

FABIOLA FERREIRA CAIXETA

**ESTUDO DE INFLUÊNCIAS NUTRICIONAIS NA OSTEOGÊNESE E
NA ODONTOGÊNESE DO RATO (Rattus norvegicus albinus, Wistar)**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências da
Saúde da Universidade de Brasília como parte dos
requisitos para obtenção do Título de Doutora em
Ciências da Saúde.

Brasília

2005

FABIOLA FERREIRA CAIXETA

**ESTUDO DE INFLUÊNCIAS NUTRICIONAIS NA OSTEOGÊNESE E
NA ODONTOGÊNESE DO RATO (Rattus norvegicus albinus, Wistar)**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientador: **Dr. Orlando Ayrton de Toledo**

Brasília

2005

Dedico este trabalho,

À Deus,

Aos meus pais **Heleno e Naruna , exemplos de luta, força e esperança em minha vida, incentivando e acreditando sempre para que eu pudesse realizar meus sonhos.**

Em especial,

Ao professor **Dr. Orlando Ayrton de Toledo** pela paciência, contribuição científica, constante dedicação e amizade que me guiaram e tornaram possíveis a realização desta pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof^o Dr. Orlando Ayrton de Toledo** pelo apoio e incentivo durante o curso de Pós- Graduação em Ciências da Saúde, da UnB .

À **Sra. Maria da Glória da Silva**, técnica de Histologia do Laboratório Multidisciplinar de Odontologia da UnB, minha grande gratidão e respeito, pelas quais através de sua inteligência e criatividade , pude realizar esta pesquisa.

Ao **Sr. Nirceu Werneck Linhares**, técnico do Laboratório de Química de Solos da EMBRAPA – CERRADOS, por sua disponibilidade e interesse no auxílio para a coleta dos dados.

Ao **Sr. José Tavares dos Santos**, técnico do Laboratório de Cirurgia Experimental, pelo cuidado e carinho no tratamento dos animais utilizados na pesquisa.

Ao **Prof^o Dr. Edgar Merchán Hamann**, Diretor do Núcleo de Estudos em Saúde Pública, pela sua amizade e incentivo ao meu enriquecimento científico durante o curso de Pós- Graduação na UnB.

Ao **Prof^o Dr. David Duarte Lima**, professor adjunto do Departamento de Medicina Social, pela amizade, carinho e competência na organização e análise dos dados estatísticos.

Ao **Sr. Antônio Carlos Gomes**, responsável pelo Departamento de Estatística da EMBRAPA- CERRADOS, pela gentileza e disponibilidade em ajudar na análise estatística .

Ao **Prof^o Dr. Renato Hermann Sundfeld** , do Departamento de Dentística da Faculdade de Odontologia de Araçatuba- UNESP, pelo conhecimento científico e apoio , para que os cortes dos materiais em pesquisa fossem realizados nesta Instituição.

Ao **Prof^o Dr. Carlos Holland**, do Departamento de Dentística da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, pelo seu interesse em passar todos os conhecimentos a respeito da utilização do micrótomo.

À **Srta. Vânia dos Santos Gonçalves**, pela formatação e digitação do trabalho.

À **Srta. Francileide Pereira de Sousa**, pela cooperação no manuseio dos ratos .

À **Comissão de Pós- Graduação** da Faculdade de Ciências da Saúde da UnB, pela organização dos serviços.

À todos aqueles que, de uma maneira ou de outra, contribuíram para a execução e conclusão dessa pesquisa.

E um agradecimento especial às amigas **Nauai, Elizabeth , Aninha, Elaine e Eulália**, pela compreensão das ausências e faltas, e por darem amor sempre.

RESUMO

Realizou-se um estudo para verificar o papel dos nutrientes na osteogênese e na odontogênese do rato . A amostra consistiu de 22 ratos , 11 do grupo controle e 11 do grupo tratado analisados após um período de 7,14 e 21 dias . No grupo controle, os ratos foram amamentados por mães que utilizaram dietas normais em cálcio e fósforo durante a gestação. No grupo tratado, estes foram amamentados por mães cuja dieta continha valores reduzidos destes dois nutrientes. Após o sacrifício foram coletados os fêmures para análise pela técnica de calcinação, e os fêmures e cabeças para estudo histológico. Pôde-se concluir que a redução do cálcio e fósforo durante a gestação promoveu uma diminuição do peso e altura dos ratos. Observaram -se valores normais nos percentuais de cálcio e fósforo dos ossos, porém, com atraso na ossificação. Quanto à odontogênese, a formação de esmalte, pré-dentina e dentina também mostrou-se dentro dos padrões de normalidade . Apenas a rizogênese desenvolveu-se de forma mais lenta, interferindo no irrompimento dos dentes.

ABSTRACT

It was conducted the present study with the objective to investigate the role of nutrients in rats' osteogenesis and odontogenesis . Study sample was constituted by 22 rats, being 11 from the control group and 11 from the treated group, all of them analyzed after a peiod of 7, 14 and 21 days. In the control group, rats was fed by mothers using a normal calcium and phosphorus diet during pregnancy. In the treated group, rats were fed by mothers that, during their pregnancy ,were submitted to a diet with reduced quantities of these two elements. When the rats were sacrificed, it was analyzed the femurs by the calcination process and by histologic study. The heads also was submitted to histologic study. Results indicated that calcium and phosphorus deprivation during pregnancy led to a reduction in rats' weight and height . It was observed normal values in bones concentrations of calcium and phosphorus , but with a delay in ossification. Regarding odontogenesis , the formation of enamel , dentin ande pre- dentin was between normal values. Only root formation envolved in a more slow fashion, interfering in teeth arise.

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento humano depende da nutrição, conceituada como um processo de transformação de substâncias minerais e orgânicas em células e humores. A nutrição se faz relevante quando consideramos o seu papel como indicador das condições de saúde, do status sócio-econômico e psíquico de uma população.

A desnutrição é caracterizada pela inadequada ingestão de proteínas, glúcides, lipídeos e minerais, e desta forma, o estado nutricional é o resultado da complexa interação entre os alimentos ingeridos, o estado geral da saúde, e o ambiente (OMS, 2000).

Os problemas nutricionais nos países em desenvolvimento são evidentes principalmente nas crianças, que representam o grupo etário mais vulnerável às deficiências nutricionais, e as maiores vítimas da desnutrição. Esta é uma doença carencial, evolutiva, crônica, que afeta especificamente uma função fundamental da célula – o crescimento (MARCONDES, 1999), (SEGRE, 1985). Segundo o IBGE, a prevalência da desnutrição conforme dados colhidos em 1974 e 1975 foi elevada principalmente na região Nordeste com um índice em torno de 48,9%. No Brasil, após vinte anos, cerca de 31% das crianças tem desnutrição e na região Nordeste 46,1% dos casos apresentaram déficit de nutrientes segundo resultados da Pesquisa Nacional sobre Saúde e Nutrição (CAVALCANTI *et al*, 2003).

No processo de desenvolvimento dos tecidos duros, a ausência de nutrientes como cálcio e fósforo pode afetar não só a matriz orgânica, mas também a calcificação e maturação do esmalte, osso e dentina, além do padrão de erupção dentária. Considerando-se que o início da osteogênese e odontogênese ocorre nas primeiras semanas de vida intra-uterina e a sua completa formação nos primeiros anos de vida, períodos de desnutrição durante a gestação e nos primórdios da vida da criança, podem acarretar distúrbios temporários ou permanentes tanto na estrutura óssea quanto nos tecidos dentários (NAVIA, 1973).

A desnutrição, bem como hábitos inadequados de dieta, refletem na cavidade bucal condições sub-humanas de vida da criança. Além dos hábitos de alimentação, mães fumantes, alcoólatras, viciadas em drogas, ou aquelas que ingerem grandes quantidades de café, poderão provocar em seus filhos distúrbios no esmalte dental como hipoplasias e opacidades, entretanto, pouco se sabe a respeito dos fatores que realmente influenciam a odontogênese (RUGG-GUNN *et al*, 1998).

O acompanhamento e a educação principalmente durante os períodos de gestação proporcionarão às mães um maior esclarecimento quanto aos cuidados que ela deverá ter com a alimentação e sua saúde em geral, afim de permitir um desenvolvimento normal do feto e de seus órgãos dentários. Além disso, desvendando-se os fatores condicionantes do estado nutricional da população, fornecem-se diretrizes para orientar intervenções mais eficazes. Quaisquer que sejam as estratégias de intervenção nutricional, é fundamental dispor de dados com os quais se possa implementar mudanças, ao longo do tempo, no estado nutricional da população.

Com a realização deste trabalho propõe-se estudar aspectos nutricionais que podem afetar a odontogênese e a osteogênese, avaliando, quantitativa e qualitativamente o papel do cálcio e do fósforo no desenvolvimento.

2. REVISTA DA LITERATURA

As influências nutricionais resultam da absorção e circulação dos nutrientes nos tecidos em nível sistêmico, sendo um dos principais determinantes da saúde e do bem estar do ser humano. A nutrição assume uma importância especial nos primeiros anos de vida, pois as células formativas dos diversos órgãos assim como as responsáveis pela odontogênese e todo o sistema estomatognático, requerem energia e nutrientes especiais para sua fisiologia normal (BEGAZO, 1998).

Distúrbios nutricionais, tais como deficiências de cálcio, fosfato, vitamina A, C, D, bem como o balanço energético – protéico, afetam a síntese de proteínas perturbando a formação e mineralização dos tecidos duros de acordo com suas funções biológicas gerais (JOHANSSON; BIRKHED, 1995).

A desnutrição durante a gravidez pode provocar alterações no desenvolvimento das crianças. Nesta situação, o metabolismo de certos minerais como cálcio e fósforo fica alterado podendo provocar alterações na amelogênese, durante os períodos de aposição e mineralização da matriz do esmalte, ocasionando defeitos denominados de hipoplasias e opacidades (CAIXETA, 1995).

Defeitos no esmalte dental têm sido descritos na literatura referente a esta condição. Infante; Gillespie (1974), descreveram uma hipoplasia do tipo linear nos incisivos superiores em 73.1% de crianças com terceiro grau de desnutrição e 42.9% das crianças com segundo grau de desnutrição. Este tipo de hipoplasia é visto em crianças mal- nutridas que moram em comunidades carentes, apresentando-se como o resultado de interferências na atividade ameloblástica durante a fase aposicional, resultando em uma área de aprisionamento na formação da matriz.

