

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**ANÁLISE DOS COMPONENTES VOLUMÉTRICOS
DA LINHA NEONATAL E ESMALTE
CIRCUNJACENTE**

Eugênia Lívia de Andrade Dantas



EUGÊNIA LÍVIA DE ANDRADE DANTAS

**ANÁLISE DOS COMPONENTES VOLUMÉTRICOS DA LINHA
NEONATAL E ESMALTE CIRCUNJACENTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título Mestre em Odontologia – Área de de Concentração em Ciências Odontológicas.

Orientador: Profa. Dra. Raquel Fernanda Gerlach

Coorientador: Prof. Dr. Frederico Barbosa de Sousa

João Pessoa

2018

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

D192a Dantas, Eugênia Lívia de Andrade.
ANÁLISE DOS COMPONENTES VOLUMÉTRICOS DA LINHA NEONATAL
E ESMALTE CIRCUNJACENTE / Eugênia Lívia de Andrade
Dantas. - João Pessoa, 2018.
59 f. : il.

Orientação: Raquel Fernanda Gerlach.
Coorientação: Frederico Barbosa de Sousa.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Esmalte dentário; Dente decíduo, Histologia. I.
Gerlach, Raquel Fernanda. II. Sousa, Frederico Barbosa
de. III. Título.

UFPB/BC



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA



ATA DA DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
(DOCUMENTO ANEXO – 1)

A Comissão Examinadora do Trabalho Final (dissertação) de Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal da Paraíba, em sessão pública, após apreciação da apresentação oral e arguição do trabalho:

CANDIDATO: Eugênia Lívia de Andrade Dantas

ORIENTADOR: Profa. Dra. Raquel Fernanda Gerlach

BANCA EXAMINADORA:

1º Examinador: Profa. Dra. Lucianne Cople Maia (Membro Externo)

2º Examinador: Prof. Dr. Yuri Wanderley Cavalcanti (Membro do PPGO)

3º Examinador: Prof. Dr. Frederico Barbosa de Sousa (Coorientador e Presidente)

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Análise dos componentes volumétricos da linha neonatal e esmalte circunjacente."

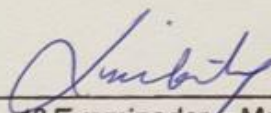
Houve sugestão de alteração do título do trabalho final? () Sim (X) Não

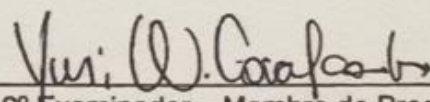
Se sim, qual o novo título sugerido?

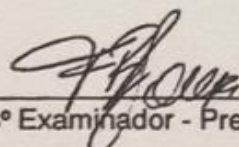
no dia 14 de dezembro de 2018, e observando o que determina a Resolução nº03/13 do Colegiado do Programa de Pós-graduação em Odontologia atribuem o conceito final:

(X) Aprovado () Insuficiente () Reprovado

ao candidato o que lhe permitirá fazer jus ao título de Mestre em Odontologia, após a tramitação pertinente.


1º Examinador – Membro Externo


2º Examinador – Membro do Programa


3º Examinador - Presidente

Universidade Federal da Paraíba – Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-graduação em Odontologia – Campus I – Cidade Universitária
João Pessoa – PB CEP – 58051-900 Fone: (83) 3216-7797
www.ufpb.br/pos/odontologia

DEDICATÓRIA

A minha mãe Socorro, minha principal incentivadora e, além de mãe, melhor amiga. A quem eu devo o meu caráter e disciplina. Meu maior exemplo de amor, dignidade e perseverança.

AGRADECIMENTOS

A Deus,

Por iluminar os meus passos, por me permitir realizar tantos sonhos e por me fazer sentir a sua presença de forma constante. Obrigada Senhor, por todas as bênçãos!

A minha família,

Em especial aos meus pais **Socorro** e **Dantas**, em que eu encontro as forças que eu preciso para prosseguir. Obrigada pelo amor, pelo incentivo, por acreditarem no meu futuro e por sonharem os meus sonhos comigo. Tudo o que sou devo a vocês. A minha irmã **Emanuelle**, minha parceira de vida, sempre tão presente e amiga. Ao meu irmão **Segundo**, pelos votos de felicidade.

A Máximo Costa,

Por todo o seu amor, companheirismo e compreensão. Por me ouvir e me aconselhar sempre que preciso. Obrigada meu amor, por fazer parte dessa conquista e por tornar essa jornada mais leve.

Ao Prof. Frederico Sousa,

Pela orientação, por ter depositado em mim tanta confiança. Pela dedicação e seriedade ao conduzir os seus alunos na carreira acadêmica. Obrigada professor, pelo apoio e incentivo. Agradeço por me apresentar novas metodologias, por me dar a oportunidade de trabalhar com a Microtomografia Computadorizada e participar de tantas pesquisas.

A Profa. Raquel Gerlach,

Pela orientação e pelos dias que passei na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP. Obrigada pela oportunidade!

A Profa. Ana Maria Barros Chaves, a Profa. Lucianne Cople Maia e a Profa. Ana Maria Gondim Valença,

Pelas contribuições realizadas durante o exame de qualificação agregando considerações relevantes. A profa. Ana Maria Gondim tem grande importância na minha formação, foi minha orientadora durante a graduação e eu não poderia deixar de agradecer por todos os ensinamentos. A senhora é um exemplo de ética e profissionalismo. Ao Prof. Yuri Cavalcanti, obrigada por se mostrar sempre disponível e por aceitar o convite de fazer parte desse momento.

Ao meu amigo Basílio,

Exemplo de determinação e coragem. A sua garra e vontade de crescer são inspiradores. Agradeço por ter compartilhado comigo dos piores aos melhores momentos desses dois anos. Vivemos experiências memoráveis, as noites no laboratório para os “intensivoes” e os lanches para aguentar horas de estudos e trabalhos ficarão na memória. Levarei a sua parceria para a vida, tanto acadêmica, quanto pessoal. Você é um amigo completo!

Aos meus amigos do Lamib,

A Hugo por todo o apoio, incentivo, por compartilhar um pouco da sua vida e de suas experiências comigo diariamente. Não tenho dúvidas que o seu futuro será de muito sucesso e eu estarei na torcida

pela concretização dos seus sonhos. Conte comigo sempre! A Malu, Marina, Gabriel, Alice e Léo, vocês fizeram parte da minha trajetória como mestrande e, sem dúvidas, compartilhamos bons momentos no laboratório. Desejo muita luz e sucesso em seus caminhos.

Aos grandes amigos que ganhei durante o mestrado:

Duda, Karol, Ilky, Luíza e Amanda,

Vocês foram imprescindíveis para a conclusão dessa etapa. Sou grata pelas conversas constantes, pela companhia sempre que possível e pela torcida mútua que há entre nós.

A Profa. Karla Roxaris,

Por todo o apoio e conhecimento passado a cerca da Micro-Ct e da vida. Sempre linda, educada e disposta a ajudar. Obrigada por tudo!

Aos Profs. do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFPR.

Por todo ensinamento e disponibilidade.

A Capes,

Pela concessão da bolsa de mestrado durante o curso.

A todos que contribuíram de alguma forma e torceram para que essa etapa fosse concluída.

Muito obrigada!

EPIÍGRAFE

“Aquele que é poderoso para fazer infinitamente mais do que tudo quanto pedimos ou pensamos, de acordo com o seu poder que opera em nós. A Ele seja a glória, por todas as gerações, para todo o sempre! Amém!”

Efésios 3: 20-21

RESUMO

Introdução: A linha neonatal é uma marcação de estresse fisiológico ocorrido durante o estágio de secreção do esmalte, afetando todos os dentes decíduos e o primeiro molar permanente. Sabe-se que alterações estruturais caracterizam a linha neonatal e que não há estudos sobre os componentes volumétricos do esmalte da linha neonatal. **Objetivo:** Analisar a variação dos componentes volumétricos (mineral, orgânico e de água) da linha neonatal e no esmalte circunjacente (esmalte pós e pré-natal). **Metodologia:** Foram utilizados 17 dentes decíduos incisivos humanos, dos quais foram obtidos cortes histológicos longitudinais por desgaste. Em cada secção foram analisados 5 pontos histológicos do esmalte (2 pontos pré-natais, a linha neonatal e 2 pontos pós-natais) distantes 40 μm entre si, em que os volumes bioquímicos foram quantificados. O volume mineral foi determinado através de radiomicrografia digital e os volumes de matéria orgânica e de água por meio da quantificação do valor de birrefringência, obtido em microscópio de luz polarizada. Os dados foram submetidos a teste de normalidade, apresentando uma distribuição normal. Utilizou-se o teste ANOVA de um fator para medidas repetidas seguido do teste t pareado, com $\alpha=5\%$. Também foi testada a hipótese de que o volume mineral diminui à medida que se aproxima da linha neonatal, através da Correlação de Pearson. **Resultados** Foram observadas variações no volume mineral ($p=2,15 \times 10^{-4}$; $\eta^2=0,07$), no volume orgânico ($p=9,9 \times 10^{-9}$; $\eta^2=0,07$) e no volume de água ($p=5,8 \times 10^{-5}$; $\eta^2=0,05$) conforme a área avaliada. A linha neonatal apresentou os seguintes valores médios para componentes volumétricos: 85,88% (volume mineral), 6,44% (volume orgânico) e 7,68% (volume de água). O volume mineral na Linha Neonatal foi menor que no esmalte pós-natal ($p=1,38 \times 10^{-4}$; $G=1,20$; IC 95%=2,00/0,42; poder=99,43%) e pré-natal ($p=8,44 \times 10^{-7}$; $G=1,88$; IC95%=2,75/1,01; poder= 99,99%). Uma correlação negativa (coeficiente $r=0,451$; IC 95%= 0,606-0,283; $p=1,48 \times 10^{-5}$, poder de 99,30%) entre a distância da linha neonatal e o volume mineral normalizado foi verificada. O volume orgânico na linha neonatal foi maior que no esmalte pós-natal ($p=3,80 \times 10^{-4}$; $G=1,09$; IC95%=1,86/0,31; poder=98,43%) e pré-natal ($p=1,75 \times 10^{-6}$; $G=1,77$; IC95%=2,63/0,91; poder=99,99%) e o volume de água na linha neonatal foi maior que no esmalte pós-natal ($p=1,96 \times 10^{-3}$; $G=0,90$; IC95%= 1,66/0,13;

poder=93,27%), e pré-natal ($p=7,60 \times 10^{-4}$; $G=1,01$; $IC95\%=1,78/0,23$; poder=97,01%). **Conclusão:** A linha neonatal é um esmalte hipomineralizado com alto conteúdo orgânico e de água em comparação com as regiões pré e pós-natais. O volume mineral dessas regiões apresentou-se diminuído à medida que se aproxima da linha neonatal.

Palavras-chave: Esmalte dentário; Dente decíduo, Histologia.

ABSTRACT

Introduction: The neonatal line is an accentuated incremental line related to physiological stress during the enamel secretion stage, affecting all deciduous teeth and the first permanent molar. Although structural changes have been described in the neonatal line, there are no studies on the enamel component volumes in the neonatal line. **Objective:** The aim of this study was to analyze the enamel component volumes (mineral, organic and water) in the neonatal line and surrounding enamel (post and prenatal enamel). **Methodology:** Exfoliated human deciduous incisor teeth ($n = 17$) were selected and cut for preparing longitudinal histological ground sections. In each section, 5 histological points in the enamel layer (2 prenatal points, the neonatal line and 2 postnatal points), 40 μm apart from each other, were selected for quantification of the component volumes. The mineral volume was determined by digital radiomicrography and the organic and water volumes were quantified by means of the interpretation of enamel birefringence under a polarized light microscope. Data were submitted to normality test, presenting a normal distribution. One-way repeated measures ANOVA followed by paired T test (2-tailed significance of 5%) were applied. We also tested the hypothesis that mineral volume decreases as it approaches the neonatal line using Pearson's Correlation. **Results:** The histological location (pre, neonatal, and post natal) had an effect on the mineral ($p=2.15 \times 10^{-4}$, 0.001 , $\eta^2 = 0.07$), organic ($p=9.9 \times 10^{-9}$, $\eta^2 = 0.07$), and water volumes ($p = 5.8 \times 10^{-5}$, $\eta^2 = 0.05$). The neonatal line had the following mean values for volumetric components: 85.88% (mineral volume), 6.44% (organic volume) and 7.68% (water volume). The mineral volume in the neonatal Line was smaller than in the postnatal enamel ($p=1.38 \times 10^{-4}$, Hedge $G=1.20$, 95% $CI=2.00/0.42$, power= 99.43%) and prenatal ($p=8.44 \times 10^{-7}$, Hedge $G= 1.88$, 95% $CI=2.75 / 1.01$, power= 99.99%). A negative correlation (coefficient $r= 0.451$, 95% $CI= 0.606-0.283$, $p=1.48 \times 10^{-5}$, power of 99.30%) between neonatal line distance and normalized mineral volume was verified. The organic volume in the neonatal line was higher than in the postnatal ($p= 3.80 \times 10^{-4}$, $G= 1.09$, 95% $CI= 1.86/0.31$, power= 98.43%) and prenatal enamel ($p= 1.75 \times 10^{-6}$, Hedge $G= 1.77$, 95% $CI= 2.63/0.91$, power= 99.99%) and the water volume in the neonatal line was higher than in postnatal ($p= 1.96 \times 10^{-3}$, Hedge $G= 0.90$, 95% $CI= 1.66 / 0.13$,

power= 93.27%), and prenatal enamel ($p=7.60 \times 10^{-4}$, Hedge $G= 1.01$; 95%CI=1.78/0.23, power= 97.00%). **Conclusion:** The neonatal line is a hypomineralized enamel with higher organic and water contents compared to pre and postnatal enamel. The mineral volume decreased as it approaches the neonatal line.

