redondos a ovais e com diâmetros variados. No grupo controle, os folículos eram revestidos por epitélio predominantemente cuboidal e preenchidos por coloide denso e por vezes vacuolizado, enquanto que nos filhotes das ratas tratadas com L-tiroxina, foram observados diversos folículos revestidos predominantemente por epitélio achatado. Pela morfometria, não foram observadas diferenças significativas no diâmetro dos folículos entre os grupos tratados e controle (Figura 12). No entanto, os neonatos e os ratos com 21 dias de idade dos grupos tratados, apresentaram redução significativa da altura do epitélio folicular quando comparados com o grupo controle da mesma idade (Figura 12).

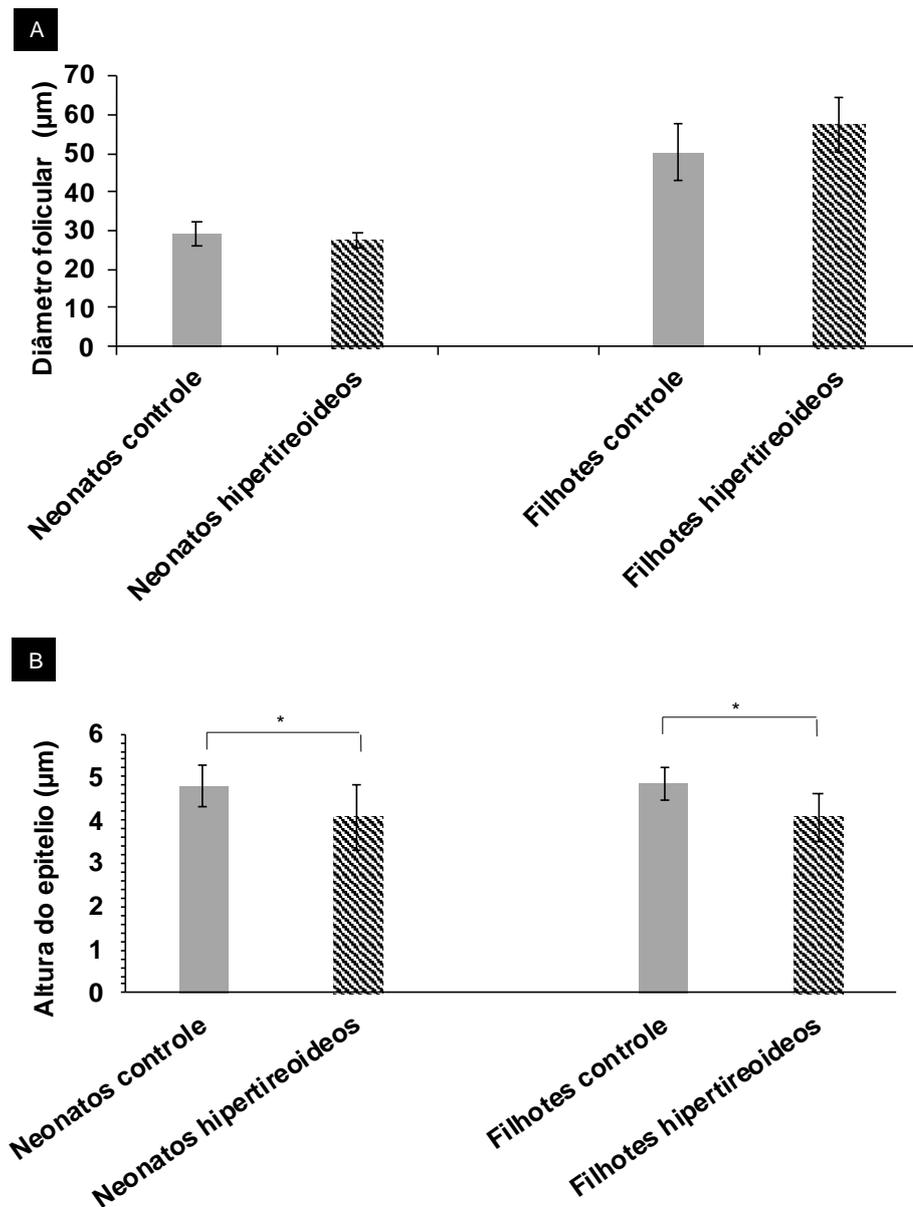


Figura 12. Histomorfometria da tireoide (média±SD) dos neonatos e ratos com 21 dias de idade, filhos de mães controle e tratadas com L-tiroxina. A) Diâmetro folicular (µm) semelhante entre grupos ($p>0,05$). B) Redução da altura do epitélio folicular (µm) da tireoide dos neonatos e dos ratos com 21 dias de idade do grupo tratado em comparação ao controle ($P<0,05$).

Histomorfometricamente, os dentes dos neonatos dos grupos controle e hipertireoideo foram semelhantes. Em ambos os grupos, os odontoblastos se organizam como uma única camada contínua de células polarizadas em paliçada

localizada entre a polpa dentária e a camada de pré-dentina/dentina (Figura 13). A espessura da camada de odontoblastos variou conforme a região do dente, sendo mais espessa próximo a região da coroa quando comparada a região da raiz, em ambos os grupos e não houve diferença significativa na espessura desta camada entre grupos tanto na região da coroa (Figura 14) quanto na região da raiz (Figura 15).

A camada de dentina e pré-dentina apresentaram espessura semelhante entre grupos e foram mais espessas na região da coroa quando comparada a região da raiz dentro do mesmo grupo. Não houve diferença significativa na espessura desta camada entre grupos tanto na região da coroa (Figura 14) quanto na região da raiz (Figura 15). A matriz orgânica do esmalte era acelular e apresentou espessura semelhante entre grupos (Figura 14). Semelhante ao observado nas camadas anteriores, não houve diferença significativa na espessura desta camada entre grupos (Figura 14). A camada de ameloblastos era contínua composta por células cilíndricas longas com núcleo polarizado em forma de paliçada (Figura 13). Também não houve diferença significativa na espessura desta camada entre grupos (Figura 14).

Em ambos os grupos, a polpa dentária exibia características semelhantes. A cavidade pulpar era ampla e constituída por tecido conjuntivo frouxo, quantidade moderada de fibroblastos e fibras colágenas. Apresentava-se ricamente vascularizada com vasos sanguíneos de calibre heterogêneo que se organizavam mais próximos da região apical (raiz) do dente.