Segundo estes autores, a lesão é clinicamente caracterizada por um entalhe horizontal, localizado na superfície vestibular dos incisivos superiores decíduos, na região do dente formada no período neonatal, ou seja, terço médio do incisivo central superior e terço incisal do incisivo lateral.

Os defeitos do esmalte são fatores predisponentes para o aparecimento de lesões cáries (Bezerra; Toledo, 1997), entretanto, não houve uma associação

positiva entre desnutrição e alto índice de cárie, alto índice de placa e sangramento, segundo Guimarães *et al* (2002). Ao contrário, Begazo (1998) observou que a deficiência energético - protéica de vitamina A , de zinco e ferro causa o aumento de lesões cariosas devido à alteração na estrutura do esmalte.

Bonucci *et al* (1994) analisaram 3 grupos de ratos. 1 -Grupo: ratos alimentados por mães desnutridas e por 30 dias com a mesma dieta; 2 – Grupo: ratos alimentados por mães desnutridas e por 10 dias com dieta normal, 3 – Grupo: ratos alimentados por mães em uma dieta normal. Verificaram que o esmalte apenas do primeiro grupo apresentou-se desmineralizado, e seu grau de calcificação foi restaurado com a volta à dieta normal. Observaram que embora o esmalte tenha cristalitos em sua totalidade, estes não foram mais finos, comparados aos que utilizaram uma dieta normal.

Sheldon *et al* (1945) observaram crianças, utilizando dentes extraídos. A história médica foi registrada com todas as informações desde o período pré-natal até hábitos alimentares. Os resultados mostraram que formações defeituosas no esmalte estavam associadas às deficiências nutricionais. Numa avaliação de 24 casos, 14 revelaram deficiências de vitamina D, 4 de vitamina C, 3 de vitamina A e 3 de cálcio e fósforo. Estas deficiências ocorreram isoladas, combinadas e associadas a outras doenças.

Em um estudo longitudinal com 50 crianças, das quais 25 eram desnutridas e 25 normais, Martinez; Martin (1993) verificaram um diâmetro neurocranial menor do que nas crianças normais. Observaram também uma erupção retardada na maioria das crianças desnutridas.

De acordo com Kodali (1998), crianças desnutridas mostraram um retardo nas medidas antropométricas, na erupção dentária e exfoliação dos dentes decíduos em até dois anos após a lesão ter ocorrido. O atraso na erupção e exfoliação pode ocorrer devido à deficiência do magnésio, já os episódios de hipocalcemia e hipofosfatemia estariam associados às alterações no esmalte , principalmente em caninos e molares decíduos, segundo o autor.

Segundo Freitas *et al* (1994), o efeito da desnutrição não é o mesmo para todos os órgãos e tecidos. Acreditam que em um determinado órgão também se

processe uma distribuição seletiva dos elementos nutritivos de uma dieta, na dependência das prioridades relacionadas com a sobrevivência desse órgão.

Grahnén *et al* (1976) estudaram três grupos de crianças. Grupo controle (56 crianças), grupo de prematuras (26 crianças) e um grupo subdividido em grupo 3a: crianças com baixo peso ao nascer e pequenas para a idade gestacional e grupo 3b: crianças com baixo peso e normais para a idade gestacional. Os resultados demonstraram que nas crianças severamente mal-nutridas (Grupo 3a), a frequência de hipoplasia foi de 19.2%. Naquelas onde o período de má nutrição foi menor (Grupo 3b) não houve caso de hipoplasia. No entanto, no grupo de prematuras que sofreram pequenos períodos de nutrição a frequência foi de 11.5% e no grupo controle, 12.5%. No entanto, não houve diferenças significantes entre os grupos em relação à má-nutrição intra-uterina como fator etiológico da hipoplasia.

Seow (1991) verificou nas crianças com defeitos de esmalte um valor médio de $4,0 \pm 1.5$ mm da área cortical do úmero comparado com crianças sem defeitos ($7,5 \pm 1.2$ mm). Observou que os níveis de cálcio no sangue continuaram constantes, mesmo nos episódios de hipocalcemia, pois o mineral estaria sendo removido dos tecidos calcificados para manter a homeostase no soro.

Gaunt; Irving (1940) confirmaram a influência dos elementos inorgânicos como o cálcio, o fósforo e o magnésio, das vitaminas A, D, bem como dos princípios ativos da paratireóide, glândulas pituitárias e adrenal sobre a calcificação dentária. Eles verificaram em ratos que dietas ricas em cálcio e fósforo não provocaram defeitos do esmalte, no entanto, quando o conteúdo destes elementos diminuiu, os incisivos apresentaram bandas anormais alterando esmalte com e sem pigmentação. Na dentina, espaços interglobulares foram verificados, com mudanças na estrutura, demonstrando um padrão de amolecimento (NAKAGAWA *et al*, 1996).

Apesar dos distúrbios no metabolismo mineral terem sido associados aos defeitos do esmalte, autores como Kronfeld; Schour (1939) discordaram desta opinião. Justificaram que o feto está muito bem protegido no útero e que o metabolismo mineral da mãe tem uma influência mínima sobre os dentes da criança.

Embora a causa bioquímica dos defeitos do esmalte ainda não tenha sido completamente esclarecida, segundo os autores, há evidências de que esta estaria

vinculada à homeostase do cálcio.

O processo de formação do esmalte é complexo, envolvendo as células diferenciadas do epitélio interno, secretando matriz orgânica do esmalte. A matriz do esmalte só é formada quando a primeira camada de dentina é depositada. Após a deposição desta, o epitélio interno se diferencia para produzir ameloblastos secretores. Tais células tem interdigitações conhecidas como processo de Tomes, os quais contém típicos grânulos de secreção (TEN CATE, 2001).

A matriz depositada inicialmente é insolúvel em ácidos e susceptível ao manchamento, sendo constituída de duas proteínas principais segundo Robinson *et al* (1982) , Arana – Chavez (2001) : as amelogeninas , presentes nos estágios iniciais da amelogênese, e as não amelogeninas, relacionadas aos processos de mineralização do esmalte (KING ; WEI ,1986).

Após a matriz orgânica ser depositada, segundo Ten Cate (2001), o conteúdo dos aminoácidos começa a modificar-se, e aparecem organelas ultra- estruturais nos ameloblastos como o presença de mitocôndrias. Essas organelas estariam relacionadas à remoção do excesso de material orgânico e água da matriz do esmalte, favorecendo o início da mineralização.

O osso é um tecido conjuntivo mineralizado, constituído de fosfato de cálcio na forma de hidroxiapatita. Seu peso consiste de 35% de material orgânico incluindo colágeno e água, e 65% de porção mineral . As células formadoras do tecido são os osteoblastos, responsáveis pela secreção da matriz orgânica. O tecido ósseo pode originar-se de duas formas: substituindo um modelo cartilaginoso pré-existente, caracterizando a ossificação do tipo endocondral, ou quando surge do interior de uma membrana conjuntiva - ossificação intramembranosa. (KATCHBURIAN; ARANA-CHAVEZ 1999), (TEN CATE, 2001), (JUNQUEIRA; CARNEIRO,2004).

2.1 BIOMINERALIZAÇÃO DOS TECIDOS DUROS

A mineralização dos tecidos duros como ossos e dentes, inicia-se sob comando celular. A matriz orgânica contém uma estrutura advinda da membrana celular, denominada de vesícula. Nos ossos e na dentina, são derivadas dos osteoblastos e odontoblastos, dando início a deposição de mineral. As vesículas têm na sua membrana celular moléculas relacionadas com o processo de mineralização, como glicoproteínas, fosfolipídeos ácidos e a enzima fosfatase alcalina.

No osso em mineralização, tanto a osteopontina como a sialoproteína óssea, outra proteína não colágena, são observadas ao redor de glóbulos de mineralização. A mineralização do esmalte, entretanto, não ocorre com a participação destas vesículas. Os cristais de mineral do esmalte são inicialmente depositados entre as moléculas protéicas da matriz jovem, e só crescerão quando estas forem degradadas. O componente mineral seria depositado sobre a matriz previamente secretada pelas células formadoras (ARANA-CHAVEZ, 2001).

O cálcio é absorvido pelo trato intestinal e pelas células epiteliais, e seu transporte ocorre através da parede intestinal sendo aumentado pela presença de vitamina D, que atua diretamente no epitélio da mucosa do duodeno e jejuno.

O aumento dos níveis de cálcio plasmático pode estar relacionado às influências hormonais, por exemplo, através do hormônio da paratireóide (PTH) que mobiliza cálcio do esqueleto permitindo ao mesmo tempo, uma maior excreção urinária do fosfato (RANSBURG, 1995).

A absorção pode ser retardada em contrapartida, por substâncias que formam sais insolúveis com o cálcio, como os fosfatos e oxalatos. Estudos demonstram, entretanto, existir pouca ou nenhuma variação na eficiência de absorção do cálcio em relação à ingestão dos fosfatos, observando-se também, que as dietas ricas em proteínas aumentaram a absorção do cálcio em torno de 40% (HEANEY, 2000).

Dois terços do cálcio e fósforo contidos no feto são acumulados durante os últimos três meses de gravidez, sendo que das 30 gramas de cálcio presentes no esqueleto final da criança, 25 gramas serão depositadas neste trimestre.

Os níveis de cálcio são mantidos através da placenta e, no último trimestre de gravidez, a transferência do cálcio da mãe para o feto se aproxima de 100 a 150 mg/kg de peso fetal por dia. O paratormônio materno atravessa a placenta, suprimindo a sua função fetal, assim como o fósforo (MARCONDES, 1999).

Ao nascimento, há uma parada abrupta do suplemento maternal de cálcio e fósforo, deixando a criança conseguir minerais de fontes exógenas, de forma a restabelecer os níveis destes. Nesta fase, suplementos de cálcio endógeno dos ossos servem como tampões aumentando o fluxo de cálcio dos ossos para o espaço extracelular através da ativação do paratormônio, produção de metabólitos da vitamina D e diminuição da atividade da calcitonina (TSANG *et al* ,1976).

Os valores mínimos de cálcio sérico , são alcançados de 24 a 48 horas de vida, e retornam ao normal em poucos dias. Porém, em circunstâncias onde há algum distúrbio, estes valores podem persistir por mais tempo. Mesmo em crianças nascidas em tempo normal, nas primeiras horas de vida há evidências de hipocalcemia (concentração média de cálcio sérico menor que 8 mg/100 ml). Esta situação, é freqüentemente encontrada como uma tentativa do recém-nascido em conseguir o cálcio sem o suplemento materno.