Keywords: Dental Enamel; Histology; Tooth Deciduous.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BRobs	Birrefringência
CCS	Centro de Ciências da Saúde
EMSP-1	Protease de serina 1
DP	Desvio-padrão
FORP	Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
HAP	Hidroxiapatita
JAD	Junção amelodentinária
KLK-4	Calicreína 4
LAC	Coeficiente de Atenuação Linear
LAMIB	Laboratório de Microscopia e Imagem Biológica
LN	Linha Neonatal
MAC	Coeficiente de Atenuação de Massa
Micro-CT	Microtomografia Computadorizada
MMP-20	Metaloproteinase de matriz 20
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
USP	Universidade de São Paulo
µm	Micrômetros

LISTA DE FIGURAS E ILUSTRAÇÕES

- Figura 1-** Representação esquemática da formação do esmalte aprismático e do esmalte prismático (a partir do processo de Tomes). Ameloblastos (azul), esmalte prismático (amarelo) e esmalte aprismático (rosa). Adaptada de Katchburian e Arana Histologia e Embriologia Oral. 3ªed. 2015.....21
- Figura 2-** Imagem de Microscopia óptica (aumento de 60x), mostrando diferenças nas taxas de secreção diária entre o esmalte neonatal e o esmalte pré-natal. Com o primeiro apresentando uma taxa menor, sugestiva de hipoplasia. A seta aponta a distância entre as estrias transversais.....23
- Figura 3-** Corte por desgaste de elemento dentário decíduo analisado em Microscópio óptico com objetiva de 10x. Observar a Linha Neonatal (seta), o esmalte pré- natal (A) e o esmalte pós-natal (B).....24
- Figura 4-** Corte do elemento dental com disco diamantado (A). Jig de lapidação (B). Verificação da espessura da amostra em microscópio óptico(C).....28
- Figura 5-** Corte da amostra com o auxílio de uma navalha de metal, na lupa estereomicroscópica (Taimin, São Paulo, Brasil).....29
- Figura 6-** Fotomicrografia digital de um corte por desgaste de dente decíduo, com objetiva de 10x. Observar a extensão do corte da JAD (*) até a superfície (A), a distância da extremidade do corte até 60 µm em direção cervical (B) e a distância do ponto anterior até a linha neonatal (C). A seta aponta a Linha Neonatal.....30
- Figura 7-** Imagem de radiomicrografia digital obtida em Micro-CT, em que se observa a amostra (fatia de elemento dentário decíduo, visualiza-se esmalte e dentina) e o padrão de alumínio.....31
- Figura 8-** Software Image J® utilizado para a análise dos pontos histológicos no esmalte dentário (distantes 40 µm entre si) e para a análise dos valores dos níveis de cinza do padrão de alumínio.....32
- Figura 9-** Pontos histológicos no esmalte dentário (distantes 40 µm entre si), o ponto 3 (apontado pela seta) representa a linha neontal.....33
- Figura 10-** Imagem de radiomicrografia digital obtida em Micro-CT, em que se observa a linha neonatal (seta) aparentando ter um padrão hipomineralizado.....39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Média e Desvio-padrão da espessura da linha neonatal (μm) e distância da linha neonatal à superfície (μm).....	38
Tabela 2 – Média e Desvio-padrão dos volumes minerais, orgânicos e de água da linha neonatal e das regiões de esmalte dentário pré e pós-natal.....	40
Tabela 3 – Resultados do teste ANOVA de um fator para medidas repetidas.....	40
Tabela 4 – Resultados do Teste t pareado.....	42

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Definição dos pontos histológicos analisados.....	33
---	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Composição e estrutura do esmalte dentário	19
2.2 Processo de formação do esmalte dentário.....	20
2.3 Estruturas incrementais do esmalte dentário	22
2.4 Características da linha neonatal	23
3. OBJETIVOS.....	26
3.1 Objetivo Geral	26
3.2 Objetivos Específicos.....	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1 Delineamento do estudo	27
4.2 Considerações éticas	27
4.3 Locais de realização do estudo.....	27
4.4 Cálculo amostral	27
4.5 Seleção das amostras	28
4.6 Preparo dos cortes por desgaste	28
4.7 Análise do conteúdo mineral	30
4.8 Análise dos conteúdos de matéria orgânica e água.....	35
4.9 Análise estatística.....	36
5. RESULTADOS.....	38
6. DISCUSSÃO	44
7. CONCLUSÕES	47
REFERÊNCIAS.....	48
ANEXO	
APÊNDICE	

1. INTRODUÇÃO

O esmalte dentário é o componente mais duro e resistente do corpo humano, devido ao seu alto teor mineral e a sua microestrutura única^{1,2}. Sendo constituído por uma matriz inorgânica, representada pelos cristais de hidroxiapatita (HPA), uma matriz orgânica (de natureza predominantemente protéica) e água³.

O processo de formação do esmalte, denominado amelogênese, se dá inicialmente, por meio da secreção de uma matriz orgânica, composta por proteínas (amelogeninas, ameloblastinas e enamelinas) e proteases (MMP-20 e KLK-4)⁴. Posteriormente, essa matriz protéica é gradualmente substituída por matriz inorgânica, através da degradação das proteínas pela ação das proteases. Esse processo resulta em feixes de cristais dispostos de forma organizada gerando unidades estruturais fundamentais, conhecidas como prismas de esmalte^{5,6}.

A deposição de esmalte pelos ameloblastos não é um processo contínuo, há uma alternância entre períodos rítmicos de formação e descanso. Essa deposição acontece seguindo um padrão incremental, a partir disso, pode-se observar a formação de linhas incrementais denominadas estrias de Retzius².

As taxas de secreção linear diária da matriz do esmalte podem ser estimadas a partir de medidas do espaçamento das estrias transversais. Para o esmalte decíduo, os incrementos produzidos pelos ameloblastos diariamente variam entre 2,5 a 4,5 μm . Sobreposto a este padrão, constatou-se que há uma redução na taxa de formação de esmalte na zona de 100 μm após a linha neonatal. Geralmente, essa diminuição é da ordem de até 0,5 $\mu\text{m}/\text{dia}$. Dentro dessa zona de 100 μm , há uma fase de recuperação em que as taxas de formação de esmalte geralmente retornaram aos seus valores anteriores. Esta redução na secreção da matriz do esmalte é uma evidência da hipoplasia do esmalte associada a uma linha de estresse⁷.

Neste sentido, a formação dessas linhas incrementais é influenciada por estresses metabólicos no trauma do nascimento, gerando uma mudança na formação da matriz do esmalte, pois os ameloblastos são altamente sensíveis quando expostos a estímulos nocivos. Essa alteração resulta na formação de uma linha acentuada de esmalte, denominada linha neonatal (LN), decorrente da passagem do feto da vida intrauterina para a extrauterina^{2,8}. Essa linha divide o esmalte formado pré-natalmente do esmalte formado após o nascimento⁷.

Estudos denotam que a base ultra-estrutural da linha neonatal pode estar relacionada com uma mudança na configuração dos prismas de esmalte, juntamente com uma possível redução na concentração de cristais de hidroxiapatita⁹. Corroborando estes achados, a linha neonatal foi citada como uma região com reduzido grau de mineralização⁸.

O Esmalte dos dentes decíduos apresenta informações registradas sobre eventos metabólicos e fisiológicos que ocorreram durante o período em torno do nascimento e do primeiro ano de vida. O conhecimento detalhado do desenvolvimento normal, da estrutura do esmalte pré e pós-natal e da linha neonatal pode ser importante para entender o processo de formação do esmalte e a avaliação de possíveis defeitos na mineralização⁷.

Por conseguinte, pode-se dizer que, por ser um marcador *in vivo* do nascimento de uma criança, a linha neonatal permite a análise do indivíduo a partir da sua vida intrauterina e da sua sobrevivência na sua vida extrauterina. Esse marcador pode contribuir para a determinação da idade de uma criança no momento de sua morte, se ela tiver dentes na fase de secreção do esmalte, e também pode diferenciar uma criança natimorta (sem linha neonatal) de uma vítima de infanticídio (com linha neonatal)¹⁰.

O fato da linha neonatal ser uma região hipomineralizada do esmalte levanta questões importantes. Será que existem diferenças com relação aos componentes não minerais? Será que existe um aumento de matéria orgânica? É provável que exista pois tem uma correlação negativa entre o volume mineral e o volume orgânico do esmalte³. A possibilidade dessa diferença é intrigante, pois o estresse do nascimento ocorre durante o estágio de secreção do esmalte e a mineralização ocorre no estágio de maturação, que acontece um tempo depois. A análise dos componentes do esmalte na linha neonatal pode ajudar a entender melhor a amelogênese e a patogênese dos defeitos do esmalte.

Nesse contexto, fazem-se necessárias análises mais aprofundadas da estrutura da linha neonatal que permitam quantificar os seus componentes. O presente estudo objetivou analisar a variação dos componentes volumétricos da linha neonatal e no esmalte circunjacente (esmalte pós e pré-natal).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Composição e estrutura do esmalte dentário

O esmalte é o tecido que recobre toda a coroa do elemento dental, tem uma espessura de aproximadamente 1 a 2 mm em dentes permanentes e 0,5 a 1 mm em dentes decíduos⁷, origina-se do folheto embrionário ectoderma e é constituído de cristais biológicos de hidroxiapatita, além de remanescentes de proteínas do período de desenvolvimento e de água³.

As proteínas presentes no esmalte são principalmente as amelogeninas, que compreendem a cerca de 90% da matriz orgânica¹¹ e os 10% restantes são formados pela ameloblastina, enamelin, metaloproteinase de matriz 20 (MMP-20), enamelin, calicreína 4 (KLK-4) e protease de serina 1 (EMSP-1) que auxiliam no processo de formação do esmalte dentário⁴.

O componente mineral do esmalte encontra-se na forma de cristais alongados de hidroxiapatita que, em sua maioria, se estendem desde a junção amelodentinária (JAD) e continuam em direção à superfície do esmalte. Existem dados na literatura de volume mineral em incisivos decíduos desde a JAD até a superfície¹², os volumes minerais variaram de 76,9% a 83,4%, para uma densidade 3,15g/cm³. Nos dentes decíduos esses cristais são compactados em colunas definidas como prismas de diâmetro médio de 2,9 µm ($\pm 1,2$ µm)¹³. Um único prisma de esmalte é desenvolvido a partir de um ameloblasto e são separados por esmalte interprismático^{14,15}.

As angulações dos prismas em direção à superfície variam ao longo da coroa do dente e são mais perpendiculares na área cervical e com aproximadamente 70° na região coronal¹³. A estrutura do prisma é semelhante a um cilindro (com corte transversal com aspecto de um abertura de fechadura), os cristais de hidroxiapatita que o constituem são paralelos ao longo eixo do prisma. Cada prisma é rodeado pelo espaço interprismático, onde os cristais são orientados em direções diferentes¹⁴. O espaço interprismático é maior no esmalte hipomineralizado, onde o diâmetro dos prismas é menor¹⁶.

Os trajetos dos prismas do esmalte foram descritos por meio de uma análise tridimensional da estrutura, em que foram observados grupos de prismas compactados afastando-se da JAD e seguindo uma trajetória sinusoidal até

aproximadamente a metade da espessura do esmalte, em seguida adotam uma trajetória linear ao se aproximarem da superfície do esmalte¹⁷.

2.2 Processo de formação do Esmalte dentário

O desenvolvimento do esmalte dentário embrionário inicia-se na décima semana de gestação¹⁸, esse processo de formação do esmalte é denominado amelogênese e acontece em etapas: a fase de secreção, de transição e de maturação¹⁹.

No estágio de secreção, o esmalte é secretado da junção amelodentinária em direção à superfície da coroa. A amelogenina de comprimento máximo secretada pelos ameloblastos secretores tem 27kDa e é capaz de guiar a formação de longos cristais de hidroxiapatita entre seus espaços. Curiosamente, é quase impossível isolar a amelogenina de comprimento máximo no esmalte secretório porque ela é processada por proteases (principalmente pela MMP20) logo após a secreção, dando espaço para crescimento em comprimento dos cristalitos de HPA. Os produtos proteolíticos da amelogenina derivados da ação da MMP20 incluem fragmentos de 23kDa, 20kDa, 13kDa e 5kDa (peptídeos ricos em tirosina- TRAPs)¹⁹. Assim, ao final de estágio de secreção, só existem fragmentos peptídicos da amelogenina. Estes fragmentos serão posteriormente processados pela KLK4 durante os estágios de transição e maturação⁵.

A primeira camada de esmalte depositada é aprismática e é mais frequentemente vista em dentes decíduos, sendo a largura dessa camada maior em comparação aos dentes permanentes, apresentando espessura em torno de 16-45µm, enquanto nos dentes permanentes a zona aprismática está em torno de <5µm²⁰.

Depois que a camada inicial do esmalte é formada, os ameloblastos desenvolvem processos secretórios, os processos de Tomes (Figura 1). Estes processos são expansões dos ameloblastos que guiam a formação dos prismas de esmalte²¹. As zonas adjacentes aos prismas são as regiões interprismáticas, que completam a estrutura cristalina do esmalte dentário.

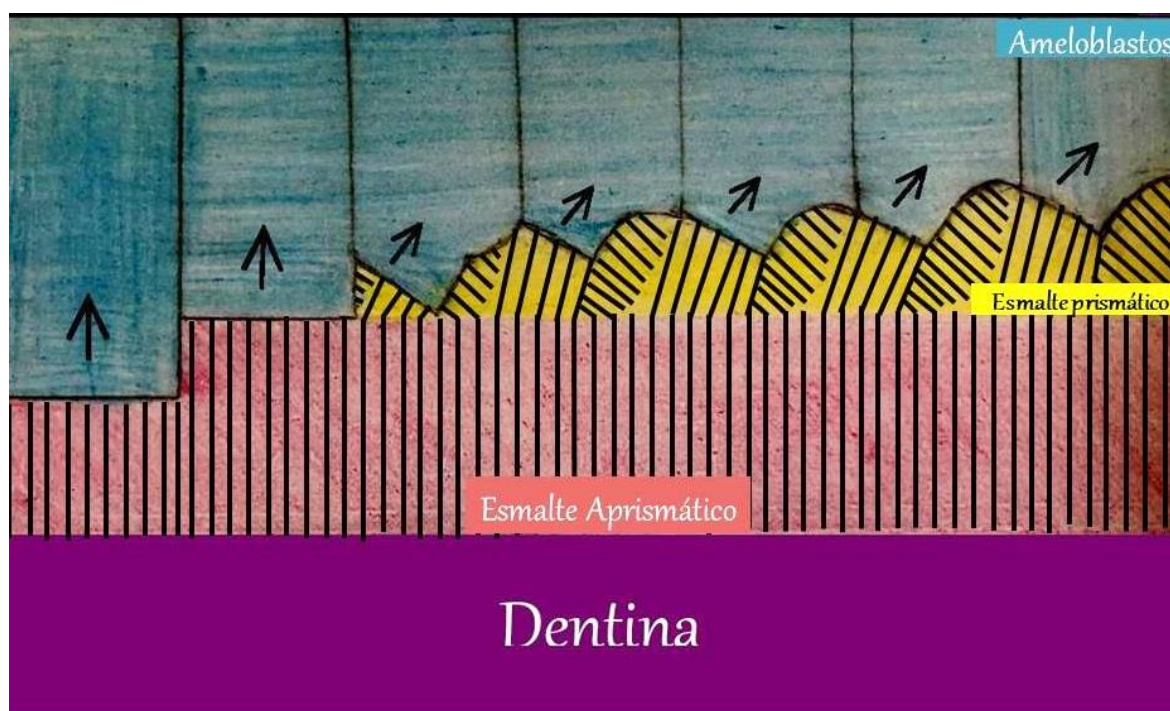


Figura 1 – Representação esquemática da formação do esmalte aprismático e do esmalte prismático (a partir do processo de Tomes). Ameloblastos (azul), esmalte prismático (amarelo) e esmalte aprismático (rosa). Adaptada de Katchburian e Arana Histologia e Embriologia Oral. 3ªed. 2015.