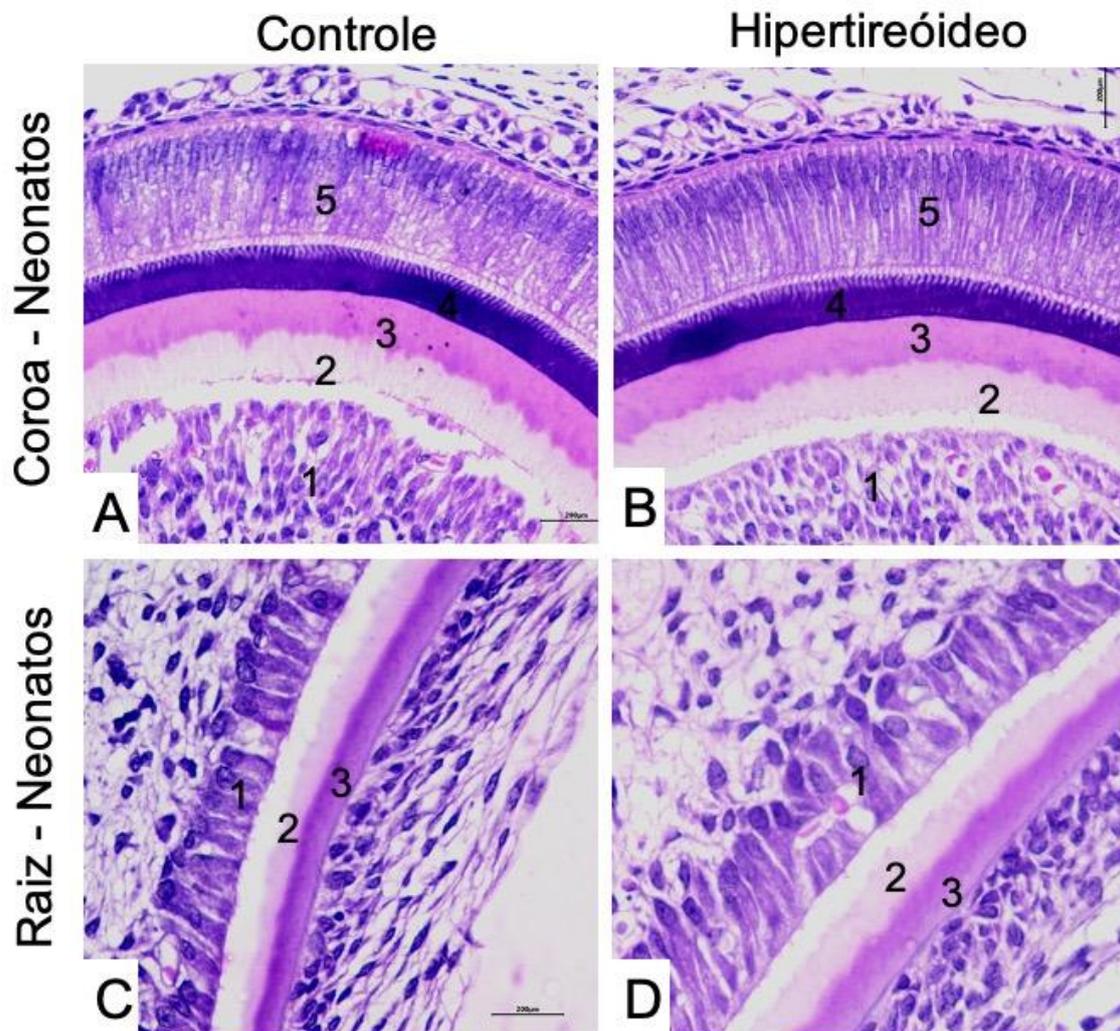


Figura 13. Fotomicrografia dos dentes dos neonatos de mães controle e de mães hipertireoideas das regiões de coroa e raiz. 1 - Camada de odontoblastos; 2 Camada de pré-dentina; 3 - Camada de dentina; 4 - Camada de matriz orgânica do esmalte e 5 - Camada de ameloblastos. H&E.

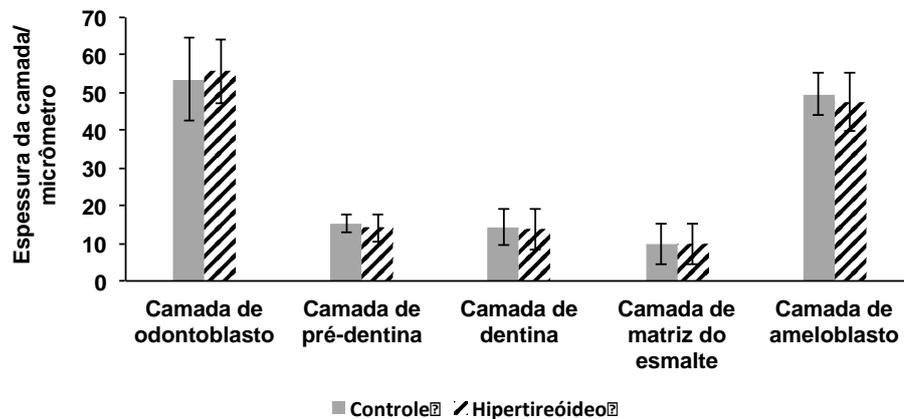


Figura. 14. Média e desvio padrão (média±SD) da espessura das camadas (região de coroa) dos dentes de neonatos de mães controle e de mães hipertireóideas.

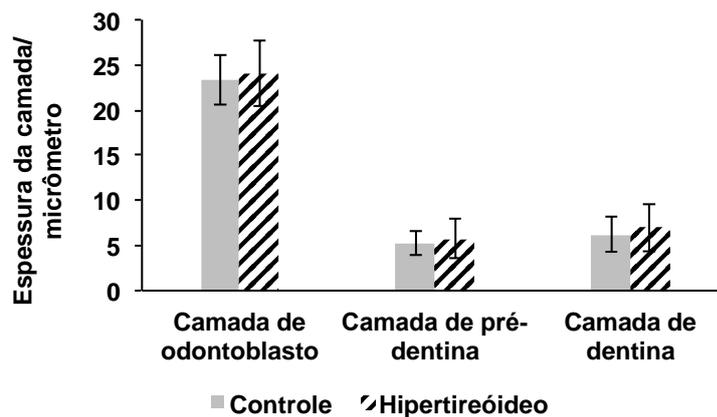


Figura. 15. Média e desvio padrão (média±SD) da espessura das camadas (região de raiz) dos dentes de neonatos de mães controle e de mães hipertireóideas.

Nos animais de 21 dias, em ambos os grupos, os odontoblastos se organizavam como uma única camada de células polarizadas em paliçada (Figura 16). O grupo hipertireóideo apresentou a camada de odontoblastos significativamente menos espessa quando comparada a do grupo controle (Figura 17). O mesmo foi observado na camada de pré-dentina que foi significativamente menor nos filhotes das mães que receberam tiroxina quando comparada a dos filhotes das mães

controle (Figura 17). Já a camada de dentina não apresentou diferença entre grupos (Figura 17).

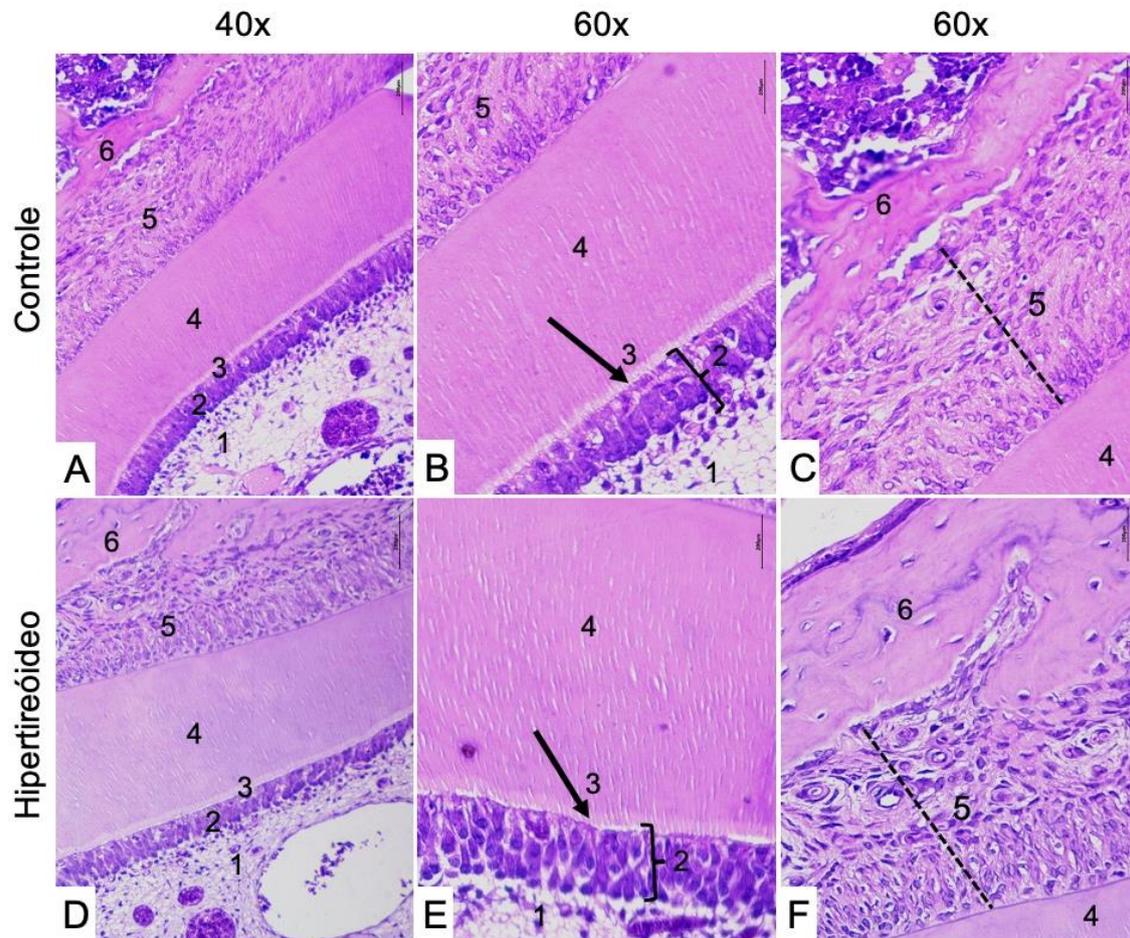


Figura 16. Fotomicrografia dos dentes dos filhotes com 21 dias de mães controle e de mães hipertireóideas. 1: Polpa dentária; 2: Camada de odontoblastos; 3: Camada de pré-dentina; 4: Camada dentina; 5: Ligamento periodontal e 6: Osso alveolar. H&E.

