

01485



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**INMUNOEXPRESIÓN DE EGF-R y erbB-2 Y PATRON DE
SIALILACION EN LA ODONTOGÉNESIS DE MURINOS
EXPUESTOS A ETANOL DURANTE LA GESTACIÓN**

T E S I S

QUE PRESENTA

C.D. María Dolores Jiménez Farfán

PARA LA OBTENCIÓN DE GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

Área de Especialización: Biología Bucal

Director de tesis: Dr. Juan Carlos C. Hernández Guerrero

Asesores: Dr. Miguel Angel Jorge Guevara Fonseca
Dr. Edgar Zenteno Galindo



México, D.F. 2005

0350090



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO

Dra. Victoria Chagoya Hazas (Instituto de Fisiología Celular, UNAM).

Dr. Edgar Zenteno Galindo (Facultad de Medicina, UNAM).

Dr. Juan Carlos C. Hernández Guerrero (Facultad de Odontología, UNAM).

Dra. Elba Rosa Leyva Huerta (Facultad de Odontología, UNAM).

Dr. Constantino Ledesma Montes (Facultad de Odontología, UNAM).

Dr. Luis Felipe Jiménez García (Facultad de Ciencias, UNAM).

Dr. Jorge Guevara Fonseca (Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, SSA).

INDICE

| | página |
|---------------------|---------------|
| RESUMEN | 6 |
| INTRODUCCIÓN | 8 |
| ANTECEDENTES | 12 |
| HIPÓTESIS | 21 |
| OBJETIVOS | 22 |
| METODOLOGÍA | 23 |
| RESULTADOS | 26 |
| DISCUSIÓN | 29 |
| CONCLUSIONES | 40 |
| PERSPECTIVAS | 41 |
| BIBLIOGRAFÍA | 43 |
| ANEXO | 61 |

RESUMEN

El Síndrome del Feto Alcoholizado (Fetal Alcohol Syndrome –FAS-) presenta alteraciones en el entorno craneofacial con defectos en las estructuras dentarias (dientes pequeños, alteraciones en el esmalte y erupción retrasada). Diversas glicorproteínas como la familia EGF participan en la proliferación y diferenciación dental, por lo que los cambios en la actividad de estas moléculas, se ha asociado a las anomalías observadas en el FAS. Debido a la importancia de los glicoconjugados en el desarrollo dental, los cuales son determinantes de la morfología dental y la secreción de matrices extracelulares, el objetivo de este estudio fue evaluar el patrón de expresión EGF-R y erbB-2, así como de estructuras sialiladas reconocidas por las lectinas derivadas de *Sambucus nigra* –SNA-, *Maackia amurensis* –MAA-, *Machrobrachium rosenbergii* –MRL- y *Amaranthus leucocarpus* –ALL- en gérmenes dentarios de fetos de ratón expuestos a etanol durante la gestación. Los resultados obtenidos mostraron una reducción significativa del peso y talla de las crías a los 16.5 y 18.5 días prenatal ($p < 0.01$), específicamente en los grupos de 15%, 20% 25% de etanol. A estas mismas concentraciones se observaron alteraciones en la diferenciación celular, cambios degenerativos en los tejidos epiteliales dentales y, talla dental reducida ($p < 0.01$). Se observó incremento en la inmunoreactividad de los factores de crecimiento EGF-R and erbB-2 a partir del 15% de etanol. La membrana basal, preameloblastos, preodontoblastos, epitelio dental interno y células subodontoblásticas de los grupos tratados con etanol tuvieron cambios en la expresión de estructuras sialiladas. Se observó reconocimiento intranuclear en el grupo control con la lectina SNA (específica para Neu5Ac α 2,6Gal/GalNAc), sin embargo, éste se redujo en los grupos tratados. Las células de la papila dental mostraron reconocimiento intranuclear con MAA (específica