Quando alcançado certa distância da junção amelodentinária, os ameloblastos retiram os processos dos Tomes, param de secretar a matriz do esmalte, diminuem de tamanho e passam por um estágio de maturação seguido por um estágio de proteção até a erupção.

Na maturação, os ameloblastos estão distantes do esmalte profundo, de modo que a ação da KLK4 no esmalte externo pode ser mais intensa que no esmalte interno. A KLK4 vai clivar os peptídeos deixados pela clivagem da MMP20, resultando em fragmentos ainda menores. Os fragmentos TRAP, por exemplo, são clivados pela KLK4, mas não pela MMP20. Entretanto, a MMP20 é capaz de causar, lentamente, posterior clivagem de outros fragmentos resultantes de sua clivagem inicial. Essa é a explicação para a maturação no esmalte profundo, que está distante dos ameloblastos maturadores (e da KLK4)^{22,23}. Assim, é de esperar que os peptídeos pequenos perfazam uma fração maior do total de peptídeos extraídos do esmalte externo do que do interno. Neste último, fragmentos de TRAPs (relativamente grandes) podem ainda estar presentes.

No estágio de maturação, os componentes orgânicos do esmalte são gradualmente retirados e os componentes minerais inorgânicos se depositam na matriz. A arquitetura de cristal de hidroxiapatita é esboçada na matriz de proteínas e, em seguida, continua a sofrer um crescimento significativo na largura e espessura de cristais individuais à medida que a hidrólise de proteína continua. Nesta perspectiva, entende-se que mudanças na degradação enzimática da amelogenina, pelos defeitos genéticos da amelogenina ou das proteinases da matriz do esmalte, podem resultar em alterações patológicas durante a formação deste tecido²⁴.

2.3 Estruturas incrementais do Esmalte dentário

Existem fenômenos estruturais no esmalte dentário que são resultantes de variações na secreção de matriz pelos ameloblastos, com um intervalo de repetição periódica consistente²⁵. O crescimento rítmico do esmalte é expresso em dentes humanos em dois níveis diferentes: estruturas de período curto e estruturas de período longo²⁶.

As marcações de período curto são representadas pelas laminações, estrias transversais e linhas intradianas. As laminações são registros das posições sucessivas de esmalte em formação com intervalos diários (paralelos às estrias de Retzius). As estriações transversais são ditas segmentações transversais, perpendiculares aos prismas que separam camadas de deposição diária de matriz, identificadas como bandas claras e escuras que cruzam os prismas em um intervalo comum de cerca de 2-6 μ m²¹(Figura 2). E as linhas intradianas são definidas como segmentações situadas entre as estriações transversais, com periodicidade de 2,0 a 2,1 μ m, formadas em intervalos de 12 horas²⁷.

As marcações de período longo, representadas pelas Estrias de Retzius²⁷, são linhas desenvolvidas em intervalos regulares de 6 a 12 dias que cortam os prismas obliquamente e alcançam a superfície do dente formando cristas ou depressões levemente deprimidas conhecidas como periquimácias²¹. No entanto, essa periodização depende de alguns aspectos, como o tipo de dentição. Em dentes decíduos anteriores a periodicidade da linha de Retzius nos dentes varia de 5 a 6 dias²⁷.

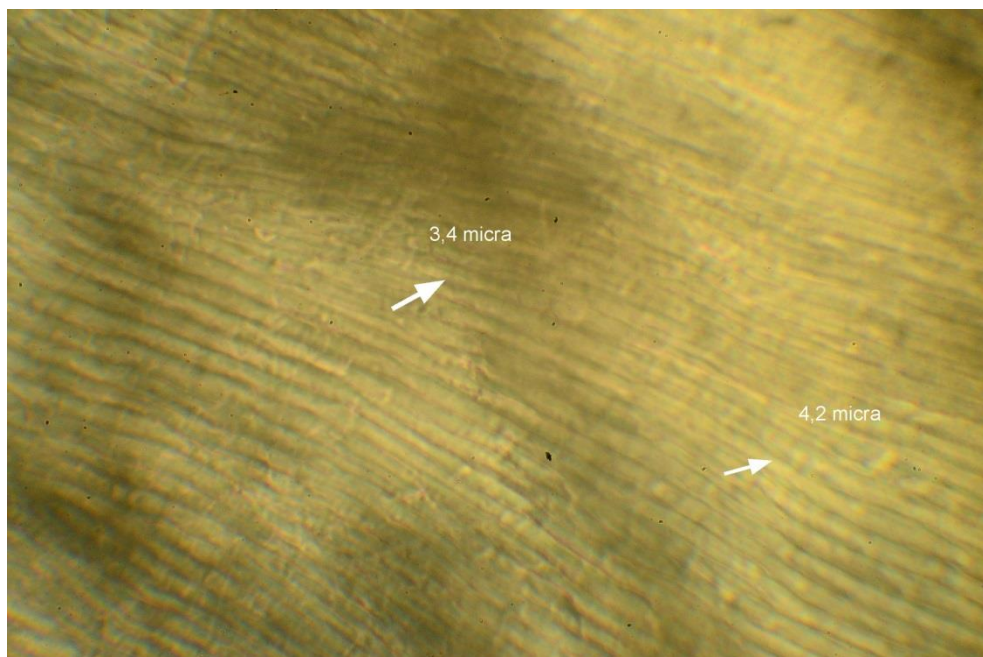


Figura 2– Imagem de Microscopia óptica (aumento de 60x), mostrando diferenças nas taxas de secreção diária entre o esmalte neonatal e o esmalte pré-natal. Com o primeiro apresentando uma taxa menor, sugestiva de hipoplasia. A seta aponta a distância entre as estrias transversais.

A quantificação dessas variáveis (tanto de período curto quanto longo) produz dados que podem ser usados para determinar as taxas de secreção do esmalte, bem como a duração da formação da coroa dentária²⁸. A determinação e aplicação da periodicidade das estrias de Retzius é baseada na teoria de que um número consistente de estratificações diárias é expresso entre pares de linhas de Retzius em todos os dentes da dentição de um indivíduo^{21,29}.

2.4 Características da linha neonatal

A linha neonatal é uma linha incremental proeminente no esmalte dentário que demarca a formação do esmalte ocorrida antes do nascimento e após o nascimento³⁰, tornando possível distinguir o esmalte pré e pós-natal³¹ (Figura 3). Em 1936, Schour³² demonstrou pela primeira vez que essas linhas acentuadas são formadas a partir do nascimento.

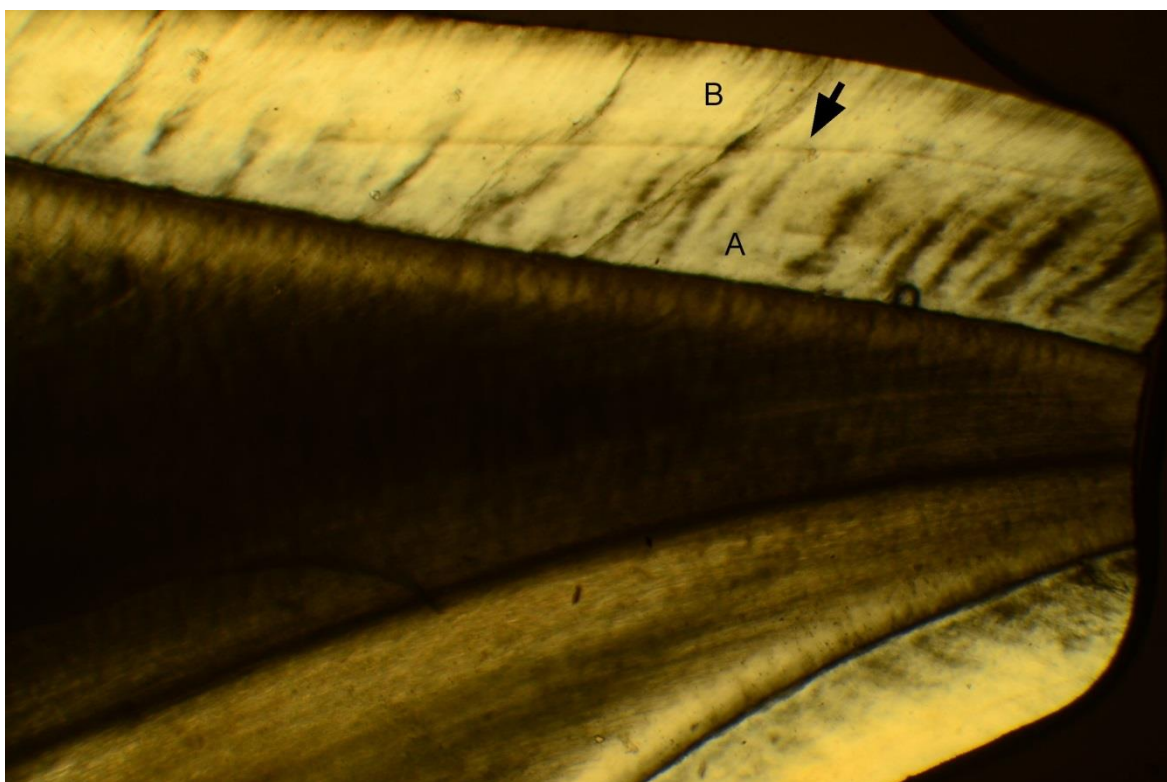


Figura 3- Corte por desgaste de elemento dentário decíduo analisado em Microscópio óptico com objetiva de 10x. Observar a Linha Neonatal (seta), o esmalte pré- natal (A) e o esmalte pós-natal (B).

A linha neonatal foi documentada em dentes humanos decíduos e permanentes (primeiros molares)^{32,33} se estendendo da região mais cervical da JAD em direção à superfície do esmalte ou ao redor da cúspide incisal^{14,34}. Ela foi descrita como uma linha incremental de estrutura mais porosa e menos mineralizada, a partir de análises feitas em Microscopia de Luz Polarizada e Microradiografia, respectivamente¹⁴.

Análises realizadas em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), em combinação com a microanálise por Raios-X, demonstram que uma possível interrupção da secreção do esmalte pelos ameloblastos, no momento do nascimento, resulta em uma estrutura hipomineralizada¹⁴.

Em congruência com esse achado, frequentemente há a presença de hipoplasias na região da LN, provavelmente devido a alterações nos ameloblastos que dão origem a certas mudanças no direcionamento e no tamanho dos prismas¹⁴. Então, entende-se que modificações no metabolismo e no movimento dos ameloblastos devido a condições estressantes durante o nascimento, resultam na

mudança estrutural, na largura e na orientação dos prismas, que parecem sofrer interrupção de 0,2 μm quando cruzam a linha³³.

A linha neonatal, mesmo sendo considerada uma referência do nascimento, só é observada no esmalte dentário dias após o acontecimento. Dessa forma, a ausência da linha neonatal significa que os indivíduos não viveram o suficiente para formá-la³⁵. Evidências da formação de uma linha neonatal não foram encontradas em crianças que sobreviveram até dois dias e meio⁹; é necessário que a criança sobreviva pelo menos 7 a 10 dias³⁶ ou pelo menos 10 a 15 dias²⁸ para a visualização da linha neonatal como uma faixa demarcando o esmalte pré e pós-natal.

Essa marcação do nascimento no esmalte dentário é de particular importância para determinar a idade dos indivíduos que morreram enquanto ainda estão desenvolvendo seus dentes, bem como para estabelecer a cronologia do desenvolvimento dentário²¹. A presença da LN indica o registro do nascimento vivo. Além disso, a sua espessura fornece informações adicionais sobre o tipo de parto³⁷, a dificuldade do processo de nascimento³⁰, bem como às deficiências no ambiente neonatal³⁸. Assim, a sua microestrutura é vista como uma possibilidade diagnóstica para diferenciar entre o nascimento vivo e não-vivo, sendo considerada uma ferramenta importante para os peritos forenses². Neste contexto, faz-se necessário um estudo mais aprofundado que caracterize a composição volumétrica da linha neonatal.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

. Analisar a variação dos componentes volumétricos (mineral, orgânico e de água) da linha neonatal e no esmalte circunjacente (esmalte pós e pré-natal).

3.2 Objetivos Específicos

- Analisar o volume mineral, volume orgânico e volume de água nos esmaltes pré-natal, linha neonatal e pós-natal de dentes decíduos;
- Testar a hipótese que existem diferenças entre o esmalte pré-natal, a linha neonatal e o esmalte pós-natal com relação aos componentes volumétricos do esmalte;
- Testar a hipótese de que à medida que se aproxima da linha neonatal o volume mineral diminui.

Hipótese principal do estudo

Neste estudo *in vitro*, a hipótese principal é que o estresse fisiológico do nascimento afeta os componentes volumétricos do esmalte.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento do estudo

Este estudo se caracteriza como sendo quantitativo, observacional, analítico, laboratorial, transversal, com técnica de observação direta³⁹.

4.2 Considerações éticas

Os procedimentos para a realização desta pesquisa respeitaram as diretrizes e normas que regulamentam as pesquisas envolvendo seres humanos (Resolução número 466, de 12 de dezembro de 2012, do Conselho Nacional de Saúde). O estudo foi submetido ao Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP-USP), sendo aprovado sob o número CAAE:81119917.8.0000.5419 (Anexo A).