A homeostase é freqüentemente restabelecida pela dieta, pela atividade das glândulas paratireóides e aumento da absorção de vitamina D e cálcio no trato gastrointestinal. (SEGRE, 1985), (TSANG *et al* ,1976) ,(TSANG *et al* ,1973) , (MARCONDES, 1999) , (RAMOS; LEONE, 1986).

Dietas pobres em cálcio administradas às ratas durante a gravidez não causaram aos filhotes danos na deposição e mineralização do esmalte e dentina,segundo Lopuzone, Favia (1994). Os autores observaram que a administração da dieta hipocálcica logo após o desmame, favoreceu a presença de ameloblastos em espessura normal, porém com esmalte desmineralizado e uma dentina com espessura reduzida porém mineralizada . Os resultados mostraram um peso reduzido e a reação diferenciada dos tecidos sob o mesmo estresse metabólico.

Deficiências em minerais e nutrientes tais como o cálcio, magnésio e vitamina A, C e D podem causar distúrbios nos ossos e dentes. Furuta *et al* (1999)

observaram que ratos alimentados com dietas hipocálcicas formaram ossos hipoplásicos e hipomineralizados. A camada dentinária foi mais fina, com borda irregular entre a dentina e pré-dentina além de canais pulpares mais amplos. Além destas alterações, verificaram que o peso do grupo experimental foi significativamente mais baixo que o do controle.

Alguns elementos foram analisados no esmalte por meio da microanálise de RX e espectrometria de massa iônica. Segundo Jalevick *et al* (2001) o sódio, magnésio, carbono e estrôncio tem um papel importante como íons co-transportadores na membrana plasmática de células mineralizadas.

No esmalte hipomineralizado, entretanto, os autores observaram quantidades representativas destes elementos, verificando-se uma possível correlação entre eles e o conteúdo protéico do esmalte. Resultados da mesma pesquisa evidenciaram que altos conteúdos de magnésio e carbono têm sido correlacionados ao esmalte susceptível a cárie.

Os episódios de hipocalcemia são normais em crianças cujas mães tiveram a gravidez e o trabalho de parto complicados, (GITTLEMAN *et al*, 1956), crianças de mães diabéticas, nos casos de doenças renais, raquitismo, variando em torno de 26 a 50%. Em crianças prematuras Tsang *et al* (1976), encontraram um índice de 37.6% e uma relação entre baixo nível de cálcio e idade gestacional pequena. Houve correlação também entre baixo Boletim de Apgar a 1 minuto e níveis de cálcio no soro.

A hipocalcemia pode interferir na amelogênese, segundo Ranggard; Norén (1994) . Grupos de ratos foram alimentados com dieta hipocalcêmica durante 3 semanas e os resultados mostraram ratos menores, comparados com o grupo controle. Os ameloblastos sofreram alteração com o aparecimento de hipoplasias, além de atraso na deposição do conteúdo mineral durante o processo de maturação do esmalte. Os autores , entretanto, não consideraram os resultados significativos quanto `as mudanças ocasionadas pela dieta hipocálcica na estrutura do esmalte.

Stimmler *et al* (1975) afirmaram que a hipocalcemia é facilmente controlada num período de 3 a 4 dias. Estes autores estudaram 12 crianças que tinham tido hipocalcemia com valores do cálcio plasmático variando de 3,5 a 7,5 mg/100 ml.

Nove crianças haviam sido alimentadas com leite pasteurizado e 3 com leite em pó.

Os resultados mostraram que a hipoplasia estava ligada às crianças alimentadas artificialmente, com valores de 3,5 a 7,5 mg/100 ml no soro, enquanto que nas crianças alimentadas no seio, os valores subiram para 8,3 a 10,6 mg/100 ml. Neste trabalho, as lesões foram encontradas no terço incisal dos caninos, com perda de esmalte e exposições da dentina. Os primeiros molares, apresentaram uma banda marrom de esmalte hipoplásico nas superfícies oclusais e os segundos molares foram os menos afetados, com lesões situadas próximas aos terços cervicais das coroas.

As mudanças durante a formação da matriz do esmalte podem alterar permanentemente a estrutura dentária. O tecido ósseo, entretanto, tem a capacidade de reverter as alterações ocasionadas por erros no metabolismo e continuar seu desenvolvimento normal, caracterizando assim, uma situação de labilidade (MAY *et al*, 1993).

Em casos de dietas com baixo conteúdo de cálcio, segundo Lupozone; Favia (1989) fornecidas às ratas durante a gestação, não houve diferenças na microdureza e espessura do esmalte nos filhotes. Isto ocorreu pelo fato de que o leite fornecido supriu o conteúdo mineral necessário que foi retirado do esqueleto materno. Os ossos dos filhotes apresentaram-se menores, com crescimento lento e inábeis para compensar o déficit mineral da dieta.

A maior causa de doenças metabólicas nos ossos é a deficiência de substrato. Segundo Brooke; Lucas (1985), crianças alimentadas com leite materno podem apresentar concentrações baixas de fósforo no plasma. Isto ocorre devido a baixa concentração deste mineral (15 mg/100 ml), comparada às fórmulas para crianças normais (30 mg/100 ml) e para crianças prematuras (por volta de 40 mg/100 ml). Quanto ao índice de cálcio no leite materno, os valores são normais e até altos, havendo um aumento da excreção de cálcio na urina.

A deficiência de fósforo tem sido relacionada às doenças dos ossos. Isto porque, há uma grande demanda de fósforo para o crescimento dos tecidos moles e para o metabolismo do corpo. Quando a ingestão de fósforo é inadequada, o plasma reverte a queda e o fósforo é retirado do esqueleto Tsang *et al*,(1976), Netter(1965).

O cálcio não pode ser utilizado para o crescimento dos ossos na ausência de fósforo, sendo perdido na urina. Quando quantidades de fósforo são oferecidas para suprir as necessidades dos tecidos, haverá formação dos ossos e o cálcio será adequadamente absorvido, sendo reduzido na excreção da urina. Segundo os autores acima citados, o leite materno não consegue suprir totalmente a quantidade de cálcio e fósforo retirada pelo feto durante o último trimestre de gravidez, havendo a necessidade de suplementação dos conteúdos ideais desses elementos.

Vignarajah; Williams (1992), examinaram 482 crianças normais e verificaram que os caninos decíduos foram os dentes mais afetados pelos defeitos do esmalte (46%), seguidos pelos incisivos (23%) e primeiros molares (9%), acometendo mais as superfícies vestibulares e metade gengival dos dentes. As crianças com defeitos de esmalte, foram alimentadas com leite materno por um período menor de tempo, comparadas às crianças sem defeito. Estas crianças iniciaram a alimentação com mamadeira mais cedo que as outras, justificando assim, a relação entre deficiência no consumo de leite materno e defeitos do esmalte.

Noventa e uma crianças prematuras com baixo peso e 48 crianças normais foram avaliadas por Mellander *et al* (1982). No primeiro grupo 16 crianças tiveram hipoplasia e 11 tiveram opacidades, comparadas com 8 e 11 respectivamente no grupo controle. As crianças que apresentaram hipoplasia no grupo de baixo peso, tiveram um consumo mais baixo de leite materno e aquisição de peso mais tarde. Nenhuma diferença no grupo controle foi encontrada, quanto à alimentação.

Outros resultados demonstraram que crianças com distúrbios respiratórios tiveram hipoplasia, isto porque, a média de consumo de leite materno na primeira semana foi de $57,4 \pm 8,3$ ml/Kg/24 h comparados com crianças sem distúrbios, $74,4 \pm 3,1$ ml/Kg/24 h.

Seow *et al* (1989), afirmaram que uma das formas de evitar as doenças metabólicas dos ossos, seria a suplementação da alimentação de todas as crianças prematuras com cálcio e fosfato extra, e em alguns casos, com a vitamina D. Tsang (1973), indicou o uso do óleo de fígado de peixe para aumentar a vitamina do leite materno, além de exposição ao sol e dieta adequada no intuito de evitar doenças como o raquitismo e desnutrição.

3. PROPOSIÇÃO

O objetivo do trabalho foi estudar a influência de nutrientes, avaliando quantitativa e qualitativamente, o papel do cálcio e do fósforo na formação óssea e na odontogênese do rato.

4. METODOLOGIA

Foram utilizados ratos brancos (*Rattus norvegicus, albinus, Wistar*), divididos em grupos controle e experimental. As ratas foram alimentadas com uma dieta padrão e balanceada (Rhoister Indústria Ltda, São Paulo) denominada de AIN-93 (*American Institute of Nutrition 193*) , onde a ração M é administrada durante o período de manutenção e a G para o período de gestação (REEVES *et al* , 1993) (Anexo 1) e água *ad libitum*. Os filhotes recém-nascidos foram pesados (em gramas) e medidos (em centímetros) . Esta medida foi realizada mensurando o comprimento desde a cauda até o crânio do animal, sendo analisados e obtidos da seguinte forma:

Grupo Controle:

Quatro (4) ratas foram desmamadas com 21 dias. A partir desta data, foram alimentadas durante nove semanas (63 dias) com a ração específica para o período de manutenção (AIN-93M). As ratas foram cruzadas e durante a prenhez e lactação, alimentadas com a ração específica para o período gestacional (AIN-93G). Os filhotes nascidos foram amamentados e sacrificados com éter nas idades de 7, 14 e 21 dias.

Grupo Experimental:

Quatro (4) ratas foram desmamadas com 21 dias. A partir desta data, foram alimentadas durante nove semanas (63 dias) com a ração específica para o período de manutenção (AIN-93M). As ratas foram cruzadas e durante a prenhez e lactação, alimentadas com a ração experimental (AIN-93G) na qual a quantidade de cálcio e fósforo foi reduzida (Anexo 2). O percentual de redução foi de 0,04% em relação à ração do grupo controle (LUPUZONE; FAVIA, 1989 ; LUPUZONE; FAVIA, 1994) com valores para o cálcio de 400 mg/kg e para o fósforo de 415,2 mg/kg. Os filhotes nascidos foram sacrificados com éter.

Os períodos determinados para o sacrifício dos animais basearam-se nos estudos de Arana-Chavez (2001) . Após serem sacrificados, os animais foram pesados e medidos.