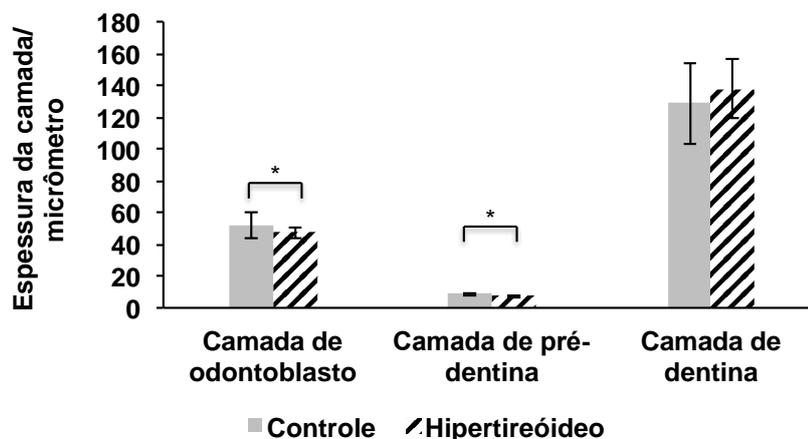


Figura 17. Média e desvio padrão (média±SD) da espessura das camadas dos dentes de filhotes com 21 dias de mães controle e de mães hipertireóideas. * $p < 0,05$.

Em ambos os grupos, a polpa dentária exibia características semelhantes e se encontrava dentro de uma cavidade pulpar mais delgada quando comparada a cavidade pulpar dos neonatos (Figura 18A e C). A polpa era composta predominantemente por fibroblastos, vasos sanguíneos e nervos. Quanto ao peridonto de sustentação, foi possível avaliar o ligamento periodontal e o osso alveolar. O cemento não foi avaliado devido a descalcificação das amostras. O ligamento periodontal, em ambos os grupos, era formado por tecido conjuntivo frouxo, altamente vascularizado e celular, que circundava as raízes dentárias e foi significativamente mais espesso nos filhotes das mães que recebem tiroxina quando comparado aos filhotes das mães controle (Figuras 16 C e F; 19). O osso alveolar, tanto no grupo controle como no grupo dos animais hipertireóideos, era predominantemente trabecular (Figura 18), revestido por osteoblastos cuboidais que se organizavam predominantemente em uma única camada, mas por vezes, áreas de hiperplasia osteoblástica foram observadas. Os osteócitos apresentavam-se ativos com núcleos grandes alojados em lacunas alargadas. Raros osteoclastos foram visualizados.

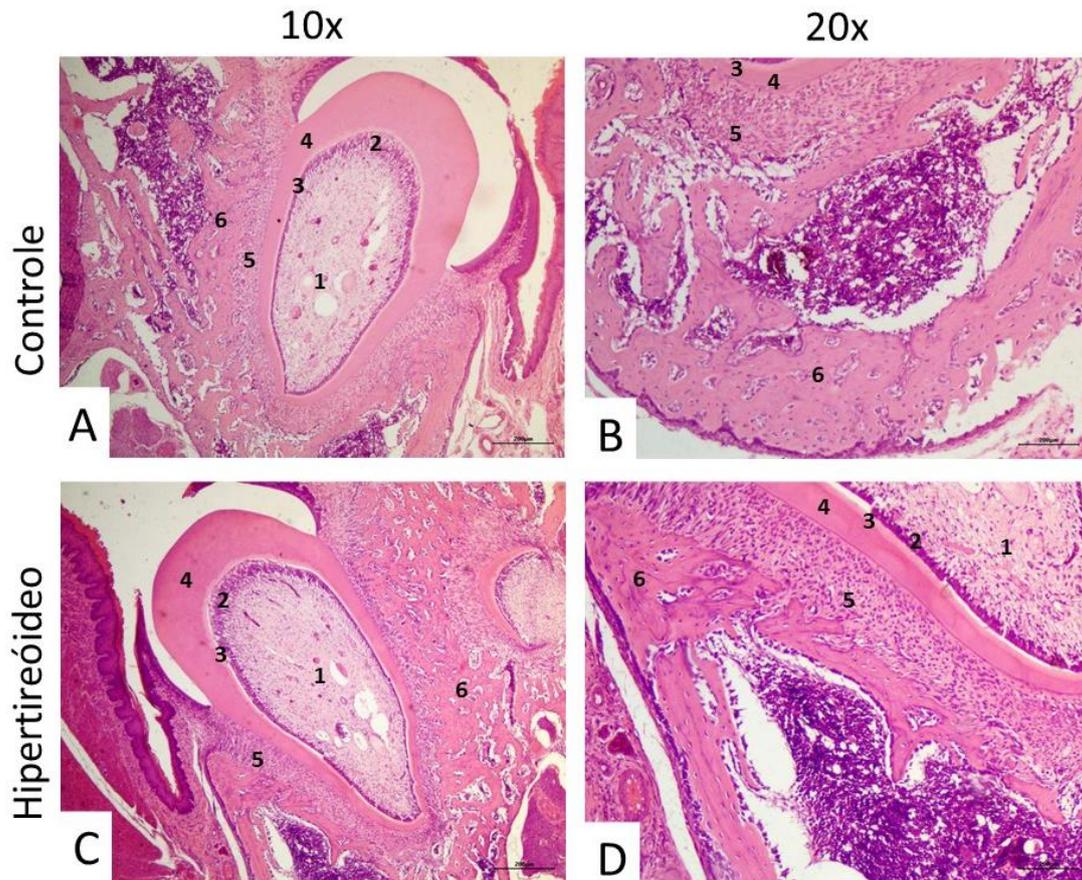


Figura 18. Fotomicrografia dos dentes dos filhotes com 21 dias de mães controle e de mães hipertireóides. 1: Polpa dentária; 2: Camada de odontoblastos; 3: Camada de pré-dentina; 4: Camada dentina; 5: Ligamento periodontal e 6: Osso alveolar. H&E.

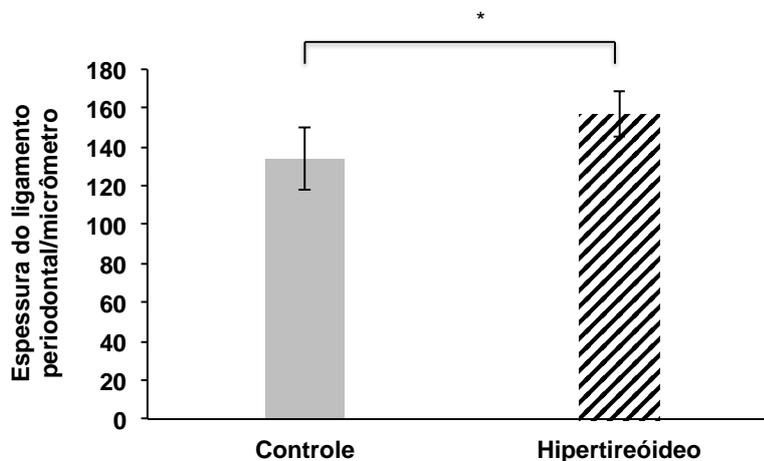


Figura 19. Média e desvio padrão (média±SD) da espessura do ligamento periodontal de filhotes com 21 dias de mães controle e de mães hipertireóides. * $p < 0,05$.

6. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que os efeitos do hipertireoidismo materno se manifestam somente no período pós-natal, ou seja, ao desmame, quando há diminuição da espessura das camadas de odontoblastos e pré-dentina e aumento da espessura do ligamento periodontal da prole de ratos.

A indução do hipertireoidismo materno foi comprovada pelo aumento significativo da concentração plasmática de T_4 livre nas mães tratadas com L-tiroxina associado a sintomatologia de agressividade das ratas.