para Neu5Ac α 2,3Gal) sólo en los grupos tratados. Se puede concluir que el consumo de etanol provocó alteraciones en el crecimiento y desarrollo fetal, así como retraso en la morfogénesis dental y talla dental reducida, lo cual estuvo relacionado con alteraciones en el patrón de expresión de receptores EGF-R y erbB-2. Asimismo, tomando en cuenta la importante relación de las estructuras sialiladas en el reconocimiento celular, en la regulación de las interacciones epitelio-mesenquimales y en el contacto célula-matriz extracelular se puede concluir que las alteraciones en el patrón de sialilación de los gérmenes dentarios expuestos a etanol estuvieron relacionadas con las modificaciones en la morfodiferenciación dental observada. Debido al origen común del órgano dentario con las estructuras neurales afectadas por el FAS, representa un modelo útil en el estudio de las interacciones epitelio-mesenquimales que regulan la morfogénesis de diversos órganos y tejidos después de exposición a etanol *in utero*.

INTRODUCCION

Una de las principales causas de defectos al nacimiento es el consumo materno de alcohol (AAP, 2000). El Síndrome del Feto Alcoholizado (Fetal Alcohol Syndrome –FAS-) fue el nombre dado al conjunto de alteraciones congénitas causadas por el consumo de alcohol durante la gestación (Lemoine et al., 1968). El diagnóstico de este síndrome se basa principalmente en el reconocimiento del retraso en el crecimiento, anormalidades del sistema nervioso central y diversas alteraciones craneofaciales (Jones et al., 1973). La prevalencia de FAS en el ámbito mundial se estima entre un 0.5% y 3% por cada 1000 nacidos vivos en comunidades con alto consumo de alcohol (Stratton et al., 1996). Sudáfrica es actualmente considerado el país con la mayor prevalencia de FAS con 46.4% por cada 1000 nacimientos (May et al., 2000).

Entre los diversos efectos del etanol provocados en los tejidos fetales, se encuentran las alteraciones en la estructura y función de las membranas celulares (McCall et al., 1989), el estrés oxidativo (Halliwell & Gutteridge, 1989), las alteraciones en la expresión de factores de crecimiento y la restricción en el abastecimiento de oxígeno a través de la placenta (Horiguich et al., 1971). El etanol también altera el ADN y la síntesis de proteínas, generando proliferación celular reducida durante la organogénesis (Brown et al., 1979; Weston et al., 1994). Durante el desarrollo embrionario, diversas proteínas tales como los miembros de la familia EGF (Epidermal Growth Factor), junto con sus receptores transmembranales están implicadas en la regulación del crecimiento en los diferentes estadios de desarrollo (Henderson et al., 1999). El reporte de los efectos del etanol sobre el desarrollo maxilofacial ha permitido sugerir que los cambios metabólicos generados por éste, pueden alterar vías de señalización reguladas por factores de crecimiento como la

familia EGF (Henderson et al., 1989b; Hernández, 1990; Hernández-Guerrero et al., 1996).

El consumo de dosis altas y frecuentes de etanol durante el primer trimestre del embarazo afecta principalmente las características faciales y estructuras de origen neural (Little & Wendt, 1991; Russel, 1991; Abel, 1995). La fetotoxicidad del etanol en el sistema nervioso central se presenta con frecuencia en el cerebelo, hipocampo y corteza cerebral (Watts et al., 2005). Debido a las alteraciones neurológicas observadas en los niños con FAS, se ha analizado el papel de las células de la cresta neural en este síndrome, dado que en presencia de etanol se puede alterar su patrón de migración y muerte celular (Cohen & Shiota, 2002). Las células de la cresta neural dan origen a una gran variedad de células entre las que se encuentran las que formarán parte de las estructuras faciales incluyendo los órganos dentarios (Ten Cate, 1998).

La organogénesis dental involucra tres procesos fundamentales: determinación de la posición interpretada como la información de dónde deberá situarse el futuro órgano (iniciación), la construcción de un esbozo de órgano (morfogénesis) y, la formación de estructuras específicas del órgano (diferenciación) (Peters & Balling, 1999). El diente en desarrollo del ratón ha sido utilizado como un modelo para investigar cada uno de estos procesos. Los dientes son estructuras únicas de los vertebrados, los cuales como otros órganos se desarrollan a través de diversas interacciones entre dos tejidos adyacentes: un epitelio y un mesénquima.