O desenho esquemático do projeto é o seguinte:

Total de mães: 08 Ratas

Total de filhotes: 22 Filhotes

Grupo controle: 04 Ratas e 11 filhotes

Entrega	Cruzamento	Morte dos filhotes
21 dias 9 semanas (63 dias)	Prenhez + Lactação	7 dias 14 dias 21 dias
Ração AIN – 93 M	AIN 93 G	

Grupo Experimental: 04 Ratas, 11 Filhotes

Entrega	Cruzamento	Morte dos filhotes
21 dias 9 semanas (63 dias)	Prenhez + Lactação	7 dias 14 dias 21 dias
Ração AIN – 93 M	AIN 93 G Hipomineralizada	

Análise do Conteúdo Mineral dos Ossos

Para a análise do conteúdo mineral dos ossos , o fêmur do lado direito foi retirado dos 11 (onze) filhotes do grupo experimental e dos 11(onze) filhotes do grupo controle. Para cada período analisado (7, 14 e 21 dias) ,os ossos do lado direito foram utilizados para o método de Calcinação e os do lado esquerdo, para análise histoquímica ,através de métodos colorimétricos para detecção de material inorgânico.

Calcinação

A Calcinação consiste em um método para analisar quantitativamente elementos inorgânicos em amostras de tecidos duros.Os elementos químicos analisados foram: cálcio, magnésio, potássio, ferro, fósforo, cobre , manganês e zinco. Os resultados são obtidos em ppm(partes por milhão) e percentagem(%)

- 1) **Preparo da amostra:** Após serem lavados com água destilada, os ossos dos animais foram pesados e posteriormente secados em estufa a 100°C por 24 horas. Após esse procedimento, foram quebrados em pedaços menores para facilitar a calcinação dos mesmos.
- 2) **Obtenção das Cinzas:** Cerca de 5 gramas dos ossos em estudo foram colocados em cadinho de porcelana e levados à mufla a 800° C por +/- 4 horas, ou por uma noite na mesma temperatura.

O material analisado foi esfriado e as cinzas recolhidas em Becker graduado de 100 ml. Adicionou-se 5 ml de HCL concentrado, com o intuito de dissolver toda a cinza, levando o volume final a 50 ml com H₂O destilada.

- 3) **Determinação:** Após o preparo da amostra, uma alíquota de 20 ml foi usada para fazer as determinações dos elementos em um equipamento denominado Plasma de Espectrometria Atômica (Thermo Jarrel Ash, IRIS/AP, USA, 1996) preparando uma curva de calibração para ajustamento, de acordo com a sensibilidade do mesmo (HARRIS, 1970).

Curva padrão para o plasma:

	Padrão 0	Padrão 1	Padrão 2	Padrão 3	Padrão 4
Elementos					
Cálcio	0	0.5	5.0	15.0	30.0
Magnésio	0	0.5	5.0	15.0	30.0
Potássio	0	0.5	5.0	15.0	30.0
Ferro	0	0.5	5.0	15.0	30.0
Fósforo	0	0.5	5.0	15.0	30.0
Cobre	0	0.5	5.0	15.0	30.0
Manganês	0	0.5	5.0	15.0	30.0
Zinco	0	0.5	5.0	15.0	30.0

Análise Histoquímica dos Ossos e Dentes

Para a análise histoquímica dos ossos, utilizou-se o fêmur do lado esquerdo e para a análise dos dentes, crânios. Os ossos e crânios dos animais com 7, 14 e 21 dias foram cortados longitudinalmente. As peças foram fixadas em formol a 10% por 48 horas, e depois, descalcificadas utilizando-se o descalcificador de Morse por 24 horas. Posteriormente foram desidratadas em álcool por 20 minutos e clarificadas em xilol por 2 horas, para diafanização.

Os materiais foram incluídos em parafina, para obtenção dos cortes. Estes foram feitos em 10 micra, montados em lâminas e corados com hematoxilina-eosina e pelo método de Von Kossa.

Para a verificação do material inorgânico, uma parte do material não foi descalcificado. Os ossos e crânios dos animais de 7, 14 e 21 dias foram incluídos em metacrilato de metila (resina acrílica auto polimerizável - marca JET) e cortados longitudinalmente pela lâmina do micrótomo.

Os cortes foram feitos utilizando-se um micrótomo para tecidos duros (marca Isomet 2000 Buheler, localizado no Departamento de Dentística da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP), na espessura de 100 micra. Para a obtenção de cortes mais finos, as peças foram lixadas manualmente, utilizando-se lixas d'água iniciando-se com a de número 300, depois a 400 e finalizando com a de 600.

Os materiais foram desincluídos da resina auto polimerizável , utilizando-se acetona comercial por 45 minutos. As peças foram lavadas em água destilada para remoção da acetona residual ficando prontas para a coloração.

Para a análise do conteúdo inorgânico , utilizou-se a Técnica de Von Kossa , que cora os depósitos de cálcio, mesmo os mais finos, em preto. Os materiais foram mergulhados em nitrato de prata a 5% (solução de uso: prata amoniacal), durante 35 segundos, variando até 1 minuto. Em seguida as peças foram 2 vezes mergulhadas em água destilada e posteriormente no revelador, (formol a 12%).

Em seguida, para a fixação da prata fez-se a lavagem em água e imersão dos materiais em tiosulfato de sódio por 3 a 5 minutos. Lavou-se em água destilada e fez-se a coloração com safranina aquosa a 1%, durante 3 a 5 minutos. Em seguida, retirou-se o excesso de corante com água, passando ao álcool absoluto por 5 a 8 minutos. Posteriormente passou-se para o 2º álcool, dando vários banhos no xilol durante 10 minutos, no 2º xilol por 5 minutos, e no 3º xilol por 3 minutos.

As peças foram montadas com entellan para a obtenção das lâminas , para serem observadas em Microscópio Óptico , com aumento de 40 x e 100 x.

Análise Estatística

Para a análise estatística do trabalho, utilizou-se a análise de variância para verificar o efeito do tratamento, idade e interação tratamento / idade para as variáveis peso, altura e elementos inorgânicos . As comparações das médias ajustadas foram feitas através do Teste " t " , com nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS

Os resultados mostraram que em relação ao peso dos animais houve diferença significativa pelo teste t, nos três períodos, ao comparar o grupo controle e o grupo tratado, encontrando valores médios de 31,12 e 11,65 gramas respectivamente ($p=0,05$). Resultados significativos também foram encontrados ao analisar o fator idade, independente do tipo de tratamento, com valores médios de 10,85 gramas (7 dias), 21,88 gramas (14 dias) e 31,42 gramas (21 dias).

Quando comparados os tratamentos para cada idade, observou-se que aos 7 dias, não houve diferenças significativas entre grupo tratado e controle, porém apenas para o período de 14 e 21 dias. Quando se estuda o efeito idade dentro do grupo, observou-se diferenças significativas em todas as idades para o grupo controle, e para o grupo tratado, apenas com 21 dias.

Em relação à altura, foram encontradas diferenças significativas pelo teste t ao comparar os grupos controle e tratado, nos três períodos, com valores médios de 13,77 cm e 10,26 cm respectivamente. Resultados significativos também foram encontrados ao analisar o fator idade, independente do tipo de tratamento, com valores médios de 9,15 cm (7 dias), 11,97 cm (14 dias) e 14,93 cm (21 dias).

Quando comparados os tratamentos para cada idade, observou-se que aos 7 dias, não houve diferenças para os dois grupos, porém apenas para os períodos de 14 e 21 dias. Quando se estuda o efeito da idade dentro do grupo, observou-se diferenças significativas em todas as idades, tanto para o grupo tratado quanto para o controle (Tabela 1).

Tabela 1 – Valores de médias* ajustadas pelo método dos quadrados mínimos (g) e altura (cm) no grupo controle e tratado quanto à idade (dias).

	PESO			ALTURA		
Idade	7	14	21	7	14	21
Grupos						
Controle	13,73aC	31,60aB	48,02aA	9,70aC	13,54aB	18,04aA
Tratado	7,99aB	12,15bB	14,82bA	8,60aC	10,40bB	11,80bA
F	27,06			21,96		
CV (%)	15,52			6,02		

* Médias seguidas de letras diferentes minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas diferem pelo teste t ao nível de significância de 5%.

Os resultados da calcinação pela análise dos elementos inorgânicos zinco (Zn), manganês (Mn), cobre (Cu), magnésio (Mg), e potássio (K), não mostraram diferenças estatisticamente significativas quanto aos grupos controle e o grupo tratado.

Estas observações também foram feitas ao analisar os elementos cálcio (Ca) e fósforo (P), com médias de 4,38 e 5,19 para o primeiro e 1,89 e 1,98 para o segundo elemento, nos respectivos grupos (Tabela 2).

Nenhuma correlação significativa foi observada quanto aos períodos analisados e entre os elementos. Entretanto, apenas os valores do ferro foram significativos com média de 128,50 ppm para o grupo controle e 180,13 ppm para o grupo tratado, em todas as idades.

Tabela 2 – Média dos elementos inorgânicos nos grupos controle e tratado

Elementos Inorgânicos	Grupo	Número	Média	t Student	Coefficiente de Variação (%)
Ca	controle	11	4,38 %	-1,29 ns	3,078
	tratado	11	5,19%		
Zn	controle	11	74,92%	1,00 ns	29,23
	tratado	11	65,26%		
P	controle	11	1,89 %	-0,29 ns	36,32
	tratado	11	1,98 %		
Cu	controle	11	4,15%	-2,19ns	19,51
	tratado	11	5,28%		
Mn	controle	11	29,09%	-1,91ns	25,84
	tratado	11	41,25%		
Fe	controle	11	128,50 ppm	-2,80 s	6,56
	tratado	11	180,13 ppm		
Mg	controle	11	0,02	1,28 ns	54,14
	tratado	11	0,03		
K	controle	11	0,04	-1,25 ns	33,75
	tratado	11	0,05		

ns: não significativo s: significativo

No estudo morfológico dos cortes descalcificados e não descalcificados observou-se que os processos de ossificação endocondral e intramembranosa do fêmur do rato, aos 07, 14 e 21 dias de vida não foram diferentes ao comparar o grupo controle e tratado.

Nas extremidades do ossos dos animais de 7 dias em que as células cartilaginosas diferenciaram-se a partir das células mensequimais – primeiro passo para o crescimento ósseo – observou-se, em ambos os grupos, a organização dos condrócitos em colunas longitudinais, a hipertrofia destas células, a mineralização da matriz cartilaginosa, a degeneração dos condrócitos e a formação de trabéculas ósseas em substituição à cartilagem (figuras 1 e 2). Nesta fase, observaram-se os osteoblastos, incluídos em tecido osteóide.