A influência da administração materna de tiroxina sobre a prole foi avaliada mediante histomorfometria das tireoides dos neonatos e dos filhotes uma vez que, nos neonatos, o volume sanguíneo possível de ser colhido é insuficiente para realização de dosagem hormonal. Esta mesma metodologia foi utilizada por outros autores (Ribeiro *et al.*, 2018a). O excesso de tiroxina materna teve efeito sobre o epitélio da tireoide dos neonatos e dos ratos ao desmame, uma vez que esses animais apresentaram folículos com epitélio significativamente mais baixo em comparação ao controle demonstrando o efeito de feedback negativo do excesso de tiroxina materna sobre a tireoide da prole. O feedback negativo se deve pela

passagem do excesso de tiroxina materna para o feto reduzindo os níveis de TSH e consequentemente reduzindo a altura do epitélio dos folículos tireoidianos, uma vez que a redução do TSH tem efeito inibitório sobre a tireoide (Ahmed *et al.*, 2010). Assim, a altura do epitélio folicular é uma característica sensível para avaliar as alterações da função glandular (Serakides *et al.*, 1999; Serakides *et al.*, 2000) uma vez que a morfologia da tireoide está intimamente relacionada à atividade funcional da glândula (Delverdier *et al.*, 1991).

O hipertireoidismo fetal como consequência do hipertireoidismo materno é pouco frequente (Ogilvy-Stuart, 2002; Péter e Muzsnai, 2011) entretanto, podem ocorrer alterações na morfologia da tireoide fetal pela redução de TSH na prole, com consequente perda do efeito estimulador deste hormônio na tireoide (Ahmed *et al.*, 2010). Hipertireoidismo neonatal pode ser decorrente do excesso de tiroxina materna (dependendo da dose administrada) havendo atrofia da tireoide e diminuição do tamanho e número de folículos e achatamento do epitélio folicular (Ahmed *et al.*, 2010). Além disso, a exposição do sistema hipotálamo-hipófise-tireoide fetal às concentrações elevadas de tiroxina materna, mesmo na ausência de hipertireoidismo no feto, pode prejudicar a maturação fisiológica da glândula fetal, porque há contínua diminuição da relação T_4 e TSH durante o desenvolvimento (Fisher *et al.*, 2000). Levando-se em consideração os resultados do presente estudo, não se pode confirmar que ocorreu hipertireoidismo na prole, entretanto, com base nos achados histomorfométricos das tireoides, pode-se atestar que excesso de tiroxina materna atuou sobre a tireoide dos neonatos e dos ratos ao desmame devido a transferência passiva de tiroxina materna através da placenta e do leite.

A escolha do rato como modelo para o estudo do hipertireoidismo materno na odontogênese da prole foi devido as semelhanças entre as dentições humana e a deste roedor. Segundo Dammaschke (2010), os incisivos dos roedores por possuírem crescimento permanente não pode ser comparados aos dentes humanos. Entretanto, os dentes molares dos ratos possuem desenvolvimento análogo ao dos dentes molares humanos com características anatômicas, histológicas, biológicas e fisiológicas semelhantes. Assim, os resultados de pesquisas realizadas em dentes

molares de ratos podem ser extrapolados para seres humanos e também para outras espécies animais.

A morfologia dentária observada na prole do grupo controle ao nascimento e ao desmame, foi compatível a descrita na literatura. Nos neonatos foi possível observar as camadas de odontoblastos, dentina, pre-dentina, ameloblastos e matriz orgânica do esmalte. Nos filhotes ao desmame, pode-se observar o dente formado mas ainda com desenvolvimento incompleto das raízes dentárias uma vez que, os dentes molares dos ratos que apresentam 5 a 6 raízes a formação se completa, aproximadamente, aos 70 dias de idade (Martins-Ortiz, 2004) período superior ao que podemos avaliar no presente estudo.

Nos neonatos de ambos os grupos, como esperado, não havia erupção dentária dos molares, pois, a mesma, ocorre nos ratos por volta dos 19, 23 e 35 dias de idade (Hoffman, 1940). Já nos filhotes de 21 dias do grupo controle, havia erupção dos dois primeiros molares semelhante ao que foi observado nos filhotes das mães tratadas com tiroxina. Como a avaliação dentária foi realizada pontual aos 21 dias de idade, não foi possível verificar se houve erupção dentária precoce nos filhotes do grupo tratado quando comparado ao grupo controle. O que se pode afirmar é que não houve atraso na erupção dos dois primeiros molares, uma vez que o resultado desta variável foi semelhante entre os grupos. Para avaliar se o hipertireoidismo materno afeta a velocidade de erupção dos molares, se fazem necessárias análises em períodos seriados iniciando do período neonatal até os 35 a 40 dias de idade.

A análise histomorfométrica dos dentes foi realizada em tecido descalcificado, o que dificultou a visualização e interpretação de algumas camadas principalmente nos filhotes ao desmame. O esmalte e o cimento, por serem camadas com elevado percentual de hidroxiapatita e menor percentual de matriz orgânica na sua constituição, se perdem com o processamento de descalcificação. Por isso, estas camadas não foram avaliadas nos animais ao desmame.

Não foram observadas diferenças entre as camadas avaliadas nos dentes dos neonatos quando comparado aos animais dos grupos controle e tratado com tiroxina. Entretanto, à medida que o desenvolvimento dentário progrediu para as

fases finais de desenvolvimento como as fases de coroa e raiz, observou-se que a espessura das camadas de odontoblastos e pré-dentina foi significativamente mais delgada na prole das mães tratadas com tiroxina.

Os odontoblastos são as células cuja função é sintetizar a matriz da pre-dentina que vai se mineralizando formando a dentina em um processo denominado dentinogênese (Murray *et al.*, 2000). De acordo com os diferentes estágios de maturação, o odontoblasto possui diferentes fenótipos, tais como: pré-odontoblasto, odontoblasto secretório, odontoblasto maduro e odontoblasto envelhecido (Couve *et al.*, 2013). Na fase de pré-odontoblastos, as células são cilíndricas, ricas em organelas e continuam a se alongar à medida que avança para o estágio secretório (Couve, 1986). No estágio secretório, os odontoblastos formam uma camada única de células colunares e secretam o principal componente orgânico da matriz que é o colágeno do tipo I. A matriz vai sendo mineralizada à medida que proteínas não-colagênicas são secretadas, incluindo fosfoproteínas da dentina, a sialofosfoproteína da dentina, proteína da matriz dentinária 1, 2 e 3, osteopontina, sialoproteína óssea, osteonectina e osteocalcina (Arana-Chavez e Massa, 2004). O odontoblasto transforma-se do estágio secretório em maduro quando a formação da coroa está completa e o dente entra em erupção (Couve, 1986; Simon *et al.*, 2009; Bleicher, 2014). Nesta fase, as células diminuem a maquinaria secretória e o seu tamanho. Durante o estágio envelhecido, os odontoblastos estão mais aglomerados e com aparência pseudoestratificada (Couve, 1986; Orimo, 2010). Uma possibilidade que pode ser apontada para tentar explicar a redução da espessura das camadas de odontoblastos e pré-dentina observada nos filhotes das mães tratadas com tiroxina é que o excesso dos hormônios tireoidianos materno pode ter acelerado os estágios secretório e maduro dos odontoblastos. Entretanto, estudos ultraestruturais destes odontoblastos seriam necessários para avaliação das organelas e da atividade secretória destas células.

Sabe-se que o processo de mineralização da matriz ocorre por intermédio da liberação de vesículas secretórias polarizadas presentes na superfície dos

odontoblastos e que, as proteínas não-colagênicas são essenciais para indução e regulação da formação mineral da dentina por possuírem características químicas que permitem exercer funções específicas durante a mineralização do tecido (Anderson, 1995). Os hormônios tireoidianos possuem papel importante tanto na síntese e maturação de colágeno quanto na expressão das proteínas não-colagênicas. Boeloni e colaboradores (2013) ao avaliar o efeito de diferentes concentrações de T3 na diferenciação osteogênica em cultura de células tronco mesenquimais de ratas, observaram maior síntese de fosfatase alcalina, maior síntese e maturação de colágeno quando comparados ao controle. Os HTs estimulam a síntese de uma série de proteínas nos osteoblastos, incluindo a fosfatase alcalina que atua no tecido ósseo contribuindo para a mineralização da matriz, bem como para a síntese e secreção de proteínas como osteocalcina, osteopontina e colágeno (Sato *et al.*, 1987; Allain e McGregor, 1993; Klaushofer *et al.*, 1995; Gouveia, 2004; Boeloni *et al.*, 2013). Entretanto, os efeitos do hipertireoidismo materno sobre o grau de mineralização dos componentes mineralizados do dente da prole não pode ser avaliado devido as amostras terem sido descalcificadas. Análises imunoistoquímicas ou de biologia molecular para avaliação da expressão destas proteínas não-colagênicas são algumas ferramentas que poderão verificar os efeitos do hipertireoidismo maternos sobre a expressão destas proteínas tão importantes na mineralização da matriz dentinária, do esmalte e do cemento. Disfunções endócrinas que alterem a mineralização destas camadas podem predispor a fragilidade dentária na fase adulta.