4.3 Locais de realização do estudo

A preparação dos cortes das amostras de dentes decíduos foi realizada no Laboratório de Histologia e Proteínas, no Departamento de Morfologia, Fisiologia e Patologia Básica da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (FORP/USP).

As etapas subsequentes do presente estudo foram desenvolvidas no Laboratório de Microscopia e Imagem Biológica (LAMIB) do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

4.4 Cálculo amostral

O cálculo amostral levou em consideração um erro tipo I de 5% para alfa bicaudal, com uma magnitude de efeito “g de Hedge” alta de 0,8 e um poder estatístico de 80% (100% - erro tipo II). Para estas condições, o g de Hedge de 0,8 foi multiplicado por $\sqrt{2}$, visto que se trata de um estudo pareado. Assim, cálculo resultou em um tamanho amostral de 17 dentes.

4.5 Seleção das amostras

Os elementos dentários utilizados na pesquisa foram incisivos decíduos esfoliados, obtidos a partir do Banco de dentes da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP/USP).

4.6 Preparo dos cortes por desgaste

Para a preparação das amostras, os dentes decíduos foram lavados com água e com um disco diamantado montado em micromotor de baixa rotação sob irrigação, foi obtida de cada elemento dental, uma secção longitudinal da coroa (Figura 4A). As secções foram reduzidas, por desgaste, através de um jig de lapidação (Figura 4B), com lixas d'água de granulações decrescente (320-4000), a fim de se obter uma espessura de aproximadamente 80 micrômetros (μm). Posteriormente cada fatia foi polida com disco de feltro e pasta de alumina com partículas de $1\mu\text{m}$, sob irrigação com água, até a remoção das ranhuras.

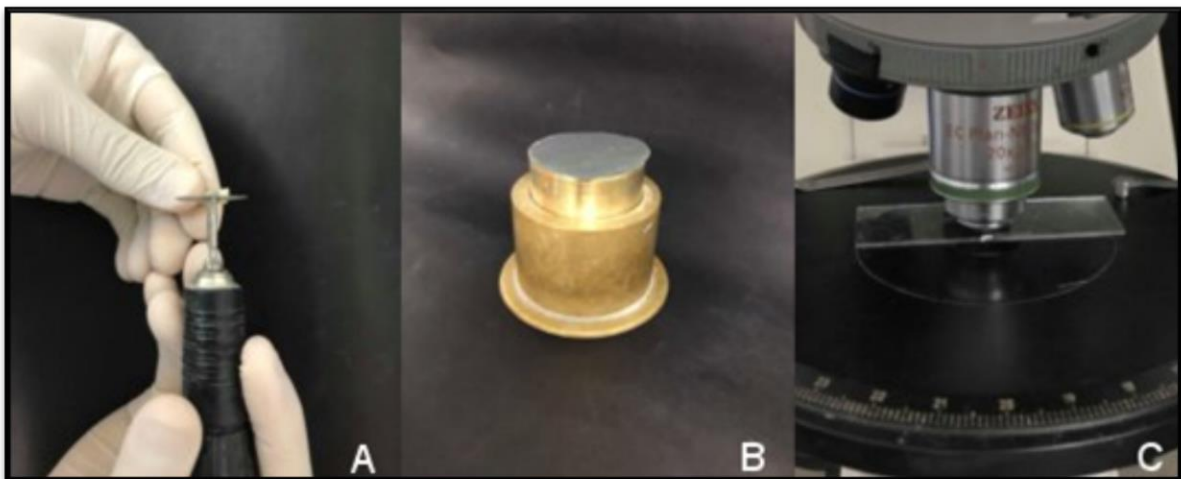


Figura 4 - Corte do elemento dental com disco diamantado (A). Jig de lapidação (B). Verificação da espessura da amostra em microscópio óptico (C).

As amostras foram levadas a um estereomicroscópio (Taimin, São Paulo, Brasil) e cortadas ao longo da camada de esmalte (Figura 5), aplicando uma navalha de metal no corte histológico por desgaste, perpendicular à superfície do esmalte e adjacente aos locais de interesse para quantificar o volume mineral.

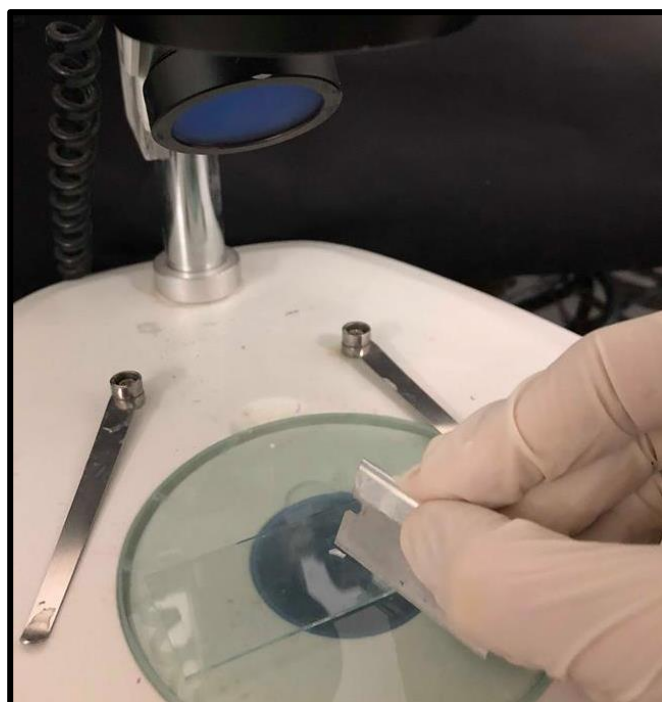


Figura 5 – Corte da amostra com o auxílio de uma navalha de metal, na lupa estereomicroscópica (Taimin, São Paulo, Brasil).

A medição da espessura do esmalte foi realizada no microscópio óptico (Axioskopt, Carls Zeiss Jena, Alemanha). O lado exposto pelo corte foi posicionado voltado para a objetiva, na platina do microscópio óptico, com uma objetiva de 20x (abertura numérica de 0.5, resolução de $0,7\mu\text{m}$ e luz de comprimento de onda de 550nm) (Figura 4C). A medição foi feita através de uma retícula acoplada à ocular. A espessura do esmalte dentário pode variar da superfície ao limite amelodentinário, por isso, foi medido o valor da espessura em todos os pontos em que se desejava quantificar os componentes volumétricos.

Com relação à determinação dos pontos histológicos para realizar a análise volumétrica, esses foram definidos no microscópio óptico de luz polarizada (Axioskopt, Carls Zeiss Jena, Alemanha) e foram observados: a extensão do corte da junção amelodentinária até a superfície (A); a distância da extremidade do corte até 60 μm na direção cervical (B) e a distância do ponto anterior até a linha neonatal (C) (Figura 6). Fotomicrografias digitais (Câmera Nikon – D7000, Minato, Tóquio) foram obtidas de todas as amostras.

Para cada amostra foi selecionada uma região em que a linha neonatal mostrava-se evidente e que estivesse a, pelo menos, 100 μm em direção à superfície e 100 μm em direção à JAD.

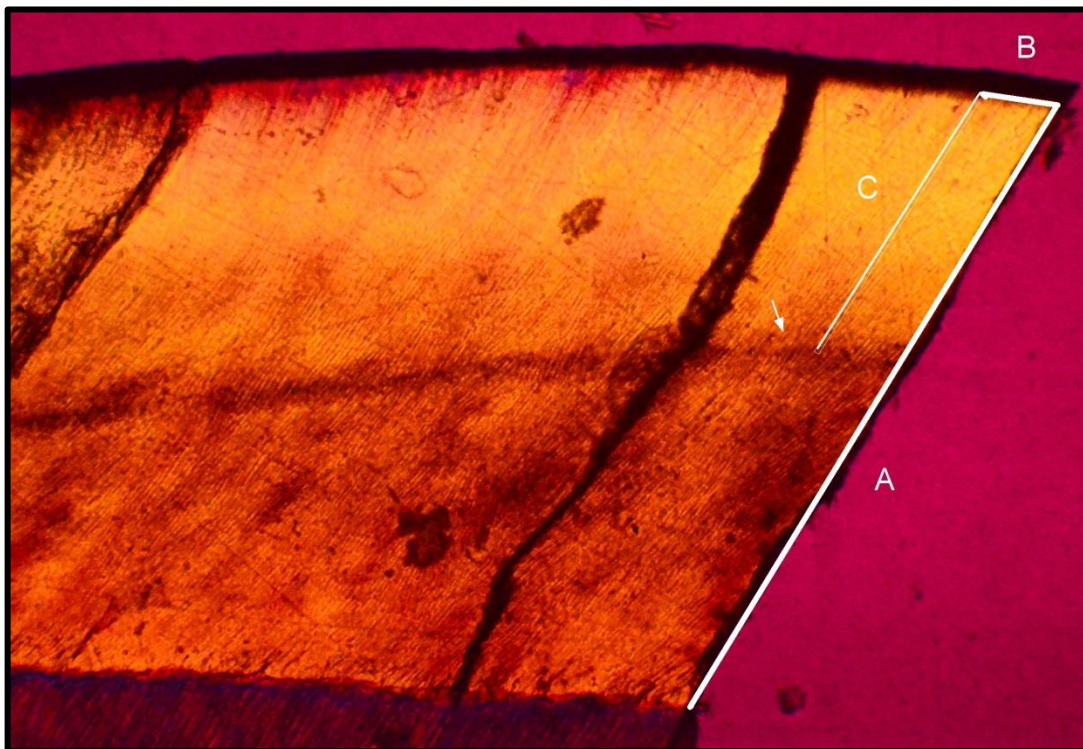


Figura 6 - Fotomicrografia digital de um corte por desgaste de dente decíduo, com objetiva de 10x. Observar a extensão do corte da JAD (*) até a superfície (A), a distância da extremidade do corte até 60 μm em direção cervical (B) e a distância do ponto anterior até a linha neonatal (C). A seta aponta a Linha Neonatal.

4.7 Análise de conteúdo mineral

O conteúdo mineral foi determinado através de análises de radiomicrografia digital utilizando a Microtomografia computadorizada (Micro-CT) (Skyscan 1172, Bruker, Kontich, Bélgica). Previamente à aquisição da imagem de cada amostra foi realizado um *flat-field correction* do aparelho, padronizando a intensidade média de raio-x (av) de 90%.

Obteve-se uma imagem bidimensional de cada amostra, para isso, padronizou-se o pixel de 0,94 μm , matriz de pixels de tamanho pequeno (*small camera pixels*), não foi utilizado nenhum filtro adicional (*No filter*), resultando em 60 kV (pico de energia de 10 keV) e 167uA.

As amostras foram expostas aos raios X juntamente com um padrão de alumínio de alta pureza ($\geq 99\%$) (Figura 7) de 10 folhas (dimensões de 2 mm por 15 mm) com 20 μm de espessura, montado com folhas empilhadas e desniveladas em uma das extremidades formando uma escala em batentes com espessuras entre 20 e 200 μm , de modo a expor ao feixe de raios X diferentes quantidades de folhas, com intervalo de uma folha.

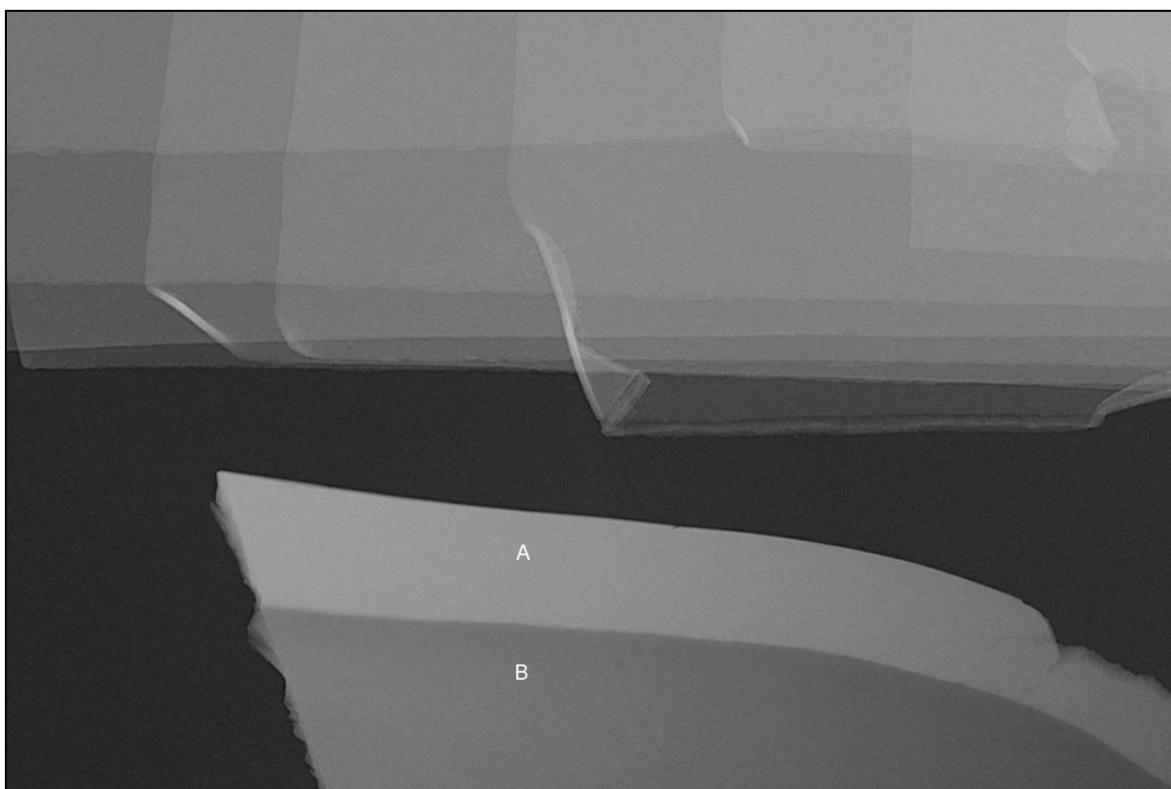


Figura 7 – Imagem de radiomicrografia digital obtida em Micro-CT, em que se observa a fatia de elemento dentário decíduo (A- esmalte e B-dentina) e o padrão de alumínio.