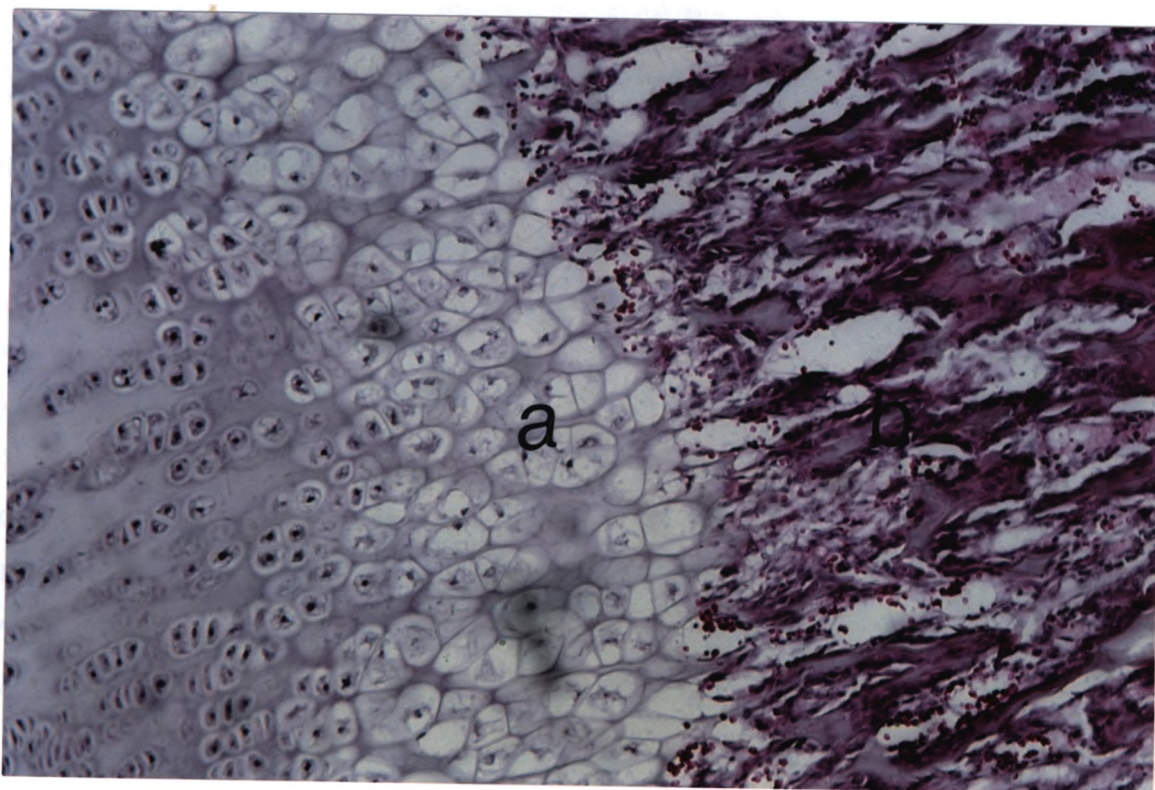


Figura 1 – Fêmur de rato com 7 dias(grupo controle). Observar condrócitos(a) em colunas longitudinais e trabeculado ósseo(b) em formação, (Microscopia óptica -Aumento: 100x).

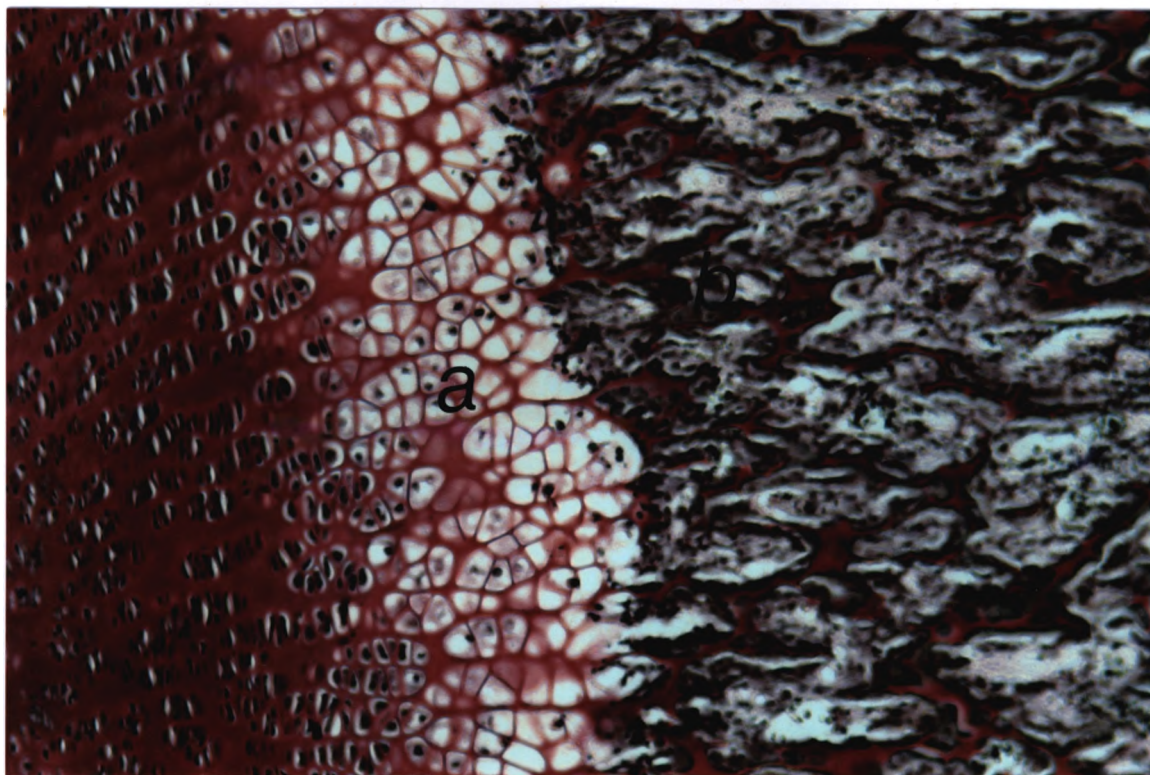


Figura 3 – Fémur de rato com 14 dias (grupo controle). Observar condrócitos (a) em colunas longitudinais e trabeculado ósseo (b) em formação evidenciados pelo método de Von Kossa (Microscopia óptica -Aumento: 100x).

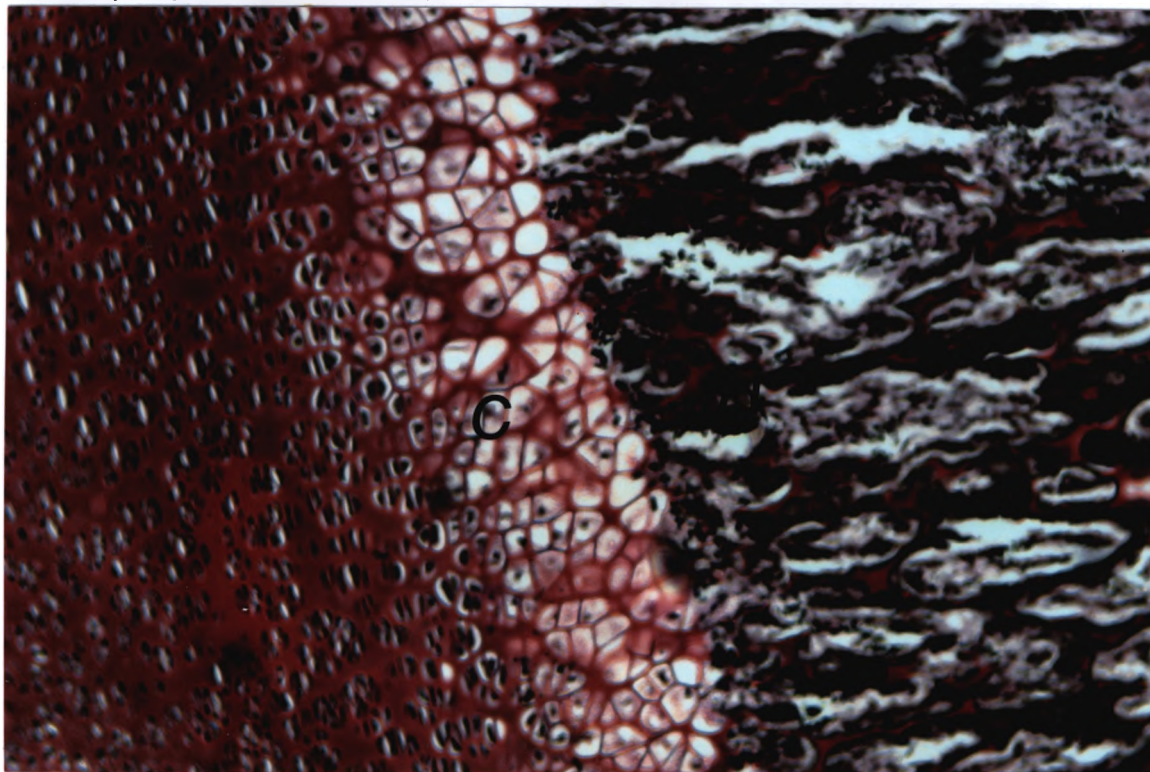


Figura 4 – Fémur de rato com 14 dias (grupo tratado). Observar condrócitos (c) em colunas longitudinais e trabeculado ósseo (d) em formação evidenciados pelo método de Von Kossa (Microscopia óptica -Aumento: 100x).

No período de observação de 14 dias, os aspectos morfológicos também exibiram características compatíveis com a normalidade, tanto no grupo controle, quanto no tratado, quando observadas a amelogênese (produção de matriz de esmalte) e a dentinogênese (figura 5). Aparentemente a odontogênese apresentou-se estar mais adiantada nos cortes dos animais do grupo controle.