O ligamento periodontal dos filhotes do grupo hipertireoideo foi significativamente mais espesso em relação ao grupo controle. O ligamento periodontal é formado basicamente por fibras colágenas tipo I e à medida que o dente se forma e ocorre sua erupção (Lanza *et al.*, 2003). Sabe-se que os hormônios tireoidianos são importantes para a síntese e maturação do colágeno (Boeloni *et al.*, 2013) e que, a deficiência dos hormônios tireoidianos acarreta diminuição da síntese de colágeno (Zimmermann *et al.*, 2009), comprometendo os processos de cicatrização de tecidos bucais (Santos *et al.*, 2012). Assim, a maior espessura do ligamento periodontal

observado no grupo tratado com tiroxina pode ter sido decorrente de maior síntese e maturação do colágeno, entretanto, se esta alteração permaneceria após completa erupção dentária e adaptação do dente as cargas funcionais é uma questão que precisa ser melhor estudada, uma vez que a estrutura do ligamento vai se moldando a partir do momento que as cargas funcionais vão sendo aplicadas (Lanza et al., 2003).

Os hormônios tireoidianos são também importantes para a formação e o crescimento ósseos (Bakos *et al.*, 2018), incluindo o osso alveolar que possui formação intramembranosa. Os mecanismos pelos quais os HTs participam do processo de ossificação intramembranosa são pouco conhecidos, mas sabe-se que o hipertireoidismo acelera esse processo (Riggs et al., 1972; Johnsonbaugh *et al.*, 1978; Hirano *et al.*, 1995; Chawla *et al.*, 2015) e promover osteopenia do osso alveolar em indivíduos adultos. Entretanto, no presente estudo, não foram observadas diferenças na morfologia do osso alveolar entre os grupos. Vale ressaltar que a avaliação foi realizada ao desmame, ou seja, com 21 dias de idade, o que pode ter sido tempo insuficiente para que alterações ósseas pudessem se manifestar ou mesmo a quantidade de hormônio tireoidiano recebido da mãe não foi suficiente para causar alterações no osso alveolar.

7. CONCLUSÃO

Os efeitos do hipertireoidismo materno no desenvolvimento dentário e periodontal da prole de ratos se manifestam morfologicamente somente no período pós-natal, ou seja, ao desmame, quando há diminuição da espessura das camadas de odontoblastos e pré-dentina e aumento da espessura do ligamento periodontal.

8. REFERÊNCIAS

- ADAMS, S.L.; COHEN, A.J.; LASSOVÁ, L. Integration of signaling pathways regulating chondrocyte differentiation during endochondral bone formation. *Journal of cellular physiology*, v. 213, n. 3, p. 635-641, 2007.
- AHMED, O.M.; ABD EL-TAWAB, S. M.; AHMED, R. G. Effects of experimentally induced maternal hypothyroidism and hyperthyroidism on the development of rat offspring: I. The development of the thyroid hormones–neurotransmitters and adenosinergic system interactions. *International Journal of Developmental Neuroscience*, v. 28, n. 6, p. 437-454, 2010.
- ALLAIN, T; MCGREGOR, A. Thyroid hormones and bone. *Journal of Endocrinology*. v.139, p.9-18, 1993.
- ANDERSON, H. C. Molecular biology of matrix vesicles. *Clin Orthop Relat Res*, n. 314, p. 266-80, May, 1995.
- ARANA-CHAVES, V.E., MASSA, L.F.; Odontoblasts: the cells forming and maintaining dentine. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v.36, p.1367-1373, 2004.
- ATIENZA, E.C., SILVESTRE-RANGIL, J., & DONAT, F.S. Alteraciones odontoestomatológicas en el niño con síndrome de Down. *Revista Española de*, 68(6), 434- 439, 2012.
- BAKOS, B. et al. Skeletal Effects of Thyroid Hormone., *Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism*, 16(2), pp. 57–66, 2018.
- BÁRTHOLO B.B, MONTEIRO D.L.M, TRAJANO A.J.B. .Hipertireoidismo na gestação. *Revista HUPE*, 13 (3):2–79, 2014.
- BASSETT J.H, BOYDE A, ZIKMUND T, EVANS H, et al. Thyroid hormone receptor alpha mutation causes a severe and thyroxine-resistant skeletal dysplasia in female mice. *Endocrinol*, 155(9): 3699–3712, 2014.
- BASSETT J.H, WILLIAMS G.R. The molecular actions of thyroid hormone in bone. *Trends Endocrinol Metab*. 14(8): 356–364, 2003.
- BASSETT J.H.D, WILLIAMS G.R. Role of Thyroid Hormones in Skeletal Development and Bone Maintenance. *Endocrine Rev*, 37 (2): 135–187. 2016.
- BASSETT JHD, WILLIAMS G.R. *Thyroid Hormone in Bone and Joint Disorders*. 2nd. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2018.
- BASSETT, J.H; WILLIAMS, G.R. The molecular actions of thyroid hormone in bone. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. v.14, p.356-364, 2003.
- BEDI R, BROOK A.H. Changes in general, craniofacial and dental development in juvenile hypothyroidism. *Br Dent J*, 157:58–60. 1984.
- BELTING C.M, SCHOUR I, WEINMANN J.P, et al. Age changes in the periodontal tissues of the rat molar. *J Dent Res*, 32: 332- 53. 1953.

- BERKOVITZ, B.K.B., HOLLAND, G.R., MOXHAM, B.J. Anatomia, embriologia e histologia bucal. 3 ed. Porto Alegre: Artmed; 2004. Cap. 21, p. 290-303.
- BIANCO, A.C; SALVATORE, D; GEREBEN, B; et al. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocrine Reviews*. v.23, p.38-89, 2002.
- BIXLER D, MUHLER JC. The relation of systemic fluoride and Thyroid gland activity of the incidence of Dental caries in the rat. *J Dent Res*, 36: 304- 306. 1957.
- BIXLER, David et al. Changes in submaxillary gland ribonucleic acid following hypophysectomy, thyroidectomy and various hormone treatments. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v. 94, n. 3, p. 521-524, 1957.
- BLEICHER, F. Odontoblast physiology. *Exp Cell Res*, v. 325, n. 2, p. 65-71, Jul 15 2014.
- BLEICHER, F., RICHARD, B., THIVICHON-PRICE, B., et al. Odontoblasts and dentin formation. stem cell biology and tissue engineering in dental sciences. Cap.30, p.379-395. Elsevier. December, 2015.
- BOCHUKOVA E, SCHOENMAKERS N, AGOSTINI M, et al. A mutation in the thyroid hormone receptor alpha gene. *N Engl J Med*. 366(3): 243–249. 2012.
- BOELAERT, K; FRANKLYN, JA. Thyroid hormone in health and disease. *Journal of Endocrinology*. v.187, p.1-15, 2005.
- BOELONI, J.N; OCARINO, N.M; SILVA, J.F; et al. Osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells of ovariectomized and non-ovariectomized female rats with thyroid dysfunction. *Pathology - Research and Practice*. v.209, p.44-51, 2013a.
- BRENT G.A. Tissue-Specific Actions of Thyroid Hormone: Insights from Animal Models. *Rev Endocrine Metabol Dis*, 1(1–2): 27–33, 2000.
- CAMILLERI, S., MCDONALD, F. Runx2 and dental development. *Eur. J. Oral Sci*; 114: 361-73, 2006.
- CARRANZA, F. A. Periodontia Clínica de Glickman. 5.ed. Rio de Janeiro: Interamericana, 968p, 1983.
- CASTRO, M.P.R; SOARES, J.C.C. Hipotireoidismo. *RBM rev. bras. med*, 2014.
- CHANDNA S, BATHLA M. Oral manifestations of thyroid disorders and its management. *Indian J Endocrinol Metab*, 15(Suppl. 2):S113–S116, 2011.
- CHAWLA, R. et al. VSquamosal suture craniosynostosis due to hyperthyroidism caused by an activating thyrotropin receptor mutation (T632I)', *Thyroid*, 25(10), pp. 1167–1172, 2015.
- COBOURNE M.T. The genetic control of early odontogenesis. *Br J Orthod*, 26 (1): 21-8, 1999.