Durante el desarrollo ocurren cambios importantes en la talla, forma, posición y composición de todos los tejidos. Factores ambientales adversos pueden originar una desviación de la conformación estructural y funcional normal, dando como resultado defectos congénitos. Existen diversas teorías que intentan explicar el mecanismo

teratogénico del alcohol en los diferentes órganos, por lo que el germen dentario nos ofrece la posibilidad de ser un buen modelo para el estudio de la morfogénesis, proliferación y diferenciación celular.

Los organismos multicelulares poseen cientos de genes involucrados con la modificación traduccional de las moléculas de la superficie celular. Estas moléculas median las interacciones célula-célula, célula-matriz extracelular, eventos de señalización, y forman estructuras que son importantes para el desarrollo de los órganos y tejidos (Jürgen, 1987; Hennes & Ellies, 1999; Miosge et al., 1998; Jiménez-Martínez et al., 2002).

La glicosilación es un proceso co- y pos-traduccional de las proteínas que consiste en el ensamble de estructuras glicosídicas a través de enzimas presentes en el retículo endoplásmico y aparato de Golgi (Lis & Sharon, 1993; Lis & Sharon, 1998; Yarema & Bertozzi, 2001). Diversos cambios en las moléculas sacarídicas de los glicoconjugados se presentan durante el desarrollo embrionario y fetal normal (Miosge et al., 1998; Gheri et al., 2000). Los glicoconjugados varían su distribución entre los diferentes tipos celulares y estadios de desarrollo (Jürgen, 1987; Hennes & Ellies, 1999; Miosge et al., 1998; Jiménez-Martínez et al., 2002). Estos cambios también han sido observados en las estructuras craneofaciales y dentales (Johnston and Bronsky, 1995; Yamane et al., 1997; Miettinen et al., 1999; Tanikawa & Bawden, 1999; Heymann et al., 2002; Wise et al., 2002; Yamamoto, 2003) y se ha sugerido que la morfogénesis dental, el crecimiento, la citodiferenciación y la formación de matriz de dentina y esmalte están regulados por diversos glicoconjugados (Partanen & Thesleff, 1987; Thesleff et al., 1995).

La sialilación es un complejo proceso que se realiza a través sialiltransferasas presentes en el aparato de Golgi (Harduin-Lepers et al., 2005). Los ácidos siálicos afectan las funciones enzimáticas y receptoras en la célula durante la proliferación y diferenciación, lo

que determina las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular. Esto ha favorecido su utilización como marcadores en el grado de maduración celular (Sierra et al., 2001; Cerna et al., 2002) y en diversas enfermedades adquiridas o congénitas (Dennis et al., 1999; Aebi et al., 2001; Guevara et al., 1998; Rudd et al., 2002; Jiménez-Martínez et al., 2002; Martin-Rendon et al., 2003).

Se ha demostrado que el etanol afecta diversas glicoproteínas (Gottesfeld et al., 1990; Vallés et al., 1994; Singh et al., 1996; Miñana et al., 2000; Climent et al., 2002; Moore et al., 2004), algunas de ellas relacionadas con la maduración de estructuras de origen neural (incluyendo el germen dentario) (Noronha & Druse, 1982; Gnaedinger & Druse, 1984; Hernández-Guerrero et al., 1996; Jiménez-Farfán et al., 2005a; Jiménez-Farfán et al., 2005b).

ANTECEDENTES

Organogénesis dental y factores de crecimiento

La cresta neural es una población de células neuroepiteliales única para vertebrados y cordados superiores que comienza a reconocerse durante la neurulación (Bronner-Fraser 1993; Stemple & Anderson, 1993). Las células de la cresta neural son esenciales para la morfogénesis facial y dental (Sulik et al., 1981). Justo antes de que los pliegues neurales se fusionen para formar el tubo neural (Ten Cate, 1998), las células del neuroectodermo migran hacia la región facial donde formarán el esqueleto y tejido conectivo de la cara (hueso, cartílago, vasos sanguíneos, glándulas, músculo liso, tejido adiposo y todos los tejidos dentales, excepto el esmalte) (Rottenberg, 1992; Verwoerd & Van Oostrom, 1978; Johnston & Sulik, 1984; Cohen, 2002).