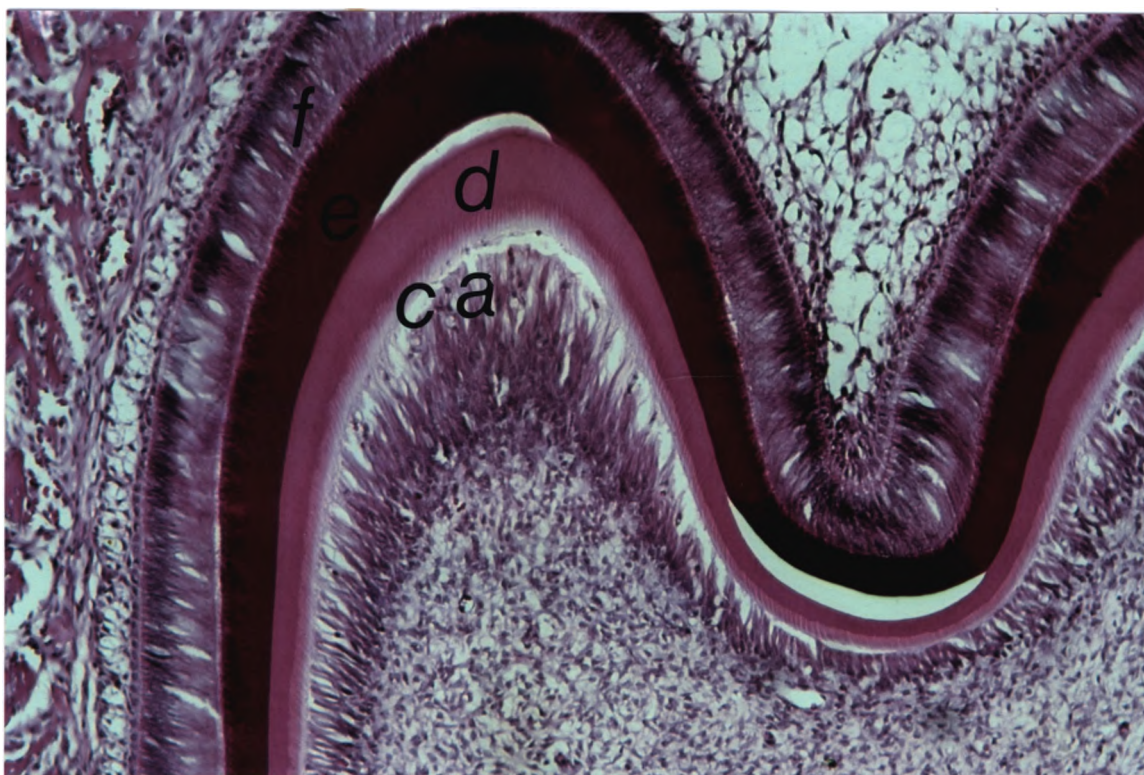


Figura 5 – Molar de rato com 14 dias (grupo tratado). Observar a camada odontoblástica (a) pré-dentina (c),dentina (d) ameloblastos (f) esmalte(e) (Microscopia óptica - Aumento: 40x).

Em relação aos animais com 21 dias, a amelogênese e a dentinogênese continuaram a exibir características morfológicas semelhantes nos grupos controle tratado. Entretanto, tornou-se nítida a diferença quanto ao atraso na odontogênese nos cortes do grupo tratado. Enquanto no controle todos os molares já apresentavam início da rizogênese, (figura 6), o mesmo não acontecia no grupo tratado. Os primeiros molares no grupo controle, por exemplo, já apresentavam um terço das raízes formado, e cúspides irrompidas na cavidade bucal, enquanto no grupo tratado, este estágio de erupção ainda não havia sido alcançado.

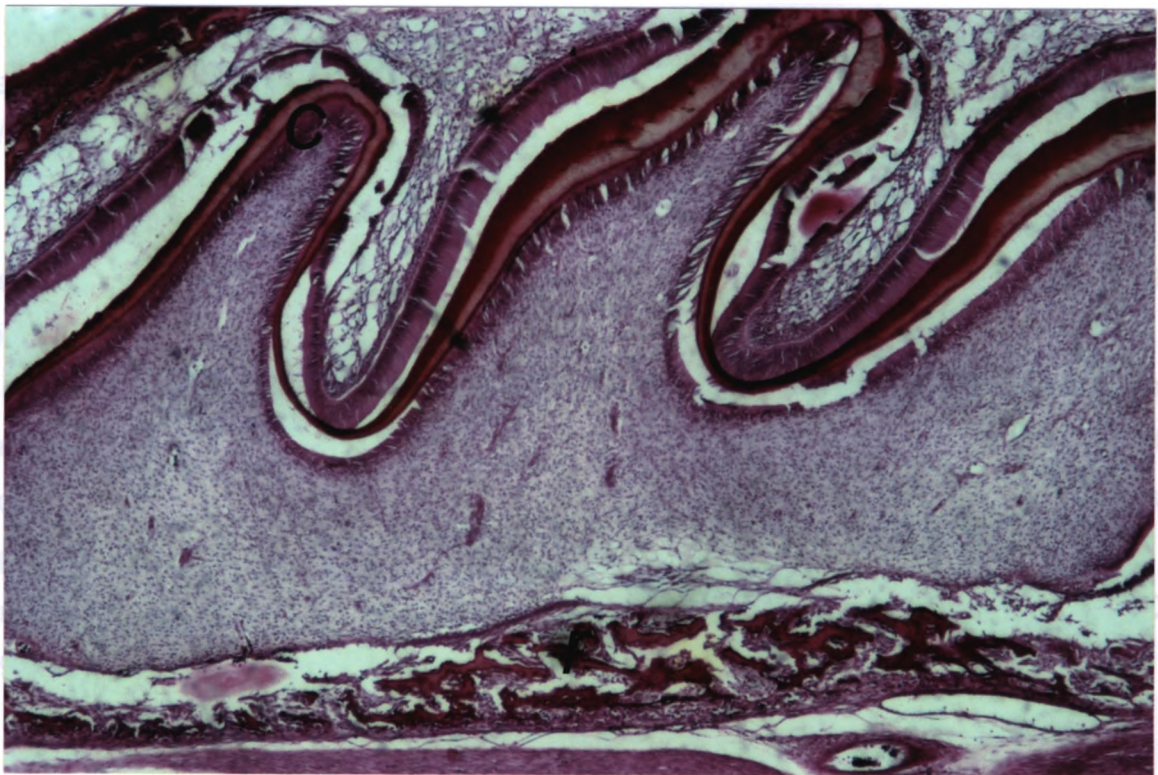


Figura 6 – Molar de rato de 21 dias (grupo controle). Observar a formação das cúspides (c) e início da rizogênese(r) (Microscopia óptica - Aumento: 40x).

6.DISCUSSÃO

As deficiências de nutrientes durante a osteogênese e a odontogênese trazem sérios prejuízos ao crescimento e desenvolvimento dos indivíduos. As alterações podem afetar não só a deposição da matriz orgânica, mas também da calcificação e maturação dos tecidos duros (MARCONDES, 1999; CAVALCANTI *et al*, 2003; RUGG-GUNN, 1998; NAVIA, 1973).

A desnutrição durante a gestação pode acarretar distúrbios temporários ou permanentes. Na estrutura óssea pode ser observada redução de tamanho, ossos hipoplásicos ou hipocalcificados (LOPUZONE & FAVIA, 1989; RANGGARD & NORÉN, 1994; FUTURA *et al*, 1999; SEOW *et al*, 1989). Em relação aos dentes, o metabolismo alterado durante os períodos de deposição e mineralização da matriz do esmalte pode gerar formações defeituosas, denominadas de hipoplasias e opacidades, comprometendo a estrutura do dente quanto à sua vulnerabilidade às maloclusões e cárie, além do atraso na erupção dentária (BEZERRA e TOLEDO, 1997; CAIXETA, 1995, GRAHNÉN *et al*, 1976, SEOW, 1991).

Ao serem analisados os resultados em relação ao peso, observaram - se diferenças significativas entre grupo controle e tratado. Nos ratos alimentados com dieta pobre em cálcio e fósforo, o peso foi menor nos três períodos (7,14 e 21 dias) com valores de 7,99 , 12,15 e 14,82 gramas quando comparados com o grupo controle, com valores de 13,73 , 31,60 e 48,02 gramas, respectivamente.

Estes resultados estão de acordo com os trabalhos de Lupozone, Favia (1994) que observaram pesos reduzidos nos ratos alimentados com uma dieta hipocalcêmica. Segundo Furuta *et al* (1999) dietas com baixo conteúdo de cálcio inibiram o crescimento geral no grupo experimental, exibindo um peso significativamente mais baixo que no controle, Entretanto, à medida que a dieta voltou ao normal, o peso lentamente aumentou.

De acordo com Kodali (1998) existe uma significativa correlação entre baixo

peso nas crianças má nutridas e um número reduzido de dentes na cavidade bucal.

Segundo o autor, houve um retardo nas medidas antropométricas, fato este observado por Martinez; Martin (1993) que verificaram também um diâmetro neurocranial menor no grupo experimental, em relação ao grupo controle.

Neste trabalho, observou-se que a altura foi menor no grupo tratado em comparação como o grupo controle, com valores médios de 10,26 cm e 13,77 cm, em todos os períodos, com médias em torno de 8,60 , 10,40 , 11,80 comparada com 9,70 , 13,54 e 18,04 respectivamente. Estes resultados mostraram que tanto o peso quanto a altura, nos três períodos, foram reduzidos significativamente.

Observou-se, portanto, que a nutrição deficiente em cálcio e fósforo durante o período gestacional prejudica o crescimento e desenvolvimento, cujos resultados revelaram animais menores e com baixo peso.

Segundo Johansson; Birkhed (1995) as deficiências de minerais como cálcio, fósforo e vitaminas A, C e D afetam a formação e mineralização dos tecidos duros como ossos e dentes, podendo ocorrer de forma isolada, combinada ou associada à outras doenças (SHELDON *et al*, 1995).

A presença de elementos químicos como zinco e ferro, segundo Begazo (1998), durante o período pré-eruptivo causa o aumento de lesões cariosas, devido à alteração na estrutura do esmalte. Ao contrário, Guimarães *et al* (2002) não observaram aumento no índice de cárie, já Kodali (1998) observou que o atraso na erupção e esfoliação dentária pode ocorrer devido a uma diminuição do magnésio, e que baixas concentrações de cálcio e fósforo estariam associados ao esmalte danificado (GAUNT; INVING, 1940).

Segundo Jalevick *et al* (2001), os elementos sódio, magnésio, carbono e estrôncio têm um papel importante na calcificação dos tecidos duros. Relataram que existe uma relação inversa entre o magnésio e estrôncio na relação cálcio/fósforo. Os autores observaram que o aumento desses elementos diminuiu a proporção de cálcio e fósforo nos tecidos e conseqüentemente trouxeram prejuízos à mineralização.