- COOPER, David S. Antithyroid drugs in the management of patients with Graves' disease: an evidence-based approach to therapeutic controversies. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 88, n. 8, p. 3474-3481, 2003.
- COSTA S.M, NETTO L.S, BUESCU A, VAISMAN M. Hipotireoidismo na gestação. *Rev Bras Saude Mater Infant*. 4 (4) : 351-358, 2004.
- COUVE, E. Ultrastructural changes during the life cycle of human odontoblasts. *Arch Oral Biol*, v. 31, n. 10, p. 643-51, 1986.
- COUVE, E.; OSORIO, R.; SCHMACHTENBERG, O. The amazing odontoblast: activity, autophagy, and aging. *Journal of dental research*, v. 92, n. 9, p. 765-772, 2013.
- CRAWFORD P.J, ALDRED M.J. Anomalies of tooth formation and eruption. In: Welbury R, Duggal MS, Hosey MT, editors. *Pediatric dentistry*. Oxford (UK): Oxford University Press. p. 253–274, 2012
- DAMMASCHKE T. Rat molar teeth as a study model for direct pulp capping research in dentistry. *Lab Ani*. ;44:1–6, 2010.
- DANGELO, J.G.; FATTINI, C.C. Anatomia sistêmica e segmentar. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2007.
- DAVIDSON D. The function and evolution of Msx genes: pointers and paradoxes. *Trends Genet*; 11:405–11. 1995.
- DAVIDSON D.R, HILL R.E . Msh-like genes: a family of homeo-box genes with wide-ranging expression during vertebrate development. *Sem in Dev Biol*; 2:405–12, 1991.
- DELVERDIER, M. et al. Critical analysis of the histomorphometry of rat thyroid after treatment with thyroxin and propylthiouracil. In: *Annales de Recherches Vétérinaires*. p. 373-378, 1991.
- DEPEW, M. J.; et al. A *Dlx5* regulates regional development of the branchial arches and sensory capsules. *Development*, California, San Fran., v. 126, p. 3831-46, may 1999.
- FERRAZZO K.L, PAYERAS M.R, FERRAZZO V.A, MEZOMO M.B. Craniofacial and dental manifestations of Triple X syndrome associated with congenital hypothyroidism: a case report. *Spec Care Dent*, 34:156–159, 2014.
- FISHER, D. A. et al. Maturation of human hypothalamic-pituitary-thyroid function and control. *Thyroid*, v. 10, n. 3, p. 229-234, 2000.
- FLAMANT, F; SAMARUT, J. Thyroid hormone receptors: lessons from knockout and knock-in mutant mice. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. v.14, p.85–90, 2003.
- FRAZIER-BOWERS, S.A.; VORA, S.R. Genetic disorders of dental development: tales from the bony crypt. *Current osteoporosis reports*, v. 15, n. 1, p. 9-17, 2017.

- GORREL, C., LARSSON, A. Feline odontoclastic resorptive lesions: unveiling the early lesion. *Journal of Small Animal Practice*, v.43, p.482-488. 2002.
- GOUVEIA, C.H. O efeito molecular e estrutural do hormônio tiroideano no esqueleto. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. v.48, p.183-195, 2004.
- GREENBERG A.H, CZERNICHOW P, REBA R.C, TYSON J, BLIZZARD RM. Observations on the maturation of thyroid function in early fetal life. *J Clin Invest*. 49(10):1790–1803, 1970.
- GUIMARAES C.V; CARDOSO T.G.S; OCARINO N.M; SERAKIDES R. Histomorfometria dentária de ratas com hipertireoidismo induzido durante ou após a erupção e com hipotireoidismo após a erupção dentária. *Arquivos em Odontologia*, 40 (1): 33-47, 2004.
- HALDI J, WYNN W, LAW M.L. Relationship between Thyroid Function and Resistance to Dental caries. *J Dent Res*, 41: 398- 404, 1962.
- HALDI, J; WYNN, W; LAW, M.L. Relationship between thyroid function and resistance to dental caries. *Journal of Dental Research*, v. 41, n. 2, p. 398-404, 1962.
- HIRANO, A., AKITA, S. AND FUJI, T. Craniofacial Deformities Associated with Juvenile Hyperthyroidism, *Cleft Palate-Craniofacial Journal*, 32(4), pp. 328–333, 1995.
- HOFFMAN, M. M.; SCHOUR, I. Quantitative studies in the development of the rat molar: II. Alveolar bone, cementum, and eruption (From birth to 500 days). *American Journal of Orthodontics and Oral Surgery*, v. 26, n. 9, p. 854-874, 1940.
- IKEDA R, AIYAMA S, REDMAN R.S. Effects of exogenous thyroid hormone on the postnatal morphogenesis of the rat parotid gland. *Anat Rec (Hoboken)*, 291(1):94–104, 2008.
- IWASAKI, K.; BAJENOVA, E.; SOMOGYI-GANSS, E.; MILLER, M.; NGUYEN, et al., Amelotin – a novel secreted, ameloblast-specific protein. *J. Dent. Res.*, Alexandria, v. 84, no. 12, p. 1127-1132, Dec, 2005.
- JOHNSONBAUGH, R. E. et al. Premature craniosynostosis: A common complication of juvenile thyrotoxicosis, *The Journal of Pediatrics*, 93(2), pp. 188–191, 1978.
- KARDONG, KV. "Sistema respiratório." *KARDONG, KV Vertebrados: anatomia comparada, função e evolução* 5: 487-530, 2010.
- KATCHBURIAN, E., ARANA, V. Histologia e embriologia oral. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; Cap. 6, Odontogênese; p. 147-75, 2004.

- KLAUSHOFER, K; VARGA, F; GLANTSCHING, H; et al. The regulatory role of thyroid hormones in bone cell growth and differentiation. *Journal of Nutrition*. v.125, p.1996-2003, 1995.
- KLEIN, M. L. et al. Novel mutation of the initiation codon of PAX9 causes oligodontia. *Journal of dental research*, v. 84, n. 1, p. 43-47, 2005.
- KLEIN, M.L.; NIEMINEN, P.; LAMMI, L ;et al., . Novel mutation of the initiation codon of PAX9 causes oligodontia. *J Dent Res*, Chicago, v. 84, no. 1, p. 43-47, 2005.
- KOWALESKY, J. Anatomia dental de cães (*Canis familiaris*) e gatos (*Felis catus*). Considerações cirúrgicas. 183p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- KRASSAS G.E, POPPE K, GLINOER D. Thyroid Function and Human Reproductive Health. *Endocrine Rev*, 31(5): 702–755, 2010.
- KRATOCHWIL, Klaus et al. Lef1 expression is activated by BMP-4 and regulates inductive tissue interactions in tooth and hair development. *Genes & development*, v. 10, n. 11, p. 1382-1394, 1996.
- KUIPER, G.G.J; KLOOTWIJK, W; VISSER, TJ. Expression of recombinant membrane-bound type I iodothyronine deiodinase in yeast. *Journal of Molecular Endocrinology*. v.34, p.865-878, 2005.
- LACRUZ,R.S., HABELITZ,S., WRIGTH,J.T., PAINE,M.L; Dental enamel formation and implications for oral health and disease. *American Physiological Society*, v.97, p.939-993. 2017.
- LANZA M. D., HENRIQUES S. E. F., MARTINS F.F. Limites cervicais dos preparos de dentes com finalidade restauradora. In: HENRIQUES S. E. F. Reabilitação Oral: Filosofia, Planejamento e Oclusão. São Paulo: Santos, Cap.11, p.233-49, 2003.
- LINDE, A. & GOLDBERG, M. Dentinogenesis. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 4(5), 679-728, 1993.
- LINDHE J., LANG N. P., KARRING T. Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1304p, 2010.
- LOUSCHALL H, FEJERSKOV O, JOSEPHSEN K. Ages-related and site-specific changes in the pulpodentinal morphology of rat molars. *Arch Oral Biol*, 361- 367, 2002.
- MAAS, R.; BEI, M. The genetic control of early tooth development. *Crit. Rev. Oral Biol.*, Boston, Massachusetts, v. 8, p. 4-39, oct, 1997.
- MACKENZIE A, FERGUSON MW, SHARPE PT. Hox-7 expression during murine craniofacial development. *Development*; 113:601–11, 1991.
- MACKENZIE A, LEEMING G.L, JOWETT A.K, FERGUSON M.W, SHARPE P.T . The homeobox gene Hox 7.1 has specific regional and temporal expression

patterns during early murine craniofacial embryogenesis, especially tooth development *in vivo* and *in vitro*. *Development*; 111:269–85, 1991.