Aproximadamente en el día 24 del desarrollo humano se forman los procesos maxilares y mandibulares a partir del primer arco branquial (mandibular) (Cohen, 2002). A los 28 días se desarrollan engrosamientos localizados dentro del ectodermo de la prominencia frontal, llamadas plácodas nasales de las cuales se derivan los procesos nasales laterales y el proceso nasal medio. Sobre el borde inferior del proceso maxilar, el borde superior del arco mandibular y la porción lateral del proceso nasal medio, el epitelio comienza a proliferar y a formar un engrosamiento epitelial (epitelio odontogénico) (día 12 y 13 en el ratón) (Hay 1961; Ten Cate, 1998).

El desarrollo de un diente se caracteriza por una serie de interacciones epitelio-mesenquimales que conducen a la iniciación del germen dentario, seguido de la morfogénesis y la citodiferenciación (Lumsden, 1988). Aunque los mecanismos moleculares exactos involucrados en las interacciones tisulares que regulan el desarrollo

dental no se conocen con exactitud, se sabe que las moléculas de la matriz extracelular y los factores de crecimiento representan un papel central (Vaahtokari et al., 1991).

Hacia el día 37 de gestación en el humano (día 13 y 14 en el ratón) (Hay, 1961) se genera una invaginación del epitelio hacia el mesénquima, formándose así la lámina dentaria. El inicio del estadio de brote corresponde al primer crecimiento epitelial que se hace dentro del ectomesénquima de los maxilares durante el cual no hay cambios morfológicos ni funcionales en las células involucradas (Ten Cate, 1998).

Poco después inicia la proliferación celular en el ectomesénquima, marcando el inicio del estadio de capuchón o casquete (día 15, 16 y 17 en el ratón) (Hay, 1961) A partir de este momento el germen dentario comienza a definirse y pueden identificarse estructuras como el órgano dental, la papila dental y el folículo dental (Ten Cate, 1998).

El órgano epitelial dentario u órgano dental es avascular y de origen ectodérmico que en estadios más avanzados formará el esmalte. Asimismo, induce la morfología de la corona, inicia la formación de dentina y establece la unión dentogingival. La papila dental formará la pulpa dental y la dentina, mientras el folículo dentario formará los tejidos de sostén (cemento y ligamento periodontal). La forma del futuro diente se define a partir del plegamiento del epitelio dental interno y la lámina dental que une el germen dental al epitelio bucal (Ten Cate, 1998).

El estadio de campana (día 18 del ratón) (Hay, 1961) comprende la histodiferenciación y morfodiferenciación del germen dentario (Ten Cate, 1998).

La inervación inicia en el estadio de brote y casquete, primero en el folículo dental donde se ramifica y forma un plexo alrededor del germen dentario. Las fibras penetran la papila hasta la dentinogénesis. La irrigación se ubica alrededor del germen dental y folículo

dental y, posteriormente penetra la pulpa. La vascularización aumenta durante la histodiferenciación (Ten Cate, 1998).

La formación de los tejidos duros corresponde al estadio de corona del desarrollo dentario (día 19 y 20 del ratón) (Hay, 1961; Ten Cate, 1998). Durante los estadios posnatales en el ratón (alrededor del día 35) todos los órganos dentarios ya han completado su formación y erupción (Cohn, 1957). A diferencia del ratón, el humano posee una dentición primaria que es iniciada entre la sexta y octava semana de desarrollo embrionario, mientras la dentición permanente comienza a formarse entre la vigésima semana gestacional y décimo mes después del nacimiento (Ten Cate, 1998).