Posteriormente a aquisição das imagens, foi utilizado o software *Image J*[®] (*Image Processing and Analysis in Java*, NIH, USA) em que se determinou a média dos valores dos níveis de cinza (interpretados como a densidade óptica média) de cada uma das 10 referências de alumínio e dos pontos histológicos de interesse nas secções de esmalte (Figura 8). Uma correlação matemática entre densidade óptica média e espessura do alumínio foi determinada por um polinômio de quarta ordem. A partir desta correlação matemática, foi possível determinar qual espessura de alumínio correspondente aos níveis de cinza de cada ponto histológico analisado.

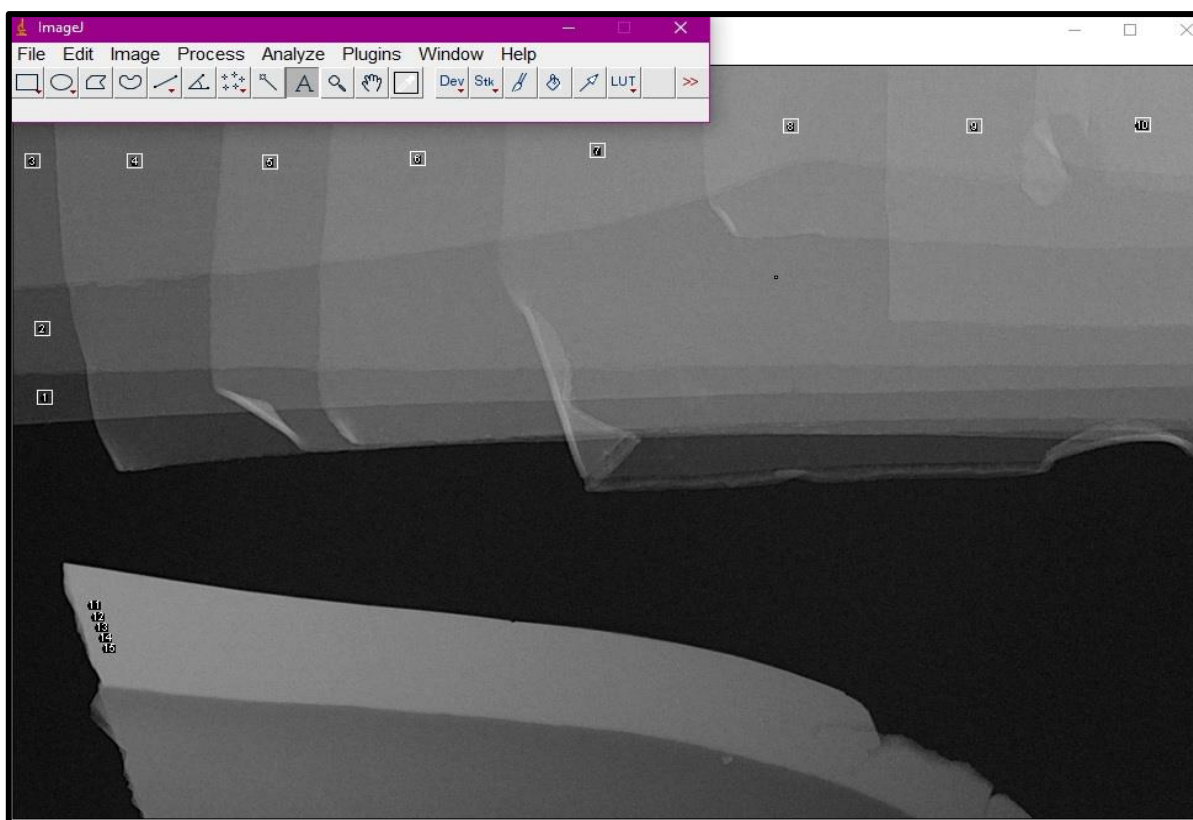


Figura 8 – Software Image J[®] utilizado para a análise dos pontos histológicos no esmalte dentário (distantes 40 μm entre si) e para a análise dos valores dos níveis de cinza do padrão de alumínio.

Em cada secção foram analisados cinco pontos histológicos, sendo dois pontos pré-natais, a linha neonatal e dois pontos pós-natais, selecionados ao longo de uma linha transversal e distante 40 μm entre si (Quadro 1). Para isso, com o freeware de análise de imagens Image J[®] (*Image Processing and Analysis in Java*, NIH, USA) foi estabelecida uma relação pixel-micrômetro (μm). Em cada ponto, foi calculada a média dos valores contidos dentro de uma área demarcada de 15x15 μm (Figura 9).

Considerando que a linha neonatal das nossas amostras tinha espessura de até 25,7 μm e que a região de interesse tinha dimensão de 15x15 μm , um deslocamento de 20 μm ao longo dos prismas poderia deixar a região de interesse adjacente a um dos lados da linha neonatal. Para evitar sobreposições, duplicamos esse valor de 20 μm para definir a distância entre os pontos.

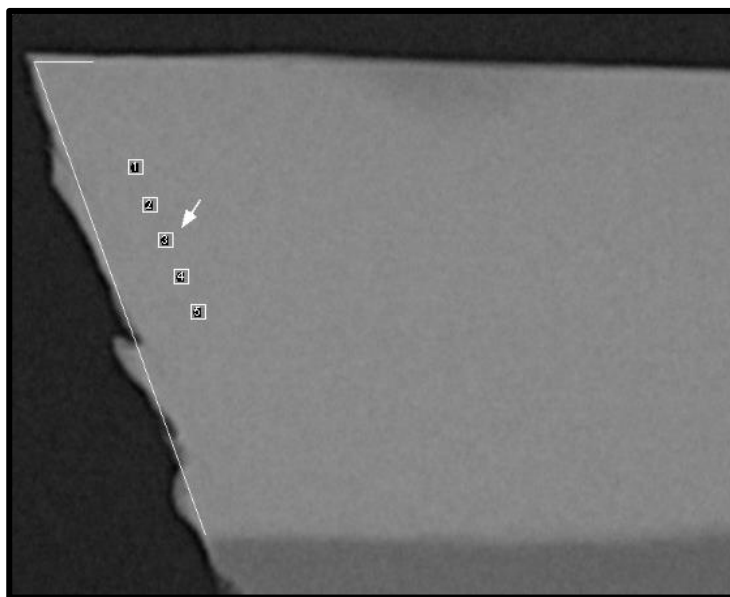


Figura 9– Pontos histológicos no esmalte dentário (distantes 40 μm entre si), o ponto 3 (apontado pela seta) representa a linha neonatal.

Quadro1 – Definição dos pontos histológicos analisados.

Pontos histológicos	Definição
Pós-natal 2	Ponto histológico distante 80 μm da linha neonatal em direção à superfície
Pós-natal 1	Ponto histológico distante 40 μm da linha neonatal em direção à superfície
Linha Neonatal	Ponto histológico analisado na linha neonatal
Pré-natal 1	Ponto histológico distante 40 μm da linha neonatal em direção à JAD
Pré-natal 2	Ponto histológico distante 80 μm da linha neonatal em direção à JAD

A quantificação de conteúdo mineral do esmalte dental através de radiomicrografia é baseada na atenuação (absorção) de raios X pelo esmalte, por isso, utilizou-se o coeficiente de atenuação de massa (MAC) para quantificar a absorção de raios X pelo esmalte dentário. O MAC depende da composição química do esmalte e do pico de emissão de raios X utilizado.

O parâmetro físico que quantifica a atenuação de raios X à medida que o feixe atravessa uma determinada espessura da amostra é chamado de Coeficiente de Atenuação Linear (LAC) de raios X, que foi obtido pela seguinte fórmula:

$$LAC_{Esmalte} = Mac_{Esmalte} \times densidade_{Esmalte} \quad (1)$$

Para o cálculo do Coeficiente de Absorção Linear do conteúdo mineral (μ_m), considerou-se a seguinte fórmula para a célula unitária da hidroxiapatita:



Considerando que a hidroxiapatita apresenta o valor de 2.99 g/cm^3 para a densidade⁴⁰.

Uma vez que a radiomicrografia foi obtida e o LAC do esmalte e do alumínio calculados, o conteúdo mineral do esmalte foi quantificado. O volume mineral do esmalte nas localizações histológica é dado em porcentagem e foi calculado usando a equação de Angmar⁴¹:

$$V = \frac{\mu_{AL} \times t_{Al}}{\mu_M \times t_S} \times 100 \quad (2)$$

Onde μ_{Al} e μ_M são os LACs (cm^{-1}) do alumínio (70,740) e da apatita do esmalte (134,017), respectivamente. E t_S e t_{Al} são as espessuras (em μm) da amostra de esmalte nos pontos histológicos que foram medidos e a espessura de alumínio necessária para se obter os mesmos níveis de cinza do ponto do esmalte em análise (Os cálculos dos LACs do esmalte (μ_M) e do alumínio (μ_{Al}) estão expostos no Apêndice A e Apêndice B, respectivamente).

4.8 Análise dos conteúdos de matéria orgânica e água

Os volumes de matéria orgânica e água foram determinados através da quantificação do valor de Birrefringência (BRobs), obtido em microscópio de luz polarizada, utilizando um filtro verde de interferência (550 nm) e compensador de Berek de 0-5 ordens.

Em cada espécime foram escolhidos os mesmos pontos histológicos descritos anteriormente, em que foi feito a quantificação do volume mineral. A identificação dos pontos e as medições de distância foram feitas com auxílio de retícula acoplada a uma das oculares.

Os pontos analisados tiveram a sua Birrefringência quantificada (calculando uma média de três medidas). Durante a avaliação da BRobs as amostras estavam imersas em água e posicionadas entre uma lâmina e uma lamínula, para evitar a evaporação da água.

A Birrefringência é quantificada pela seguinte equação:

$$BR = \frac{-1 \times \text{Retardo de fase}}{\text{Espessura}} \quad (3)$$

Para obtenção dos volumes de matéria orgânica e água a partir dos valores de BRobs foi utilizado o modelo proposto por Sousa et al.⁴², descrito a seguir. A BRobs experimental do esmalte dental foi interpretada com base no seu ajuste como BRobs teórica. Esta última é dada pela equação:

$$BRobs = -0,0065AV_1 + \frac{V_1V_2(1-V_1)(n_1^2 - n_2^2)^2}{2(V_1n_1 + V_2n_2)[(1+V_1)n_2^2 + V_2n_1^2]} \quad (4)$$

onde V_1 é a fração do volume mineral, V_2 é a fração do volume não mineral, A é o coeficiente de alinhamento dos cristalitos (0,85), n_1 é o índice de refração da fase mineral e n_2 é o índice de refração da fase não mineral. Segundo Sousa et al.⁴², o valor de n_2 para o esmalte com matéria orgânica é dado por:

$$n_2 = 1,33 \frac{\alpha_1}{V_2} + n_i \frac{\alpha_2}{V_2} + 1,56 \frac{\beta}{V_2} \quad (5)$$

onde α_1 é a fração de volume de água remanescente no esmalte após desidratação a temperatura ambiente (índice de refração: 1,33), α_2 é a fração de volume de água no esmalte removida por esse processo de secagem e β é a fração de volume de matéria orgânica (índice de refração: 1,56). n_i é o índice de refração do meio de imersão (água: 1,33). No nosso experimento foi quantificado o volume de água total (α), não sendo feita a separação entre água firmemente aderida (α_1) e fracamente aderida (α_2). A equação (5) foi inserida na equação (4) para se obter a *BRob*s teórica.

Nesta análise também foi considerado que:

$$V_2 = \alpha + \beta \quad (6)$$

O valor de V_1 foi obtido através da quantificação prévia em radiomicrografia. Como $V_2 = 1 - V_1$ foi possível escrever todos os volumes parciais da fase não mineral (α e β) em função de V_1 , quando obtidos os valores da *BRob*s em água. No caso do ajuste da *BRob*s teórica com a *BRob*s experimental do esmalte imerso em água, tem-se duas incógnitas, α e β , e duas equações ($V_2 = \alpha + \beta$ e *BRob*s teórica = *BRob*s experimental). Dessa situação, pode-se obter os volumes de matéria orgânica (β) e água (α) pelo modelo matemático.

4.9 Análise estatística

Os dados foram submetidos a teste de normalidade, sendo considerados normais os dados que apresentassem valores com assimetria entre -2 e 2 e valores entre 1 e 5 para curtose⁴³. O teste de homogeneidade das variâncias para os testes ANOVA e *post hoc* foi realizado calculando-se a razão entre as variâncias mais altas e as mais baixas. As variâncias foram consideradas homogêneas⁴⁴ quando essa proporção era ≤ 3 .

Utilizou-se o teste ANOVA de um fator para medidas repetidas (com nível de significância de 5% unicaudal) para testar a hipótese de que os componentes volumétricos diferem dependendo da localização histológica. Sendo realizado separadamente para o volume mineral, volume orgânico e volume de água e analisou-se o nível de significância (valor de p) e magnitude de efeito (η^2).

Posteriormente, o teste t pareado foi aplicado para comparar os pares de grupos (Pós-natal 2, Pós-natal1, Linha Neonatal, Pré-natal 1 e Pré-natal 2) entre si. Utilizou-se um nível de significância de 5% bicaudal. Foram analisadas a significância (valor de p), a magnitude de efeito “g de Hedge” e seu intervalo de confiança de 95% e o poder estatístico.

Também testamos a hipótese de que à medida que se aproxima da linha neonatal o volume mineral diminui. Para tanto, os dados de volume mineral foram normalizados com base no volume mineral da linha neonatal. Para cada amostra os dados de volumes mineral dos cinco pontos, foram divididos pelos dados de volume mineral da linha neonatal. Com relação à distância da linha neonatal, foram utilizados os seguintes valores: 80 μm (Pós-natal 2 e Pré-natal 2), 40 μm (Pós-natal 1 e Pré-natal 1) e 0 μm (Linha Neonatal). Foi aplicada a correlação de Pearson, também foram calculados a significância (utilizando o teste Z), o intervalo de confiança da magnitude de efeito R e o poder estatístico. O nível de significância utilizado foi de 5% bicaudal.

5. RESULTADOS

Foram analisadas 17 amostras, sendo selecionados 05 pontos histológicos em cada fatia, totalizando 85 pontos avaliados em que todos tiveram os seus componentes volumétricos quantificados.