MAFRA R.P.; VASCONCELOS R.G.; VASCONCELOS MG; et al. Desenvolvimento dental: aspectos morfogênicos e relações com as anomalias dentárias do desenvolvimento. *Rev Bras Odontol*, 69(2): 232-237, 2012

MAIA, M.Z et al. Effects of excess maternal thyroxin on the bones of rat offspring from birth to the post-weaning period. *Archives of endocrinology and metabolism*, v. 60, p. 130-137, 2016.

MARTINS-ORTIZ, MARIA FERNANDA. Influência dos bisfosfonatos na movimentação dentária induzida, na frequência e nas dimensões das reabsorções radiculares associadas. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru USP, 2004.

MATALOVÁ, E., BUCHTOVÁ, M., TUCKER, A. S. et al. Expression and characterization of c-Myb in prenatal odontogenesis. *Develop Growth Differ*, 53 (6): 793-803, 2011.

MESTMAN, J.H. Hyperthyroidism in pregnancy. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 18, n. 2, p. 267-288, 2004.

MILATOVICH, Athena et al. Gene for lymphoid enhancer-binding factor 1 (LEF1) mapped to human chromosome 4 (q23–q25) and mouse chromosome 3 near *Egf*. *Genomics*, v. 11, n. 4, p. 1040-1048, 1991.

MILOŠEVIĆ I; RADOVANOVIĆ A; DANILOVIĆ L; et al. Effect of subclinical and overt form of rat maternal hypothyroidism on offspring endochondral bone formation *Acta Veterinaria-Beograd* 68 (3), 301-320, 2018.

MOFFATT, P.; SMITH, C. E.; SOOKNANAN, R.; ST-ARNAUD, R.; NANCI, A. Identification of secreted and membrane proteins in the rat incisor enamel organ using a signal-trap screening approach. *Eur. J. Oral Sci.*, Copenhagen, v. 114, p. 139-146, May 2006.

MOFFATT, P.; SMITH, C. E.; ST-ARNAUD, R.; NANCI, A. Characterization of Apina, a secreted protein highly expressed in tooth associated epithelia. *J. Cell. Biochem.*, New York, v. 103, no. 3, p. 941-956, Feb., 2008.

MOFFATT, P.; SMITH, C. E.; ST-ARNAUD, R.; SIMMONS, C.; WRIGHT, J. T.; NANCI, A. Cloning of rat amelotin and localization of the protein to the basal lamina of maturation stage ameloblasts and junctional epithelium. *Biochem. J.*, London, v. 399, p. 37-46, 2006.

MOSTOWSKA, Adrianna; BIEDZIAK, Barbara; JAGODZINSKI, Pawel P. Novel MSX1 mutation in a family with autosomal-dominant hypodontia of second premolars and third molars. *Archives of oral biology*, v. 57, n. 6, p. 790-795, 2012.

MURRAY, P. E., ABOUT, I., LUMLEY, P. J., FRANQUIN, J. C et al., . Human odontoblast cell numbers after dental injury. *Journal of Dentistry*, 28, 277–285, 2000.

- NANCI A. Ten cate's oral histology: development, structure, and function. St. Louis (MO): Elsevier Health Sciences. 2014
- NANCI, A; TEN CATE, A.R. Ten Cate, Histologia Oral: Desenvolvimento, Estrutura e Função. 8a Ed. Cap.7-9. Editora Elsevier. 2013.
- NANCI, Antonio. Ten Cate histologia oral. Elsevier Editora Ltda., 2019.
- NIEMINEN, P. Genetic basis of tooth agenesis. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, v. 312, n. 4, p. 320-342, 2009.
- NORÉN J.G, AIM J. Congenital hypothyroidism and changes in the enamel of deciduous teeth. *Acta Paediat Scand*. 72: 485-489, 1983.
- NORÉN J.G. 1983. Enamel structure in deciduous teeth from low birthweight infants. *Acta Odont Scand*. 41(6):355-62, 1983
- NUNES, MT. Hormônios tireoidianos: mecanismo de ação e importância biológica. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. v.47, p.639-643, 2003.
- OKAJCEKOVA, T et al. A comparative in vitro analysis of the osteogenic potential of human dental pulp stem cells using various differentiation conditions. *International journal of molecular sciences*, v. 21, n. 7, p. 2280, 2020.
- OGILVY-STUART, A. L. Neonatal thyroid disorders. *Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition*, v. 87, n. 3, p. F165-F171, 2002.
- ORIMO, H. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J Nippon Med Sch*, v. 77, n. 1, p. 4-12, Feb 2010.
- PAPI B.. Thyroid hormone and skeletal development. In: *Vitamins and hormones*. [s.l.] Elsevier, 106p. 383-472, 2018.
- PARK, J. C.; PARK, J. T.; SON, H. H.; KIM, H. J.; JEONG, M. J.; LEE, C. S.; DEY, R.; CHO, MII. The amyloid protein APin is highly expressed during enamel mineralization and maturation in rat incisors. *Eur. J. Oral Sci.*, Copenhagen, v. 115, no. 2, p. 153-160, Apr. 2007.
- PASCUAL, A; ARANDA, A. Thyroid hormone receptors, cell growth and differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta*. v.1830, p.3908-3916, 2013.
- PATEL, Jatin et al. Delivery of maternal thyroid hormones to the fetus. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, v. 22, n. 5, p. 164-170, 2011.
- PÉTER, F; MUZSNAI, A. Congenital disorders of the thyroid: hypo/hyper. *Pediatric Clinics*, v. 58, n. 5, p. 1099-1115, 2011.
- PHOOJAROENCHANACHAI, Meta et al. Effect of maternal hyperthyroidism during late pregnancy on the risk of neonatal low birth weight. *Clinical endocrinology*, v. 54, n. 3, p. 365-370, 2001.
- PINTO A, GLICK M. Management of patients with thyroid disease: oral health considerations. *J Am Dent Assoc*, 133(7):849-858, 2002.