Durante el desarrollo embrionario craneofacial y dental, diversos factores de crecimiento regulan de forma autócrina, parácrina y endócrina los procesos de crecimiento, diferenciación, síntesis de matriz extracelular y sobrevivencia celular (Kaplowitz et al., 1984; Erickson & Turley, 1987; Popliker et al., 1987; Mercola & Stiles 1988; Heath, 1993; Luger & Shwarz 1994). En el caso específico del Epidermal Growth Factor (EGF), identificado por primera vez en glándulas submandibulares de ratón adulto, se estableció su importancia en la maduración acelerada de diversos epitelios, en la apertura prematura del párpado y en la erupción temprana del incisivo en ratones neonatos (Cohen, 1960; Levi-Montalcini & Cohen, 1960). La familia EGF-R son glicoproteínas integrales de membrana con actividad tirosina cinasa, formada por cuatro miembros (EGF-R, erbB-2, erbB-3 y erbB-4). Cada uno de estos receptores posee sus ligandos específicos (algunas veces los comparten), excepto erbB-2 que carece del sitio extracelular de unión al ligando, pero cuya presencia en los heterodímeros es determinante para el tipo de señalización intracelular (Van der Geer et al., 1994; Hynes & Lane, 2005).

El EGF-R está formado por 1186 aminoácidos (170 kDa), codificado en el cromosoma 7, con un dominio extracelular (dominios ricos en cisteína y 12 sitios potenciales de N-glicosilación), uno transmembranal y uno citoplasmático. Se considera que estos oligosacáridos son una mezcla de estructuras biantenarias y multiantenarias caracterizadas por una baja cantidad de ácido siálico, manosa, cantidades importantes de fucosa y residuos terminales GalNAc (Carpenter, 1987; Favoni & De Cupis, 2000). La unión del EGF a su ligando (EGF, TGF α , anfiregulina, betacelulina, HB-EGF) provoca la dimerización de receptores, lo que activa los sitios de autofosforilación sobre los residuos de tirosina en la porción intracelular del receptor. Esta interacción inicia la señalización y tras ésta, el complejo receptor-ligando se internaliza en la célula para ser degradado por los lisosomas o ser reciclado hacia la membrana celular (Hynes & Lane, 2005).

El erbB-2 es una glicoproteína transmembranal de 1255 aminoácidos (185 kDa), identificada por primera vez en un tumor de neuroectodermo de rata (codificado en el cromosoma 17) (Shih et al., 1981; Coussens et al., 1985; Rubin & Yarden, 2001). Es importante en el crecimiento y diferenciación celular, además durante el desarrollo embrionario se expresa en células epiteliales de riñón, pulmón, tracto gastrointestinal, placenta y en menor grado en tejidos normales adultos (Stöcklin et al., 1993; Rubin & Yarden, 2001). Alteraciones durante el desarrollo embrionario pueden generar defectos cardíacos y anomalías neurales (Alroy & Yarden, 1997). Tiene 8 sitios potenciales de N-glicosilación, 5 de los cuales están conservados con EGF-R (Coussens et al., 1985)

Las actividades de la familia EGF durante el desarrollo dentario dependen del estadio y tiempo de formación dental, por lo que durante su maduración los efectos variarán entre las diferentes estructuras de origen epitelial o mesenquimatoso (Thesleff et al., 1983; Partanen et al., 1985; Partanen & Thesleff, 1987; Snead et al., 1989; Edwards & Dow-

Edwards, 1991). El EGF está presente en extractos de tejido embrionario de ratón desde los días 10 y 11, y la cantidad máxima se ha medido entre el día 15 y 17 de gestación. Los EGF-R se han detectado en su máximo alrededor de los días 13 y 14 embrionarios, que es el estadio en el que hay una mayor respuesta del germen dentario al EGF (Partanen et al., 1985).

La familia EGF participa en la proliferación y diferenciación de las células odontogénicas (Steidler & Reade, 1981; Cam et al., 1990; Kronmiller 1991; Beeman, 1994), así como en la secreción de matrices extracelulares (Hu et al., 1992; Steidler & Reade, 1981) En estadios más avanzados participa en la regulación de la morfogénesis, diferenciación y maduración ameloblástica (Martineau-Doizé et al., 1991; Zeichner-David et al., 1995). Asimismo, afecta la síntesis de proteínas de esmalte y hueso, la resorción ósea (Rihtniemi & Thesleff, 1987; Hu et al., 1992) y la erupción dental (Wood & Turner, 1981; Lin & Wise, 1993). Los fibroblastos del ligamento periodontal y preosteoblastos también responden firmemente al EGF (Cho et al., 1988). El erbB-2 sólo ha sido reportado en ameloblastos secretores y se desconoce su función (Casasco et al., 1994).