Na Tabela 1 pode-se observar a média e o desvio-padrão (DP) da espessura (em μm) da linha neonatal das amostras avaliadas que variou de 10,73 ($\pm 0,31$) a 25,71 ($\pm 1,08$) e a distância da linha neonatal a superfície que variou de 99,0 μm a 455,6 μm .

Tabela 1 – Média e Desvio-padrão da espessura da linha neonatal (μm) e distância da linha neonatal à superfície (μm).

Amostra	Média/ DP espessura da LN	Distância da LN à superfície
1	19,03 $\pm$ 0,32	112,0
2	22,72 $\pm$ 0,94	316,8
3	23,01 $\pm$ 0,42	198,0
4	15,05 $\pm$ 0,61	277,7
5	16,80 $\pm$ 0,31	108,9
6	11,93 $\pm$ 0,25	178,2
7	18,04 $\pm$ 0,42	148,0
8	16,55 $\pm$ 0,31	128,7
9	16,76 $\pm$ 0,52	207,9
10	21,45 $\pm$ 0,18	99,0
11	15,48 $\pm$ 0,61	236,6
12	25,71 $\pm$ 1,08	123,7
13	10,73 $\pm$ 0,31	158,0
14	15,05 $\pm$ 0,56	218,0
15	18,03 $\pm$ 0,66	207,9
16	17,32 $\pm$ 0,52	138,6
17	12,50 $\pm$ 0,28	455,6
Total	17,42 $\pm$ 3,06	

Os dados descritivos (média e DP) dos volumes mineral, orgânico e de água estão expostos na Tabela 2. Os dados individuais para cada ponto podem ser conferidos no Apêndice C. Observou-se que a média dos volumes encontrada na linha neonatal foi de 85,88% ($\pm 3,36$) para o volume mineral, sendo a média dos

volumes minerais do esmalte pós-natal (Pós-natal 2 ($88,02\% \pm 3,30$) e Pós-natal1 ($88,13\% \pm 3,24$)) e pré-natal (Pré-natal 1 ($87,95\% \pm 2,95$) e Pré-natal 2 ($88,66\% \pm 2,82$)) maiores do que o volume encontrado na Linha Neonatal. Na figura 10 podemos observar o padrão hipomineralizado da linha neonatal.

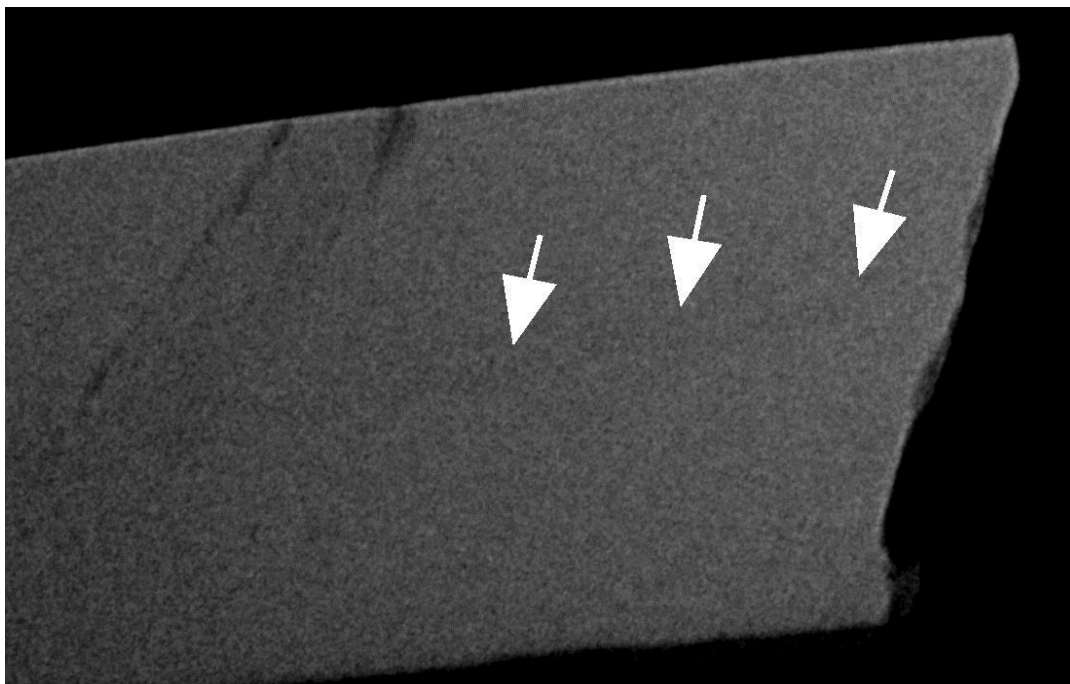


Figura 10– Imagem de radiomicrografia digital obtida em Micro-CT, em que se observa a linha neonatal (seta) apresentando ter um padrão hipomineralizados.

Com relação ao volume orgânico e volume de água, foi visto que a Linha Neonatal apresentou um volume médio maior (volume de matéria orgânica: $6,44\% \pm 2,71$ e volume de água: $7,68\% \pm 0,91$) em comparação aos demais pontos histológicos analisados.

Tabela 2 – Média e Desvio-padrão dos volumes minerais, orgânicos e de água da linha neonatal e das regiões de esmalte dentário pré e pós-natal.

Volume Mineral	Média (%)	DP
Pós-natal 2	88,02	3,30
Pós-natal 1	88,13	3,24
Linha Neonatal	85,88	3,36
Pré-natal 1	87,95	2,95
Pré-natal 2	88,66	2,82
Volume Orgânico	Média (%)	DP
Pós-natal 2	4,70	2,62
Pós-natal 1	4,75	2,73
Linha Neonatal	6,44	2,71
Pré-natal 1	4,69	2,36
Pré-natal 2	4,07	2,13
Volume de água	Média (%)	DP
Pós-natal 2	7,28	0,84
Pós-natal 1	7,13	0,73
Linha Neonatal	7,68	0,91
Pré-natal 1	7,36	0,81
Pré-natal 2	7,27	0,88

Os resultados do teste ANOVA de um fator para medidas repetidas (com nível de significância de 5% bicaudal) para o volume mineral, volume orgânico e volume de água estão descritos na Tabela 3. Foram observadas variações significativas no volume mineral ($p=2,15 \times 10^{-4}$; $\eta^2= 0,07$), volume orgânico ($p=9,9 \times 10^{-9}$; $\eta^2= 0,07$) e volume de água ($p=5,8 \times 10^{-5}$; $\eta^2= 0,05$) conforme a área avaliada (esmalte pré-natal, linha neonatal e esmalte pós-natal).

Tabela 3 – Resultados do teste ANOVA de um fator para medidas repetidas.

Volumes	p	eta ao quadrado
Volume mineral	$2,15 \times 10^{-4}$	0,07
Volume orgânico	$9,99 \times 10^{-9}$	0,07
Volume de água	$5,83 \times 10^{-5}$	0,05

Os resultados da análise do teste t pareado estão expostos na Tabela 4. Foram comparados os valores dos pontos histológicos (Pós-natal 2, Pós-natal1, Linha Neonatal, Pré-natal 1 e Pré-natal 2) entre si e observou-se diferenças significativas com relação ao volume mineral e volume orgânico da linha neonatal em relação aos outros pontos histológicos.

Sabendo que a magnitude G de Hedge varia entre pequena (menor que 0,5), média (0,5 a menor que 0,8) e alta (igual ou superior a 0,8)⁴⁵, para as comparações que envolveram a Linha Neonatal, observou-se um G de Hedge alto que variou de 1,21 a 1,88 para o volume mineral, 1,09 a 1,77 para o volume orgânico e 0,85 a 1,01 para o volume de água.

O volume mineral da linha neonatal mostrou-se menor que o do esmalte formado depois do nascimento (Região pós-natal 1 ($p=1,38 \times 10^{-4}$; G de Hedge= 1,21; IC95%= 2,00-0,42; poder= 99,43%) e Região pós-natal 2 ($p= 6,8 \times 10^{-5}$; G de Hedge=1,29; IC95%= 2,09-0,49; poder=99,72%) e antes do nascimento, em ambas as regiões (Esmalte pré-natal 1 ($p=8,44 \times 10^{-7}$; G de Hedge= 1,88; IC95%= 2,75-1,01; poder= 99,99%) e Esmalte pré-natal 2 ($p= 6,75 \times 10^{-5}$; G de Hedge= 1,37; IC95%= 2,18 – 0,56; poder= 99,86%)).

O volume orgânico na linha neonatal apresentou-se significativamente maior quando comparado ao esmalte pós-natal pós-natal (Pós-natal 1: $p=3,80 \times 10^{-4}$; G de Hedge= 1,09; IC95%= 1,86 – 0,31; Poder= 98,43% e Pós-natal 2: $p=3,26 \times 10^{-5}$; G de Hedge= 1,29; IC95%= 2,09–0,49; poder= 99,71%) e pré-natal (Pré- natal 1: $p=1,75 \times 10^{-6}$; G de Hedge=1,77; IC95%= 2,63-0,91; poder=99,99% e Pré-natal 2: $p=3,54 \times 10^{-5}$; G de Hedge= 2,18-0,56; poder= 99,86).

Com relação ao volume de água, na linha neonatal encontrou-se um volume maior tanto no esmalte pós-natal (Pós-natal 1: $p=1,96 \times 10^{-3}$; G de Hedge= 0,90; IC95%=1,66–0,13; poder= 93,27% e Pós-natal 2: $p=2,10 \times 10^{-3}$; G de Hedge= 0,89; IC95%= 1,65-0,13; poder= 92,89), quanto no esmalte pré-natal (Pré-natal 1: $p=7,60 \times 10^{-4}$; G de Hedge=1,01; IC95%= 1,78-0,23; poder= 97,01% e Pré-natal 2: $p=2,89 \times 10^{-3}$; G de Hedge: 0,85; IC95%= 1,61–0,09; poder= 90,83%).

Tabela 4. Resultados do Teste t pareado.

Volume Mineral	valor de p	g de Hedge	IC lim sup	IC lim inf	Poder
Pós-natal 2 x LN	6,86x10 ⁻⁵	1,29	2,09	0,49	99,72
Pós-natal 1 x LN	1,38x10 ⁻⁴	1,21	2,00	0,42	99,43
Pré-natal 1 x LN	8,44x10 ⁻⁷	1,88	2,75	1,01	99,99
Pré-natal 2 x LN	6,75x10 ⁻⁵	1,37	2,18	0,56	99,86
Pós-natal 2 x Pré-natal 1	0,88	0,04	0,76	-0,69	3,33
Pós-natal 2 x Pré-natal 2	0,13	0,39	1,12	-0,35	0,30
Pós-natal 1 x Pré-natal 1	0,73	0,08	0,81	-0,64	4,77
Pós-natal 1 x Pré-natal 2	0,16	0,35	1,09	-0,38	26,04
Volume Orgânico	valor de p	g de Hedge	IC lim sup	IC lim inf	Poder
Pós-natal 2 x LN	3,26x10 ⁻⁵	1,29	2,09	0,49	99,71
Pós-natal 1 x LN	3,80x10 ⁻⁴	1,09	1,86	0,31	98,43
Pré-natal 1 x LN	1,75x10 ⁻⁶	1,77	2,63	0,91	99,99
Pré-natal 2 x LN	3,54x10 ⁻⁵	1,37	2,18	0,56	99,86
Pós-natal 2 x Pré-natal 1	0,99	0,00	0,73	-0,73	2,54
Pós-natal 2 x Pré-natal 2	0,07	0,46	1,20	-0,27	41,85
Pós-natal 1 x Pré-natal 1	0,91	0,03	0,76	-0,70	3,13
Pós-natal 1 x Pré-natal 2	0,03	0,58	1,32	-0,16	60,32
Volume de água	valor de p	g de Hedge	IC lim sup	IC lim inf	Poder
Pós-natal 2 x LN	2,10 x 10 ⁻³	0,89	1,65	0,13	92,89
Pós-natal 1 x LN	1,96x10 ⁻³	0,90	1,66	0,13	93,27
Pré-natal 1 x LN	7,60x10 ⁻⁴	1,01	1,78	0,23	97,01
Pré-natal 2 x LN	2,89x10 ⁻³	0,85	1,61	0,09	90,83
Pós-natal 2 x Pré-natal 1	0,52	0,16	0,89	-0,57	8,21
Pós-natal 2 x Pré-natal 2	0,90	0,03	0,76	-0,70	3,16
Pós-natal 1 x Pré-natal 1	0,15	0,37	1,10	-0,36	28,01
Pós-natal 1 x Pré-natal 2	0,40	0,21	0,94	-0,52	11,26

Quando comparadas as regiões do esmalte, formadas antes (pré-natal 1 e pré-natal 2) e após o nascimento (pós-natal 1 e pós-natal 2), não foram encontradas diferenças expressivas nos volumes minerais, orgânicos e de água. Todas as comparações apresentaram uma magnitude de efeito g de Hedge baixa, variando de 0,00 a 1,88.

Uma correlação negativa (coeficiente $r = 0,451$; IC95% = 0,606-0,283; $p = 1,48 \times 10^{-5}$, poder de 99,30%) entre distância da linha neonatal e o volume mineral normalizado foi verificada, mostrando que à medida que se aproxima da linha neonatal o volume mineral diminui (Gráfico 1).