Neste trabalho, os resultados da calcinação demonstraram que ao quantificar

elementos químicos nos tecidos ósseos, verificou-se não haver diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e o grupo tratado, com valores médios para o cálcio em torno de 4,38% e 5,19% e para o fósforo 1,89% e 1,98% respectivamente. Nenhuma diferença significativa foi encontrada para os elementos zinco, manganês, magnésio, cobre e potássio. Ao contrário, o único valor estatisticamente relevante foi em relação ao ferro, onde os índices foram maiores para os animais do grupo tratado.

Nenhuma correlação positiva ou negativa foi encontrada entre os elementos, ao contrário do exposto por Jalevick *et al* (2001), Gaunt; Irving (1940), Kodali (1998). Embora Furuta *et al* (1999) houvessem observado ossos hipoplásicos e hipomineralizados em ratos alimentados com dietas hipocálcicas, Lupozone; Favia (1989) demonstraram que não houve diferenças na estrutura óssea dos filhotes.

Estes resultados corroboram aqueles observados neste trabalho, onde não foi verificada qualquer mudança no conteúdo mineral dos ossos, entre os dois grupos, o que poderia ocorrer, segundo Freitas *et al* (1994) devido ao efeito da desnutrição não ser o mesmo para todos os órgãos, havendo uma seletividade, na dependência das prioridades relacionadas à sobrevivência desse órgão. Além disto, o tecido ósseo é lábil, tendo a capacidade de reverter o estresse metabólico, ao retirar de outros órgãos seu suprimento necessário, mantendo suas características de normalidade (MAY *et al*, 1993).

Em relação às alterações morfológicas nos ossos e dentes, Sheldon *et al* (1945) mostraram que defeitos no esmalte estavam associados às deficiências nutricionais, com 73,1% das crianças desnutridas apresentando hipoplasia linear, segundo Infante; Gillespie (1974). Estes autores verificaram que os defeitos eram resultantes de interferências ameloblásticas durante o período de deposição da matriz.

Grahnén *et al* (1976), entretanto, não observaram diferenças significativas quanto ao aparecimento de hipoplasias em pacientes cujas mães tiveram desnutrição intra-uterina comparadas àquelas normais, pois segundo Schour (1939), o feto estaria muito bem protegido e o metabolismo materno teria pouca influência sobre os dentes das crianças.

Em relação aos ossos, neste trabalho, verificou-se que nos períodos de 7,14 e 21 dias, o desenvolvimento ósseo foi normal em relação à organização dos condrócitos, mineralização da matriz cartilaginosa e início da formação do trabeculado ósseo, tanto no grupo controle, quanto no tratado.

Todos esses processos ocorreram normalmente e apenas a velocidade de ossificação tornou-se mais lenta no grupo tratado, refletindo-se em ossos menores que o normal, estando de acordo com Ranggard; Norén (1994) que ao administrarem dietas hipocálcicas às mães durante a gestação, observaram nos filhotes estes mesmos resultados.

Os aspectos morfológicos dos dentes apresentaram-se normais em relação ao grupo controle e grupo tratado, em todos os períodos, apenas demonstrando um atraso na rizogênese e conseqüentemente na erupção nos grupos tratados, de acordo com Martinez; Martin (1993) e Kodali (1998).

As camadas ameloblástica e odontoblástica apresentaram-se normais em relação à formação de esmalte, dentina e pré-dentina. Estes resultados estão de acordo com Lupozone; Favia (1989) que verificaram não haver diferenças na espessura e microdureza do esmalte nos filhotes. A deficiência no esmalte seria resolvida pela aquisição de conteúdos minerais normais advindos do leite materno que retirou dos ossos mais de 50% de seus nutrientes.

Os autores verificaram que quando esses filhotes foram alimentados com uma dieta baixa em cálcio, após o desmame, a mineralização do esmalte e dentina foi retardada devido às reservas de minerais serem inadequadas. Segundo Tsang *et al* (1976) e Marcondes (1999), o indivíduo teria que conseguir minerais de suas próprias reservas e de fontes exógenas para restabelecer os níveis séricos normais.

Lopuzone; Favia (1994) observaram os mesmos resultados após o desmame, com dentes de raízes menores e ameloblastos com espessura normal, porém com o esmalte desmineralizado. Na dentina, a deposição da matriz foi reduzida, mas a calcificação foi quase normal, enquanto Furuta *et al* (1999) verificaram uma camada dentinária mais fina e com bordas irregulares entre a pré-dentina e dentina, e espaços interglobulares, demonstrando um padrão de amolecimento (NAKAGAWA *et al* (1996).

Bonucci *et al* (1994) observaram filhotes amamentados por mães em uma baixa dieta de cálcio e posteriormente alimentados com a mesma dieta e verificaram uma matriz orgânica normal, e um esmalte formado por cristais normais em quase sua totalidade porém mais finos nas zonas interprismáticas.

Estes autores verificaram a presença de esmalte hipoplásico através de cortes não descalcificados e embora Jalevick *et al* (2001) tenham verificado alterações nos ameloblastos e atraso nos processos de maturação do esmalte e dentina, os autores não consideraram relevantes as mudanças ocasionadas pela dieta hipocálcica na estrutura do esmalte.

Os resultados obtidos no presente trabalho confirmam aqueles da literatura nos quais foi observado que a desnutrição na gestação não provoca alterações morfológicas nos ossos e dentes dos filhos, isso porque, o conteúdo mineral requerido por estes seria obtido totalmente da retirada de nutrientes do esqueleto materno. Essas alterações só ocorreriam se os filhos fossem alimentados, após o desmame, com uma dieta pobre em minerais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARANA-CHAVES, V. E. **Formação e mineralização dos tecidos dentários e do tecido ósseo.** (Tese de Livre Docência) Universidade de São Paulo – 2001, 35p.

BEGAZO, P. M. Importância da nutrição e da dieta na cárie dentária (trabalho para o mestrado- USP, 1998).

BEZERRA, A.C.B; TOLEDO, O. A. Nutrição, dieta e Cárie. In: **ABOPREV. Promoção da Saúde Bucal**, São Paulo: Artes Médicas, 1997. p. 43 - 67.

BONUCCI, E.; LOIA, ANI, G.; FAVIA, ANI, G.; FAVIA, A.; NOCETTI, P. – Morphological studies of hypomineralized enamel of rat pups on calcium – deficient diet, and of its changes after return to normal diet. **Am J Phys Antropol.** 239 p. 379-395, February, 1994.

BROOKE, O. G.; LUCAS, A. Metabolic bone disease in preterm infants. **Arch Dis Child**, v. 60, p. 682-85, 1985.

CAVALCANTI, C. L; GONÇALVES, V. B; VALENÇA, A.M.G; CAVALCANTE A.L; VIEIRA, R. K.A. Estado Nutricional de pré-escolares e Valor Nutricional da Merenda Escolar oferecidas em creches públicas da Paraíba – PB. **Pesq. Bras. Odontoped. Clin. Integr.** V. 3, n.1, jan-jun. 2003.

CAIXETA, F. F. **Estudo dos defeitos do esmalte e padrão de erupção dentária em crianças prematuras na faixa etária de 6 meses a 6 anos de idade.** (Tese de Mestrado – USP), 1995.

FREITAS, R. A; SOUZA, L.B; PINTO, L.P. Análise morfológica e morfométrica de glândulas parótidas de ratos submetidos a diferentes graus de desnutrição protéica. **Rev. Odontol.** Univ São Paulo. V. 8, n. 1, p. 43-49, jan-mar. 1994.

FURUTA, T. SHIIZU, Y. TAKAHASHI, I.; MITANI, H. Formation and mineralization of murine molar roots with hypocalcemia induced by a low calcium diet and the changes after returning to a normal diet. **Archives of Oral Biology** 44 (8) p. 629-39, August, 1999.

GAUNT, W. W.; IRVING, J. T. The influence of dietary calcium and phosphorus upon tooth formation. **J Physiol**, v. 99, p. 18-29, 1940.

GITTLEMAN, I. F.; PINCUS, J. B.; SCHUMERZLER, B. S.; SAITO, M. Hypocalcemia occurring on the first day of life in mature and premature infants. **Pediatrics**, v. 18, p. 721-29, 1956.

GRAHNEN, H.; HOLM, A. K.; MAGNUSSON, B.; SJÖLIN, S. Mineralization defects of the primary teeth intra-uterine undernutrition. **Caries Res**, v. 6, n. 4, p. 224-28, 1976.

GUIMARÃES, R.C; COUTO, G. B. L; VASCONCELOS, M.M.V. B.; BOTELHO,

- K.V.G. Perfil Epidemiológico de pacientes infantis, nutridos e desnutridos. **Odontologia. Clin-Cientifi.**, V. 1, n. 2, p. 103-108, maio/ago, 2002.
- HEANEY, R. P. Dietary protein and phosphorus do not affect calcium absorption. **Am. J Clin Nutr**; 72:758-61, 2000.
- HARRIS, L.G. **Compilação de dados analíticos e biológicos para o preparo de tabelas de composição de alimentos para uso nos trópicos da América Latina.** University of Flórida, Gainesville, Flórida, 1970.
- INFANTE, P. F.; GILLESPIE, G. M. Na epidemiologic study of linear enamel hypoplasia of deciduous anterior teeth in guatemalan children. **Arch Oral Biol**, v. 19, n. Sc, p. 1055-1061, Nov. 1974.
- JALEVICK, B. ODELIUS.; DITZ, W.; NORÉN, J.G. Secondary ion mass spectrometry and X-ray microanalysis of hypomineralized enamel in human permanent first molars. **Archives of Oral Biology** 46, p. 239-47, 2001.
- JOHANSSON, I; BIRKHED, D. A cárie e o processo cariogênico. In: Thylstrup, A; Fejerskov, O. **Cariologia Clínica.** 2 ed. São Paulo: Santos, 1995, p. 283-310.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica.** 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, 488 p.
- KATCHBURIAN, E; ARANA-CHAVES, V. **Histologia e Embriologia Oral.** Rio de Janeiro: Médica Panamericana, 1999. 381p.
- KING, N.M.; WEI, S.H. Developmental defects of enamel: a study of 12 years old in Hong Kong. **J. Am Dent Assoc**, 12 (6) p. 835-39, June, 1986.
- KODALI, V.R.R. The interface of Nutrition and dentition. **Indian J. Pediatr.** 65 (4): 529-39, 1998.
- KRONFELD, R.; SCHOUR, I. Neonatal dental hypoplasia. **J Am Dent Assoc**, v. 26, p. 18, Jan. 1939.
- LUPOZONE, E; FAVIA, A. Effects of a low calcium maternal and weaning diet on the thickness and microhardness of rat incisor enamel and dentine. **Archs oral Biol.** V. 34, n.7, p. 491-498, July/Dec, 1989.
- LUPOZONE, E; FAVIA, A. Morphometric analysis of the deposition and mineralization of enamel and dentine from rat incisor during the recovery phase following a low – calcium regimen. **Archs oral Biol.** V. 39, n.5 p. 409-416, 1994.
- MARCONDES, E. **Pediatria básica.** 8 ed. São Paulo: Savier, 1999. v. 1.
- MARTINEZ, M.M; MARTIN, F.C. Evaluación del crecimiento craneofacial y del desarrollo de la dentición em niños malnutridos fetales. **Rev Cubana Ortod** 8 (2): 10-15, July/diciembre, 1993.
- MAY, R. L.; GOODMAN, A. H.; MEINAL, R. S. Response of bone and enamel formation to nutritional supplementation and morbidity among malnourished