La glicosilación durante el desarrollo dental

Las moléculas más abundantes en la superficie celular son los glicoconjugados, los cuales son proteínas o lípidos modificados con cadenas de azúcares (oligosacáridos) (Yarema & Bertozzi, 2001). Grandes variedades de glicoconjugados son sintetizados y expresados específicamente en los diferentes tejidos embrionarios (Haltiwang, 2002). La diversidad estructural de los glicanos en las células es muy amplia debido a las posibles combinaciones de monosacáridos, uniones, ramificaciones y longitudes de las cadenas sacarídicas. La glicosilación terminal en el aparato de Golgi es la que determina la gran

diversidad de los glicoconjugados que alcanzan la superficie celular. Cuando la glicosilación es inhibida, el efecto observado más común es la generación de proteínas mal plegadas y la agregación de proteínas que fallan para alcanzar un estado funcional. La importancia de la adición de glicanos varía entre proteínas y depende del contexto fisiológico (Helenius & Aebi, 2001).

Los glicoconjugados se clasifican de acuerdo a su tipo de unión. Cuando las porciones amino de los residuos de Asp en secuencias específicas (Asn-X-Ser/Thr) se unen a los radicales OH⁻ de la GlcNAc, forman un enlace de tipo N-glicosídico. La O-glicosilación se realiza con la unión de los radicales OH⁻ de aminoácidos como Ser o Thr con la GalNAc. La hidroxilisina e hidroxiprolina también son receptores de GalNAc (Parekh, 1994; Dennis et al., 1999).

Diversas proteínas son modificadas por O-glicosilación como los componentes del citoesqueleto, receptores hormonales, moléculas de señalización y cinasas, proteínas del complejo de poro nuclear, oncogenes, factores de transcripción, supresores tumorales y proteínas virales (Vosseller et al., 2001). Defectos en la O-glicosilación se asocian con diversas enfermedades humanas de tipo degenerativo o proliferativo (Hanover, 2001).

Las macromoléculas de la superficie celular contienen carbohidratos que favorecen la inducción de la diferenciación celular y el reconocimiento célula-célula durante el desarrollo embrionario (Schauer, 1982; Wilson & Wyatt, 1995; Gheri-Bryk et al., 1997; Poirier & Kimber, 1997; Gheri et al., 2000; Quondamatteo et al., 2000; Grünwald et al., 2002). En las estructuras dentarias embrionarias y maduras se han comenzado a analizar los patrones de glicosilación tanto en condiciones normales como anormales. Estas modificaciones se han observado en estadios tempranos del desarrollo dental durante los procesos inductivos, así como en las etapas de morfodiferenciación y secreción de

matrices de dentina y esmalte (Akita et al., 1992; Sasano et al., 1992; Lemus et al., 1997; Yoshida K, et al., 1998; Heyman et al., 2002).

El diente es un buen ejemplo de un órgano que llega a la morfo-diferenciación como resultado de las interacciones epitelio-mesenquimales, en las que células como los odontoblastos y ameloblastos se diferencian como una respuesta a dichas interacciones. Residuos de GalNAc, ácido siálico, GlcNAc, manosa, glucosa y fucosa están presentes en la superficie de preameloblastos y preodontoblastos. La presencia de estas moléculas en los glicoconjugados se sugiere que podría estar relacionada con la diferenciación temprana y funcionalidad de estas células secretoras para producir esmalte y dentina (Lemus et al., 1996). Las lectinas que unen residuos de azúcares específicos han sido usados para evidenciar estructuras glicosídicas asociadas con las superficies celulares, así como con sus organelos citoplasmáticos (Hernández-Díaz et al., 1999).