- PINZON R.D, ROZLOV M, BURCH W.P.. Histology of Rat Molar Pulp at different Ages. *J Dent Res*, 46: 203-208, 1967.
- POLAK, Michel et al. Congenital hyperthyroidism: the fetus as a patient. *Hormone Research in Paediatrics*, v. 65, n. 5, p. 235-242, 2006.
- POUMPROS, E; LOBERG, E; ENGSTRÖM, C. Thyroid function and root resorption. *The Angle Orthodontist*, v. 64, n. 5, p. 389-393, 1994.
- PRICE, J.; *et al.* Identification of a mutation in *Dlx3* associated with trico-donto-osseous (TDO) syndrome. *Hum. Mol. Genet.*, Winston-Salem, USA, v. 7, p. 563-9, nov, 1998.
- RIBEIRO L.G; SILVA J.F; OCARINO N.M et al.. Excess maternal and postnatal thyroxine alters chondrocyte numbers and the composition of the extracellular matrix of growth cartilage in rats. *Connect Tissue Res*, 59(1):73-84. 2018a.
- RIBEIRO L.G; SILVA J.F; OCARINO N.M et al. Excess Maternal Thyroxine Alters the Proliferative Activity and Angiogenic Profile of Growth Cartilage of Rats at Birth and Weaning. *Cartilage*, 9(1):89-103. 2018b.
- RIGGS, W., WILROY, R. S. AND ETTELDORF, J. N. 'Neonatal hyperthyroidism with accelerated skeletal maturation, craniosynostosis, and brachydactyly.', *Radiology*, 105(3), pp. 621–625. doi: 10.1148/105.3.621. 1972.
- ROVELLI, et al. Newborn of mother affected by autoimmune thyroiditis: the importance of thyroid function monitoring in the first months of life. *Italian J Pediatrics*, 36(24): 1-5, 2010.
- SANTOS, G. B. S. et al. Perfil sistêmico e manifestações bucais em pacientes com hipotireoidismo. *Revista Cubana de Estomatología*, v. 26, p. 146-157, 2012.
- SAP, Jan et al. The c-erb-A protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone. *Nature*, v. 324, n. 6098, p. 635-640, 1986.
- SASAKI, T., GARANT, P.R.; Structure and Organization of Odontoblasts. *The Anatomical Record*, v.245,n.4, p.235-249, 1996.
- SATO, K; HAN, DC; FUJII, Y; et al. Thyroid hormone stimulates alkaline phosphatase activity in cultured rat osteoblastic cells (ROS 17/2.8) through 3,5,3'-triiodo-L-thyronine nuclear receptors. *Endocrinology*. v.120, p.1873-81, 1987.
- SHELLER E.L, KREBSBACH P.H, KOHN D.H.. Tissue engineering: state of the art in oral rehabilitation. *J Oral Rehabil*, 36(5):368–389, 2009.
- SEGNI, MARIA et al. Special features of Graves' disease in early childhood. *Thyroid*, v. 9, n. 9, p. 871-877, 1999.
- SERAKIDES, R. et al. Histomorphometry and quantification of nucleolar organizer regions in bovine thyroid containing methylthiouracil residues. *Veterinary pathology*, v. 36, n. 6, p. 574-582, 1999.

- SERAKIDES, R. et al. Hipogonadismo e função tireoidiana em ratas hipertireóideas e eutireóideas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 52, p. 571-578, 2000.
- SERAKIDES, R; NUNES, VA; NASCIMENTO, EF; et al. Hypogonadism and thyroid function in hyper and euthyroid rats. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. v.52, p.571-578, 2000.
- SERAKIDES, R; NUNES, VA; SILVA, CM; et al. Influência do hipogonadismo na histomorfometria e função tireoidiana de ratas hipotireoideas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. v.54, p.473-477, 2002.
- SERAKIDES, R; NUNES, V.A; OCARINO, N.M; et al. Efeito da associação hipertireoidismocastração no osso de ratas adultas. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo*. v.48, p.875-884, 2004.
- SERAKIDES, R; OCARINO, N.M; MAGALHÃES, F.C; et al. Histomorfometria óssea de ratas hipertireóideas lactantes e não-lactantes. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo*. v.52, p.677-683, 2008
- SILVA, C. N. et al. O TECIDO DA POLPA DENTARIA COMO FONTE DE CÉLULAS TRONCO. *Revista Saúde em Foco*. Teresina, n. 11, p. 295-308, 2019
- SILVA, E. R., ALVES, J. B. A genética da odontogênese. *Biosci J.*; 24 (2): 113-24, 2008.
- SIMON, S. et al. Molecular characterization of young and mature odontoblasts. *Bone*, v. 45, n. 4, p. 693-703, Oct 2009.
- SMITH, A. J., CASSIDY, N., PERRY, H., BEGUE-KIRN, C., RUCH, J. V. & LESOT, H.. Reactionary dentinogenesis. *International Journal of Developmental Biology*, 39(1), 273–280, 1995.
- SRISUWAN, T., TILKORN, D. J, WILSON, J. L. et al. Molecular aspects of tissue engineering in the dental field. *Periodontol*; 41: 88-108, 2006.
- STOCKTON, David W. et al. Mutation of PAX9 is associated with oligodontia. *Nature genetics*, v. 24, n. 1, p. 18-19, 2000.
- STRACHAN, Tom; READ, Andrew P. PAX genes. *Current opinion in genetics & development*, v. 4, n. 3, p. 427-438, 1994.
- SURI L, GAGARI E, VASTARDIS H. Delayed tooth eruption: pathogenesis, diagnosis, and treatment. A literature review. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 126(4):432–445, 2004.
- TAYLOR P.N, ALBRECHT D, SCHOLZ A, et al. Global epidemiology of hyperthyroidism and hypothyroidism. *Nature*, 14: 301–316, 2018.
- THESLEFF I. Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. *J Cell Sci*;116(Pt 9):1647-8, 2003.

- THOMAZ, Juliana Montovani et al. Caracterização morfológica dos dentes de mocó *Kerodon rupestris*: Mammalia: Rodentia. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 43, n. 5, p. 702-707, 2006.
- THORPE-BEESTON JG, NICOLAIDES KH, FELTON CV, et al. 1991. Maturation of the secretion of thyroid hormone and thyroid-stimulating hormone in the fetus. *N Engl J Med*. 324(8):532–536, 1991.
- TRAVIS, Adam et al. LEF-1, a gene encoding a lymphoid-specific protein with an HMG domain, regulates T-cell receptor alpha enhancer function [corrected]. *Genes & development*, v. 5, n. 5, p. 880-894, 1991.
- TRZEPACZ, Paula T. et al. Graves' disease: an analysis of thyroid hormone levels and hyperthyroid signs and symptoms. *The American journal of medicine*, v. 87, n. 5, p. 558-561, 1989.
- VAN GENDEREN, Courtney et al. Development of several organs that require inductive epithelial-mesenchymal interactions is impaired in LEF-1-deficient mice. *Genes & development*, v. 8, n. 22, p. 2691-2703, 1994.
- VASCONCELOS, R. G. et al. Importância dos tecidos dentais e periodontais como fontes de células-tronco. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*. João Pessoa, v. 15, n. 2, p. 229-236, 2011
- VIEIRA, A.S.; OCARINO N.M, SERAKIDES R. odontogenese e alterações dentarias congênitas nos animais domésticos. *Cadernos técnicos de veterinária e zootecnia* v. 62; p.23-35, 2009.
- WAUNG J.A, BASSETT J.H.D, WILLIAMS G.R. Thyroid hormone metabolism in skeletal development and adult bone maintenance. *Trends Endocrinol Metab*, 23(4): 155–162, 2012.
- WEISS, J. B. et al. Isolation and Characterization of Stem Cells Derived by Human Dental Pulp from Harvest Based in Rotary and Manual Techniques used in Endodontic Therapy. *Brazilian Dental Science*, São José dos Campos, v. 23, n. 1, p. 1-10, jan/mar. 2020.
- WOJCICKA A, BASSETT JHD, WILLIAMS GR. Mechanisms of action of thyroid hormones in the skeleton. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1830(7):3979–3986, 2013.
- XHONGA, Frida A.; VAN HERLE, Andre. The influence of hyperthyroidism on dental erosions. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, v. 36, n. 3, p. 349-357, 1973.
- YAMAMOTO T, HASEGAWA T, YAMAMOTO T, HONGO H, AMIZUKA N. Histology of human cementum: its structure, function, and development. *Jpn Dent Sci Rev*;52(3):63–74, 2016.
- YEN, A. H., SHARPE, P. T. Stem cells and tooth tissue engineering. *Cell Tissue Res*. 2008; 331: 359-72, 2008.

YU, C., ABBOTT, P.V.; An overview of dental pulp: its functions and responses to injury. *Australian Dental Journal Supplement*, v.52, p.S4-S16, 2007.

YU, J., SHI, J., JIN, Y. Current Approaches and Challenges in Making a Bio-Tooth. *Tissue Eng. Part B Rev*; 14 (3): 307-19. 2008.

YUSSIF, N.M.; EL-MAHDI, F.M.; WAGIH, R. Hypothyroidism as a risk factor of periodontitis and its relation with vitamin D deficiency: mini-review of literature and a case report *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*; 14(3):312-316, 2017.

YUSSIF, N.M.; EL-MAHDI, F.M; WAGIH, R. Hypothyroidism as a risk factor of periodontitis and its relation with vitamin D deficiency: mini-review of literature and a case report. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*, v. 14, n. 3, p. 312, 2017.

ZIMMERMANN, E. et al. Tracheal suture in rats with hypothyroidism. Wound healing study. *Acta Cirúrgica Brasileira*, São Paulo, v. 24, p. 282-289, 2009.