- guatemalan children. **Am. J Phys Antropol** **92** (1) p. 37-51, May, 1993.
- MELLANDER, M.; NOREN, J. G.; FREDÉN, H.; KJELLMER, I. Mineralization defects in deciduous teeth of low birthweight infants. **Acta Paediatr Scand**, v. 71, n. 5, p. 727-733, Sept. 1982.
- NAKAGAWA, N. Y.; KANAMOTO, Y., SOBUE, S.; OOSHIMA, T. – Effects of serum phosphate level on formation of incisor dentine in hypophosphatemic mice. **J Oral Pathol Med**, 25, p. 182-7, 1996.
- NAVIA, M. J. Prospects for prevention of dental caries: dietary factor. **J Am Dent Assoc**, v. 87, n. 5, p. 1010-12, Oct. 1973.
- NETTER, F, H. **Endocrine System anal Selected Metabolic Diseases**. USA: CIBA, 1965, 289 p.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE - OMS/WHO. Alimento e Nutrição. 2000.
- RAMOS, J. L.; LEONE, C. R. **O recém-nascido de baixo peso**. São Paulo: Savier, 1986, p. 127-9.
- RANGGARD, L.; NORÉN, J. G. Effect of hypocalcemic state on enamel formation in rat maci incisors **Scand J. Dent Res**. 102 (5) p. 249-53, octobe, 1994.
- RANSBURG, B.G. J. **Oral Biology, Quintessence**, cap 15, p. 389-399, 1997.
- REEVES, P.G; FORREST, H.N. GEORGE, C. F. Jr. **AIN 93 Purified Diets Laboratory Rodents**: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committie on Reformulation of the AIN -76A Rodent Diet, 1939- 1952,1993.
- ROBINSON, C.; R, KIRKHAM, J; BRIGGS, H.D; ATXINSON, P.J. Enamel protes: from secretion to maturation. **J. Dart Res**, v. 61, p. 1490-95, Special, 1982.
- RUGG-GUNN, A.J; AL-MOHAMADI, S.M; BUTLER, T.J. Malnutrition and Developental Defects of Enamel in 2-to 6 year-old. Saudi Boys. **Caries Res** 32(3) p. 182-92, may/june, 1998.
- SEGRE, C. A. M. **Recém- Nascido**. São Paulo: Savier, 1985, p. 3-179.
- SEOW, W. K.; MASEL, J. P.; WEIR, C.; TUDEHOPE, D. I. Mineral deficiency in the pathogenesis of enamel hypoplasia in prematurely born, very low birthweight children. **Pediatr Dent**, v. Sc, n. 4, p. 297-302, 1989.
- SEOW, W. K. Enamel hypoplasia in the primary dentition: a review. **J Dent Child**, v. 58, n. 6, p. 441-452, Nov./Dec. 1991.
- SHELDON, M.; BIBBI, G. B.; BALES, M. S. The relationship between microscopic enamel defects and infatile debilities. **J Dent Res**, v. 24, n. 1, p. 109-116, Fev. 1945.
- STIMMLER, L.; SNODGRASS, G. J.; JAFFE, E. Dental defects associated with neonatal symptomatic hypocalcemia. **Arch Dis Child**, v. 48, p. 217-20, 1975.

TEN CATE, A.R. **Histologia Bucal, Desenvolvimento, Estrutura e Função**. 5ª ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2001,439p .

TSANG, R. C.; LIGHT, I. J.; SUTHERLAND, J. M.; KLEINMAN, L. T. Possible pathogenitic factors in neonatal hypocalcemia of prematurity. **J Pediatr**, v. 82, n. 3, p. 423-9, Mar. 1973

TSANG, R. C.; DANAVAN, E. F.; STEINCHEN, J. J. Calcium physiology pathology in the noenato. **Pediatr Clin Norht Am**, v. 23, n. 4, p. 611-625, Nov. 1976.

VIGNARAJAH, S.; WILLIAMS, G. A. Prevalence of dental caries and enamel defects in the primary dentition of Antiguan pre-school children aged 3 – 4 years including an assessment of their habits. **Community Dent Health**, v. 9, n. 4, p. 349-360, Feb. 1992.

ANEXOS

ANEXO I

Contribuição dos elementos minerais para as dietas AIN 93G e AIN 93M quando as misturas minerais recomendadas AIN 93 - MX respectivamente, são oferecidas em 35g /Kg por dieta.

	DIETA	
	AIN-93 G	AIN – 93 M
	Mg/kg dieta	
Elementos Minerais Essenciais		
Cálcio	5000.0	5000.0
Fósforo	1561.0	1992.0
Potássio	3600.0	3600.0
Sulfa	300.0	300.0
Sódio	1019.0	1019.0
Cloro	1571.0	1571.0
Magnésio	507.0	507.0
Ferro	35.0	35.0
Zinco	30.0	30.0
Manganês	10.0	10.0
Cobre	6.0	6.0
Iodo	0.2	0.2
Molibidênio	0.15	0.15
Selênio	0.15	0.15
Elementos Minerais potencialmente benéficos		
Sílica	5.0	5.0
Cromo	1.0	1.0
Flúor	1.0	1.0
Níquel	0.5	0.5
Boro	0.5	0.5
Lítio	0.1	0.1
Vanádio	0.1	0.1

ANEXO II

**Cálculo da Percentagem de Cálcio e Fósforo
da Ração AIN 93 –G E AIN 93 – M**

1 Kg _____ 1.000 gramas e 1 g _____ 1.000 mg

1 g _____ 1000 mg
x _____ 5000 mg

Cálcio

$$x = \frac{5.000}{1000}$$

—————>

5 gramas de Cálcio

↓

AIN – 93 G/ AIN – 93 M

1 g _____ 1000 mg
x _____ 1561.0 mg

Fósforo

$$x = \frac{1.561.0}{1000}$$

—————>

1,561 gramas

↓

AIN – 93 G

$$x = \frac{1.992.0}{1000}$$

—————>

1,992 gramas

↓

AIN – 93 M

**SAIS
Total
AIN 93 G**

—————>

**(1 3647,7 mg)
(13648 mg)**

—————>

13,648 g

AIN 93 M

—————>

14079 mg

—————>

14,079 g

AIN 93 G

$$\begin{array}{l} 1000 \text{ g} \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad 100\% \text{ do peso} \\ 13648 \text{ g} \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad x \quad (\text{Peso total de Sais}) \end{array}$$

x = 1,3648 % De Sais em relação ao peso total da Ração

AIN 93 M

$$\begin{array}{l} 1000 \text{ g} \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad 100\% \text{ do peso} \\ 14,079 \text{ g} \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad x \quad (\text{Peso total de Sais}) \end{array}$$

x = 1,4079 % De Sais em relação ao peso total da Ração

Cálcio (AIN 93 G)

$$\begin{array}{l} 5 \text{ g} \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad X (\%) \\ 13,648 \text{ g} \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad 1,3648 \% \end{array}$$

x = 0,5% de Cálcio - Normal em Relação ao peso total da Ração

Cálcio (AIN 93 M)

$$\begin{array}{l} 5 \text{ g} \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad X (\%) \\ 14,079 \text{ g} \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad 1,4079 \% \end{array}$$

x = 0,5% de Cálcio - Normal em relação ao Peso total da ração.

$$\begin{array}{l} 5.000 \text{ mg} \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad X \\ 13,648 \text{ m g} \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad 100\% \end{array}$$

x = 36,64%

Então:

Total de Sais da Ração 13.648 mg/kg corresponde à 36,64% de Ca em relação ao total de Sais .

Considerando-se 0,5% da quantidade de Ca da Ração Base, temos:

$$\begin{array}{ccc} 0,5\% & \text{---} & 100\% \\ 0,04 & \text{---} & x \end{array} \quad \longrightarrow \quad 8\% \text{ de Ca na Ração baixa}$$



Lupuzone (1994)
Lupuzone, Navia (1994)

$$\begin{array}{ccc} 5.000 & \text{---} & 100\% \\ x & \text{---} & 8\% \end{array}$$

$$x = 400 \text{ mg/kg}$$

Ração Experimental

Fósforo AIN G

$$\begin{array}{ccc} 1,561 \text{ g} & \text{---} & x (\%) \\ 13,648 \text{ g} & \text{---} & 1,3648 \end{array}$$

x = 0.1561 % de fósforo normal em Relação ao peso total da ração

$$\begin{array}{ccc} 1561.0 \text{ mg} & \text{---} & x \\ 13648 \text{ mg} & \text{---} & 100\% \end{array}$$

11,48 de Fósforo

AIN 93 G

$$\begin{array}{ccc} 1992.0 \text{ mg} & \text{---} & x \\ 14079 \text{ mg} & \text{---} & 100\% \end{array}$$

14,14 de Fósforo

AIN 93 G

Considerando-se na razão base (AIN 93)

$$\begin{array}{r} 0,15 \text{ --- } 100\% \\ 0,04 \text{ --- } X \end{array}$$

$$x = 26,6\%$$

AIN 93 M

$$\begin{array}{r} 0,19 \text{ --- } 100\% \\ 0,04 \text{ --- } X \end{array}$$

$$x = 21,0 \%$$

AIN 93 G

$$\begin{array}{r} 1561.0 \text{ mg --- } 100\% \\ x \text{ --- } 26,6\% \end{array}$$

415,2 mg

AIN 93 M

$$\begin{array}{r} 1992.0 \text{ mg - } 100\% \\ x \text{ --- } 21\% \end{array}$$

418,3 mg