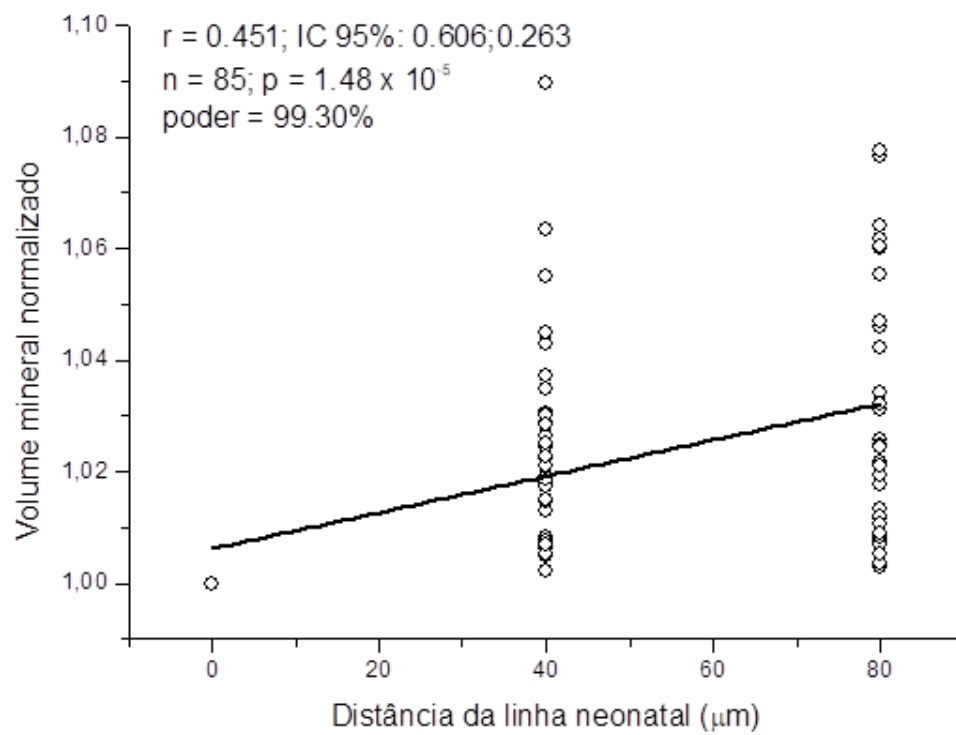


Gráfico 01 – Distribuição dos valores de volume mineral normalizado em função da distância da linha neonatal (μm).

6. DISCUSSÃO

Os nossos achados são a primeira evidência quantitativa no esmalte decíduo maduro de que a linha neonatal apresenta um menor volume mineral e maior volume orgânico e de água em relação ao esmalte formado antes e após o nascimento. A hipomineralização da linha neonatal já havia sido citada anteriormente^{8,9,34}, no entanto, nenhum estudo apresentou dados quantitativos de que a linha neonatal é menos mineralizada do que os esmaltes pré e pós-natal.

A diminuição do volume mineral na linha neonatal pode ser devido a um distúrbio na amelogênese relacionada à intensidade e duração dos fatores de estresse durante o nascimento^{18,46}. Os ameloblastos secretórios sofrem alterações dependendo da força do fator de estresse. Essas alterações podem resultar na diminuição da atividade secretória pelos ameloblastos ou na interrupção total ou temporária da secreção, justificando a evidência da hipoplasia na linha neonatal¹⁸ podendo resultar em um esmalte mais poroso⁸.

A maioria dos volumes minerais das amostras do presente estudo está de acordo com o encontrado na literatura, os mesmos variaram de 80,06% a 93,39%. Dados na literatura mostram que o volume mineral em incisivos decíduos desde a JAD até a superfície¹², para uma densidade 3,15g/cm³, variaram de 76,9% a 83,4%, o que corresponde a 79,3% e 87,2 fazendo uma conversão para a densidade 2,99g/cm³ (que foi utilizada neste estudo), a partir da equação relatada por Eliott⁴² 1998.

Através da Correlação de Pearson, foi visto que os valores minerais do esmalte decresceram à medida que se aproximam da linha neonatal. Isso pode ser explicado pelo fato de após o estresse do nascimento a célula levar um tempo para ser alterada e um novo tempo para se recuperar, o que é compatível com o que se sabe sobre resposta celular ao estresse⁴⁷. Em consistência com essa informação, essa alteração no esmalte dentário pode levar de 7 a 15 dias^{28,36} para ser vistas no esmalte dentário, isso pode ser evidenciado pelo fato de bebês que sobreviveram por poucos dias após o nascimento não apresentarem evidências da formação da linha neonatal⁹.

A formação da linha neonatal é influenciada pela hipocalcemia e por um nível significativamente mais baixo de vitamina D₃ (calcitriol) que ocorre nos primeiros dias

de vida¹⁰. A diminuição da disponibilidade de íons cálcio pode influenciar a atividade dos ameloblastos, uma consequência da qual pode ser a linha neonatal^{34,48}.

O estresse do nascimento afeta a secreção do esmalte e após a fase de secreção há a maturação. Entende-se que no estágio de maturação, os componentes orgânicos não são retirados como deveriam, devido a uma possível mudança qualitativa na matriz orgânica que impede as enzimas (MMP-20 e KLK-4) atuarem de maneira eficiente para promover a maturação, isso pode justificar os nossos achados: um volume mineral menor na linha neonatal e uma quantidade de matéria orgânica e água maior quando comparado a outras regiões do esmalte.

Com relação à largura da linha neonatal, estudos mostram a sua correlação com o estresse e o trauma ao qual a criança foi exposta durante o parto^{48,49,50}. Os bebês que foram submetidos a partos normais apresentam uma LN mais espessa (9,2µm, - 13µm) do que aqueles submetidos a partos cesáreos eletivos (2,5µm - 4,12 µm) medidos a partir de MEV⁴⁹. Esses achados foram concordantes com os resultados de Eli et al.³⁰, que encontraram linhas neonatais com espessura até 24µm (18,6 ± 5,7 µm) de largura em crianças que tiveram partos mais difíceis e linhas mais delgadas nos casos de cesariana, principalmente devido ao menor tempo de nascimento³⁰.

Outro estudo observou a largura média da LN de 9,63 µm (min: 3,16 µm, máx: 27,58µm), em que não foi encontrada associação significativa entre a largura da linha e o modo de parto, no entanto, a largura parece ser inversamente proporcional à duração do parto¹⁸, podendo ser vista também como resultado de alterações e fatores pré-natais relacionados ao desenvolvimento gestacional⁵⁰. Nossos achados foram baseados na mensuração da linha neonatal através do microscópio de luz polarizada e as larguras das linhas variaram de 10,73 a 25,71 µm, estando dentro das faixas encontradas em outros estudos.

Com relação à comparação entre o esmalte pré e pós-natal, nossos dados não mostraram diferenças expressivas nos volumes minerais, orgânicos e de água. Todas as comparações apresentaram uma magnitude de efeito baixa, no entanto, está descrito na literatura que o esmalte pós-natal é menos mineralizado e tende a ter mais defeitos estruturais que o esmalte pré-natal^{30,32}. Apesar disso, estudos mostram que não há diferença na taxa de perda mineral no esmalte pré e pós-natal³¹, não sendo possível tirar conclusões gerais sobre as diferenças no grau de

mineralização entre as duas regiões^{14,34}, mesmo sabendo que os prismas do esmalte pós-natal são menores¹⁴ e que a taxa de secreção pós-natal é mais reduzida²⁷.

Este estudo apresentou limitações quanto à amostra, pois não se sabe o histórico desses indivíduos, nem informações importantes como questões relacionadas ao período de nascimento e tipo e duração do parto, que poderiam ajudar a justificar e discutir de maneira mais específica os resultados encontrados.

Como perspectivas futuras e forma de complementar nossos achados, esperamos determinar a presença de moléculas orgânicas específicas conforme a metodologia proposta por Stewart et al.⁵¹, em que peptídeos do esmalte e outras moléculas orgânicas podem ser encontradas e caracterizadas através da Espectrometria de Massas. A investigação desses peptídeos poderia levar ao estudo dos genes relacionados, promovendo um maior entendimento acerca da amelogenese e dos defeitos dos desenvolvimentos do esmalte.

7. CONCLUSÃO

A partir dos nossos achados, pode-se concluir que o estresse fisiológico do nascimento afeta os componentes volumétricos do esmalte, sendo a linha neonatal uma hipomineralização do esmalte dentário com alto conteúdo orgânico e de água em comparação com as regiões pré-natais e pós-natais. O volume mineral das regiões do esmalte formadas antes e após o nascimento mostrou-se diminuído à medida que se aproxima da linha neonatal.

REFERÊNCIAS*

1. Biswas N, Dey A, Kundu S, Chakraborty H, Mukhopadhyay AK. Mechanical Properties of Enamel Nanocomposite. *Biomaterials*. Hindawi Publishing Corporation 2013; 1-15.
2. Srinivasan S, Murthy PS, Deshmukh S, Shamsundar NM. A comparative study to associate the presence of neonatal line in deciduous teeth of infants with the occurrence of live birth. *J Indian Soc Pedod Prev Dent* 2017; 35(3): 249-53.
3. Macena MAS, Leite MLA, Gouveia CL, Athayde P, Alconforado T, Sousa FB. A comparative study on component volumes from outer to inner dental enamel in relation to enamel tufts. *Archives of oral biology* 2014; 59(6): 568-577.
4. Moradian-oldak J. Protein- mediated enamel mineralization, *Frontiers in Bioscience* 2012;12(17): 1996-2023.
5. Lu, Y, Papagerakis, P, Yamakoshi, Y, Hu, JC-C, John D. Bartlett, JD, Simmer, JP, Functions of KLK4 and MMP-20 in dental enamel formation. *Biol Chem* 2008; 389(6): 695–700.
6. Smith TM. Experimental determination of the periodicity of incremental features in enamel. *J. Anat* 2006; 208(1):99–113.
7. Birch W, Dean MC. Rates of Enamel Formation in Human Deciduous Teeth. *Front Oral Biol* 2009;13:116-20.
8. Sabel N, Johansson C, Kuhnisch J, Robertson A, Steiniger F, Norén JG, Klingberg G, Nietzsche S. Neonatal lines in the enamel of primary teeth. A morphological and scanning electron microscopic investigation. *Arch Oral Biol*. 2008; 53(10):954-963.
9. Weber DF, Eisenmann DR. Microscopy of the neonatal line in developing human enamel. *Am J Anat* 1971; 132(3):375–91.
10. Kurek M, Zadzińska E, Sitek A, Borowska-Struginska B, Rosset I, Lorkiewicz W. Prenatal factors associated with the neonatal line thickness in human deciduous incisors. *HOMO - J. Comp. Hum. Biol* 2015; 66(1):1-13.

11. Brookes SJ, Robinson C, Kirkham J, Bonass WA. Biochemistry and molecular biology of amelogenin proteins of developing dental enamel. *Archs oral Biol* 1995; 40(1):1-14.
12. Wilson PR, Beynon AD. Mineralization differences between human deciduous and permanent enamel measured by quantitative microradiography. *Archs oral boil* 1989; 34(2): 85-88.
13. Radlanski RJ, Renz H. Developmental movements of the inner enamel epithelium as derived from micromorphological features. *Eur J Oral Sci* 2006; 114(1): 343-348.
14. Sabel N. Enamel of Primary Teeth morphological and chemical aspects. Gothenburg. Thesis [PhD in Pediatric Dentistry]. University of Gothenburg. 2012.
15. Skobe, Z. SEM evidence that one ameloblast secretes one keyhole-shaped enamel rod in monkey teeth. *Eur J Oral Sci* 2006; 114, 338-342
16. Fejerskov O, Silverstone LM, Melsen B, Moller IJ. Histological features of fluorosed human dental enamel. *Caries Res* 1975; 9: 190-210.
17. Tafforeau P, Zermeno JP, Smith TM. Tracking cellular-level enamel growth and structure in 4D with synchrotron imaging. *J. Hum. Evol.* 2012; 62: 424–428.
18. Hurnanen J, Visnapuu V, Sillanpaa M, Loytyniemi E, Rautava J. Deciduous neonatal line: width is associated with duration of delivery, *Forensic Science International* 2016; 1-12.
19. Kwak SY, Yamakoshi Y, Simmer JP and Margolis HC. MMP20 Proteolysis of Native Amelogenin Regulates Mineralization In Vitro. *Journal of Dental Research* 2016; 95(13):1511–1517.
20. Whittaker, DK. Structural variations in the surface zone of human tooth enamel observed by scanning electron microscopy. *Archives of Oral Biology* 1982; 27:383-392.
21. Smith TM. Incremental Development of Primate Dental Enamel. Dissertation [PhD in Philosophy]. Stony Brook University. Nova York. 2004

22. Nagano T, Kakegawa A., Yamakoshi Y, Suchiya S, Hu J, Gomi K, Arai T, Bartlett JD, Simmer JD. Mmp-20 and Klk4 Cleavage Site Preferences for Amelogenin Sequences. *J Dent Res* 2009; 88(9): 823-828.
23. Hu Y, Hu Jc-C, Smith CE, Bartlett JD, Simmer, JP. Kallikrein-related peptidase 4, matrix metalloproteinase 20, and the maturation of murine and porcine enamel. *Eur J Oral Sci* 2011; 199(1): 217–225.
24. Li W, Gao C, Yan Y, Besten PD. X-linked amelogenesis imperfecta may result from decreased formation of tyrosine rich amelogenin peptide (TRAP). *Archives of Oral Biology* 2003; 48(3): 177-183.
25. Antonie D, Hillson S, Dean MC. The developmental clock of dental enamel: a test for the periodicity of prism cross-striations in modern humans and an evaluation of the most likely sources of error in histological studies of this kind. *J. Anat* 2009; 214, 45–55
26. Dean MC. Tooth microstructure tracks the pace of human life-history evolution. *Proc Biol Sci.* 2006; 273(1603): 2799-2808.
27. Mahoney P. Incremental Enamel Development in Modern Human Deciduous Anterior Teeth. *American journal of physical anthropology* 2012; 147(4): 637–651.
28. Nava A, Bondioli, L, Alfredo C, Christopher D, Paola FR, CleÂment Z. New regression formula to estimate the prenatal crown formation time of human deciduous central incisors derived from a Roman Imperial sample (Velia, Salerno, Italy, I-II cent. CE). *PLoS ONE* 2017; 12(7): 1-21.
29. FitzGerald, C.M. Do enamel microstructures have regular time dependency? Conclusions from the literature and a large-scale study. *Journal of Human Evolution* 1998; 35:371-386.
30. Eli I, Sarnat H, Talmi E. Effect of the birth process on the neonatal line in primarytooth enamel. *Pediatr Dent* 1989; 11(3):220–3.
31. Mishra S, Thomas HF, Fearne JM, Boyde A, Anderson P. Comparison of demineralisation rates in pre- and postnatal enamel and at the neonatal line. *Archives of oral biology* 2009; 54:s101–s106.

32. Schour, I. The neonatal line in the enamel and dentin of human deciduous teeth and first permanent molar. *Journal of the American Dental Association* 1936; 23:1946-1955.
33. Whittaker, D.K., and Richards, D. Scanning electron microscopy of the neonatal line in human enamel. *Archives of Oral Biology* 1978; 23:45-50.
34. Norén, JG. Enamel structure in deciduous teeth from low-birth-weight infants. *Acta Odontol. Scand* 1983; 41, 355-362.
35. Witzel C. Echoes from birth – mutual benefits for physical and forensic anthropology by applying increment counts in enamel of deciduous teeth for aging. *Anthropol Anz.* 2014; 71(1): 87-103.
36. Smith P, Avishai G. The use of dental criteria for estimating postnatal survival in skeletal remains of infants. *Journal of Archaeological Science* 2005; 32: 83–89.
37. Janardhanan M, Umadethan B, Biniraj K, Kumar RV, Rakesh S. Neonatal line as a linear evidence of live birth: Estimation of postnatal survival of a new born from primary tooth germs. *J Forensic Dent Sci* 2011; 3:8–13.
38. Noren, JG. Microscopic study of enamel defects in deciduous teeth of infants of diabetic mothers. *Acta Odontol. Scand* 1984; 42:153-156.
39. Marconi MA; Lakatos EM. *Fundamentos de metodologia científica*. 7. ed. São Paulo: Atlas, 2010.
40. Elliott JC. Structure, crystal chemistry and density of enamel apatites. *Ciba Found Symp.* 1997; 205: 54–72.
41. Angmar B, Carlstrom D, Glas JE. Studies on the ultrastructure of dental enamel. IV. The mineralization of normal human enamel. *J. Ultrastruct. Res.* 1963; 8:12–3.
42. Sousa FB., Vianna SS, Magalhães NS. A new approach for improving the birefringence analysis of dental enamel mineral content from polarizing microscopy. *J. Microsc* 2006; 21(2):79-83.
43. Field A. *Discovering Statistic Using SPSS*. London: SAGE; 2009.

44. Dean A, Voss D. Design and Analysis of Experiências, Nova Iorque: Springer, 1999.
45. Cohen J. Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences (Revised Ed.). Academic Press, 1st Edition, 1977
46. Witzel C., Kierdorf U., Schultz M., Kierdorf H. Insights from the inside: histological analysis of abnormal enamel microstructure associated with hypoplastic enamel defects in human teeth. *Amer J Phys Anthropol.* 2008; 136:400-414
47. Pakos-Zebrucka K, Koryga I, Mnich K, Ljubic M, Samali A, Gorman AM. The integrated stress response. *EMBO reports* (2016) 17, 1374-1395.
48. Kurek, M., et al., Neonatal line width in deciduous incisors from Neolithic, mediaeval and modern skeletal samples from north-central Poland. *Ann. Anatomy* 2015; 1-7.
49. Canturk N, Atsu SS, Aka PS, Dagalp R. Neonatal line on fetus and infant teeth – An indicator of live birth and mode of delivery. *Early Human Development.* 2014; 90: 393-397.
50. Zanolli C, Bondioli L, Manni F, Rossi P, Macchiarelli R. Gestation Length, Mode of Delivery, and Neonatal Line- Thickness Variation. *Bio One* 2011; 83(6): 695-713.
51. Stewart NA; Molina GF; Issa JPM; Yates NA; Sosovicka M; Vieira AR; Line SRP; Montgomery J; Gerlach RF. The identification of peptides by nanoLC-MS/MS from human surface tooth enamel following a simple acid etch extraction. *The Royal Society of Chemistry* 2016; 6(66): 61673-61679.

* De acordo com as normas do PPGO/UFPB, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors - Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

ANEXO

PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

DETALHAR PROJETO DE PESQUISA	
☐ DADOS DO PROJETO DE PESQUISA	Título Público: Estudos sobre a composição da linha neonatal Pesquisador Responsável: Raquel Fernanda Gerlach Contato Público: Raquel Fernanda Gerlach Condições de saúde ou problemas estudados: Descritores CID - Gerais: Descritores CID - Específicos: Descritores CID - da Intervenção: Data de Aprovação Ética do CEP/CONEP: 20/12/2017 
☐ DADOS DA INSTITUIÇÃO PROPONENTE	Nome da Instituição: Universidade de São Paulo Cidade: RIBEIRÃO PRETO
☐ DADOS DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	Comitê de Ética Responsável: 5419 - USP - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da USP - FORP/USP Endereço: Avenida do Café s/nº Telefone: (16)3315-0493 E-mail: cep@forp.usp.br
☐ CENTRO(S) PARTICIPANTE(S) DO PROJETO DE PESQUISA	
☐ CENTRO(S) COPARTICIPANTE(S) DO PROJETO DE PESQUISA	

APÊNDICE A

CÁLCULO DO COEFICIENTE DE ATENUAÇÃO LINEAR DO ESMALTE (μm)

Fórmula da célula unitária da hidroxiapatita do esmalte dentário:

Ca 8.856 + **Mg** 0.088 + **Na** 0.292 + **K** 0.010 + **P** 5.592 + **Cl** 0.078 + **O** 25.507 + **H** 2.554 + **C** 0.457 (Elliot, 1997)*

Cálculo da massa total dos elementos minerais na célula unitária de HAP

Multiplicação da concentração do elemento mineral em mol com a sua massa molar (Tabela periódica dos elementos químicos):

$8.856 \times 40.04 + 0.088 \times 24.30 + 0.292 \times 22.9 + 0.010 \times 39.10 + 5.592 \times 30.97 + 0.078 \times 35.45 + 25.507 \times 16.00 + 2.554 \times 1 + 0.457 \times 12.01 = \mathbf{956.319}$

Porcentagem de cada elemento na célula unitária

Para encontrar a porcentagem de cada elemento na célula unitária multiplica-se a concentração molar do mineral por seu numero de massa e divide-se pela massa total dos elementos da célula unitária.

CÁLCIO (Ca): $8.856 \times 40.08 \div 956.269 = 0.371$ **(37.1%)**

MAGNÉSIO(Mg): $0.088 \times 24.31 \div 956.269 = 2.237 \times 10^{-3}$ **(0.224%)**

SÓDIO (Na): $0.292 \times 22.99 \div 956.269 = 702 \times 10^{-3}$ **(0.702%)**

POTÁSSIO(K): $0.010 \times 39.10 \div 956.269 = 4.089 \times 10^{-3}$ **(0.041%)**

FÓSFORO(P): $5.592 \times 30.97 \div 956.269 = 0.181$ **(18.1%)**

CLORO (Cl): $0.078 \times 35.45 \div 956.269 = 2.892 \times 10^{-3}$ **(0.029%)**

OXIGÊNIO (O): $25.507 \times 16.00 \div 956.269 = 0.427$ **(42.7%)**

HIDROGÊNIO(H): $1 \times 1 \div 956.269 = 2.671 \times 10^{-3}$ **(0.027 %)**

CARBONO(C): $0.457 \times 12.01 \div 956.269 = 5.74 \times 10^{-3}$ **(0.057 %)**

Quadro 1 - Coeficientes de Atenuação de Massa (**MAC**) para Raios-X dos elementos dos químicos da HAP do esmalte dentário para energia de excitação de 10 kev.

Elemento Químico	MAC excitado com 10 KeV
Cálcio (Ca)	93,41
Magnésio (Mg)	21,06
Sódio (Na)	15,57
Potássio (K)	79,07
Fósforo (P)	40,36
Cloro (Cl)	57,25
Oxigênio (O)	5,953
Hidrogênio (H)	0,3854
Carbono (C)	2,373

Cálculos da porcentagem de cada elemento da célula unitária da hidroxiapatita.

Fórmula empírica com frações dos elementos e seus respectivos MACs para a obtenção do MAC total do esmalte:

Ca 93.41×0.371 + **Mg** 21.06×0.002237 + **Na** 15.57×0.00702 + **K** 79.07×0.0004089 + **P** 40.36×0.181 + **Cl** 57.25×0.002892 + **O** 5.953×0.427 + **H** 0.3854×0.002671 + **C** 2.373×0.00574 = **44.822 (MAC total do esmalte)**

Para calcular o Coeficiente de Atenuação Linear do esmalte (μm):

Multiplica-se a **densidade do Esmalte** pelo seu **MAC**:

Densidade do Alumínio = 2,99 g/cm³

MAC total do esmalte = 44.822

$\mu\text{m} = 44.822 \times 2.99 = 134,017$
--

*(ELLIOTT, J.C. Structure, crystal chemistry and density of enamel apatites. **Dental enamel** (ed. by D. Chadwick and G. Cardew), v.205, p. 54–72, Ciba Foundation Symposium Wiley, Chichester, 1997).

APÊNDICE B

CÁLCULO DO COEFICIENTE DE ATENUAÇÃO LINEAR DO ALUMÍNIO (μ_{Al})

O Coeficientes de Atenuação de Massa (**MAC**) para raios x do Elemento alumínio para energia de excitação de 10 kev é 26.21.*

- Densidade do Alumínio = 2,699g/cm³

Para calcular o Coeficiente de Atenuação Linear do alumínio (μ_{Al}):

Multiplica-se a **densidade do Alumínio** pelo seu **MAC**:

$$\mu_{Al} = 2,699 \times 26.21 = 70.74079$$

* **Fonte:** <https://physics.nist.gov/cgi-bin/Xcom/xcom2>

APÊNDICE C

DADOS INDIVIDUAIS DOS PONTOS HISTOLÓGICOS ANALISADOS

	Amostra	Distância (μm)	Vol. Mineral (%)	Vol. orgânico (%)	Vol. de água (%)
A1	Pós natal 2	42	82,12	9,95	7,94
	Pós natal 1	82	81,60	10,57	7,83
	Linha Neonatal A1	112	80,06	11,44	8,49
	Pré natal 1	152	83,51	8,09	8,40
	Pré natal 2	192	81,80	9,49	8,71
A2	Pós natal 2	236,8	90,51	2,04	7,45
	Pós natal 1	276,8	88,56	3,42	8,02
	Linha Neonatal A2	316,8	85,37	5,49	9,14
	Pré natal 1	356,8	87,45	4,49	8,06
	Pré natal 2	396,8	88,29	3,31	8,41
A3	Pós natal 2	118	88,15	4,73	7,12
	Pós natal 1	158	88,34	4,68	6,98
	Linha Neonatal A3	198	87,90	5,08	7,02
	Pré natal 1	238	90,43	3,09	6,48
	Pré natal 2	278	88,56	4,65	6,79
A4	Pós natal 2	147,7	85,13	7,15	7,72
	Pós natal 1	187,7	85,76	7,26	6,98
	Linha Neonatal A4	227,7	80,66	11,62	7,72
	Pré natal 1	267,7	82,08	10,25	7,67
	Pré natal 2	307,7	86,83	5,97	7,20
A5	Pós natal 2	28,9	88,07	4,75	7,18
	Pós natal 1	68,9	87,87	4,39	7,74
	Linha Neonatal A5	108,9	85,93	6,44	7,63
	Pré natal 1	148,8	88,21	4,88	6,91
	Pré natal 2	188,8	89,87	3,50	6,63
A6	Pós natal 2	98,2	82,16	9,64	8,20
	Pós natal 1	138,2	84,00	7,79	8,21
	Linha Neonatal A6	178,2	81,52	10,10	8,38
	Pré natal 1	218,2	83,03	8,51	8,46
	Pré natal 2	258,2	87,85	4,57	7,58
A7	Pós natal 2	68	88,70	4,02	7,28
	Pós natal 1	108	88,23	4,77	7,00
	Linha Neonatal A7	148	87,68	4,90	7,42
	Pré natal 1	188	88,83	4,05	7,11
	Pré natal 2	228	88,61	4,45	6,94

A8	Pós natal 1	48,7	91,64	1,51	6,85
	Pós natal 2	88,7	89,34	2,94	7,72
	Linha Neonatal A8	128,7	86,32	5,86	7,82
	Pré natal 2	168,7	88,48	3,85	7,67
	Pré natal 1	208,7	91,52	1,75	6,73
A9	Pós natal 2	127,9	86,66	5,18	8,16
	Pós natal 1	167,9	87,85	4,38	7,77
	Linha Neonatal A9	207,9	86,34	5,71	7,95
	Pré natal 1	247,9	90,21	2,31	7,48
	Pré natal 2	287,9	86,93	4,60	8,47
A10	Pós natal 2	19	82,34	8,23	9,43
	Pós natal 1	59	82,83	9,43	7,74
	Linha Neonatal A10	99	80,37	9,80	9,83
	Pré natal 1	139	84,79	6,33	8,88
	Pré natal 2	179	83,77	7,40	8,83
A11	Pós natal 2	152,6	88,55	4,56	6,89
	Pós natal 1	192,6	90,05	3,64	6,31
	Linha Neonatal A11	232,6	87,38	5,50	7,12
	Pré natal 1	272,6	88,67	4,39	6,94
	Pré natal 2	312,6	88,94	3,81	7,26
A12	Pós natal 2	43,75	88,57	4,56	6,87
	Pós natal 1	83,75	87,98	5,10	6,92
	Linha Neonatal A12	123,75	87,52	5,48	7,00
	Pré natal 1	163,75	88,24	4,91	6,85
	Pré natal 2	203,75	88,44	4,87	6,69
A13	Pós natal 2	78	89,71	3,53	6,76
	Pós natal 1	118	93,39	0,68	5,93
	Linha Neonatal A13	158	85,70	6,62	7,68
	Pré natal 1	198	88,29	4,18	7,53
	Pré natal 2	238	91,18	2,13	6,69
A14	Pós natal 2	138	90,17	2,79	7,04
	Pós natal 1	178	90,33	2,85	6,82
	Linha Neonatal	218	88,32	4,17	7,51
	Pré natal 1	258	89,00	3,45	7,55
	Pré natal 2	298	89,06	3,30	7,64
A15	Pós natal 2	127,9	90,72	3,04	6,24
	Pós natal 1	167,9	88,18	5,03	6,79
	Linha Neonatal	207,9	87,97	5,42	6,61
	Pré natal 1	247,9	90,48	3,18	6,34
	Pré natal 2	287,9	90,98	2,43	6,59

A16	Pós natal 2	58,6	90,73	2,52	6,75
	Pós natal 1	98,6	91,53	1,92	6,55
	Linha Neonatal	138,6	89,00	3,82	7,18
	Pré natal 1	178,6	90,88	2,33	6,79
	Pré natal 2	218,6	91,85	1,58	6,57
A17	Pós natal 2	375,4	92,47	1,67	5,86
	Pós natal 1	415,4	93,36	0,99	5,65
	Linha Neonatal	455,4	91,98	1,92	6,10
	Pré natal 1	495,4	92,61	1,51	5,88
	Pré natal 2	535,4	92,82	1,39	5,79