Factores de crecimiento y FAS

Durante el desarrollo embrionario los órganos y sistemas presentan diversos periodos de vulnerabilidad de acuerdo a la naturaleza del daño teratogénico, lo que estará determinado a su vez por el estadio de sensibilidad, la relación dosis-respuesta y la variabilidad genética de la madre y el feto (Kronick 1976; Beckman & Brent, 1984; Russo, 1992). La cantidad de alcohol necesaria para producir daño significativo en el feto no ha sido bien establecida. Sin embargo, se considera que el consumo semanal u ocasional de siete o más vasos de alcohol (3 onzas) durante el embarazo puede generar alteraciones en la morfogénesis fetal, mortalidad prenatal y cambios en el crecimiento y diferenciación (Oullete et al., 1977; Epstein & Sucheston, 1987; Burd, 2004).

Entre las diversas alteraciones craneofaciales en el FAS se encuentran frente protruyente, hipoplasia maxilar, micrognatia, retrognatia, fisuras palpebrales cortas, pliegue epicántico, puente nasal plano, nariz corta, filtrum largo y plano, borde bermellón y labio superior estrechos (Oullete et al., 1977; Leichter, 1979; Word, 1981; Beckman, 1984; Braton, 1987; Webb et al., 1988; Estes, 1989; Gir, 1989; Streisguth et al., 1991), microftalmia (Oullete et al., 1977; Word, 1981; Webb, 1988; Gir, 1989), estrabismo, ptosis, miopía, coloboma (Word, 1981; Webb, 1988; Gir, 1989), blefarofimosis, asimetría ocular, hipertelorismo, hipotelorismo (Sulik et al., 1981), rotación anómala de la oreja (Word, 1981; Estes, 1989), labio fisurado, paladar hendido (Cohen, 2002), maloclusiones dentales, rugas palatinas prominentes, dientes pequeños con fallas en el esmalte y arco palatino elevado. (Leichter & Lee, 1979; Word, 1981; Gir, 1989; Stoler & Holmes, 2004).

Diversos factores de crecimiento, tales como NGF, IGF y EGF han sido implicados en las patologías generadas por el consumo de alcohol materno (Henderson et al., 1989b; Henderson et al., 1999; Gottesfeld et al., 1990; Vallés et al., 1994; Kim & Druse, 1996; Singh et al., 1996; Climent et al., 2002; Moore et al., 2004). En hepatocitos fetales el etanol es capaz de incrementar la expresión de receptores EGF de baja y alta afinidad, efecto posiblemente asociado a alteraciones en la internalización de los receptores membranales ocupados (Henderson et al., 1989b). Esta respuesta de inhibición de la replicación también puede ser generada por otros factores como $TGF\beta_1$ (Baskin et al., 1991). Algunas evidencias muestran que el etanol altera la fluidéz y composición de la membrana celular. Esto a su vez ha permitido sugerir su relación con alteraciones en la conformación alterada de las proteínas membranales, incluyendo a los receptores de factores de crecimiento, enzimas y receptores neurohormonales (Henderson et al., 1989b; Villacara et al., 1989).

Ha sido bien documentado que el embrión y el feto son esencialmente sensibles al estrés oxidativo, lo que puede provocar diversas respuestas desde malformaciones hasta la muerte intrauterina (Jenkinson et al., 1986; Hiranruengchok & Harris 1993; Martensson et al., 1991). Los cambios resultantes del estrés oxidativo por el etanol podrían afectar el crecimiento. Esto último ha sido observado tanto con la exposición a etanol como a acetaldehído, lo que incluye alteraciones en el citoesqueleto (VanWinkle et al., 1994; Smith et al., 1992), disfunción mitocondrial (Kristal et al., 1994; Zhang et al., 1990; Decker & Al 1988; Cunningham et al., 1990), y alteraciones de proteínas de la membrana celular y subsecuentemente, en la traducción de señales (Hoek et al., 1992; Henderson et al., 1989b).

Debido al importante papel de la familia EGF durante el desarrollo, es posible considerar su relación con el retraso reportado en el crecimiento maxilofacial característico en los niños con FAS, específicamente respecto a los reportes clínicos dentales previamente mencionados (Clarren & Smith, 1978). El presente estudio sugiere que la familia EGF podría tener un papel importante en la mediación de la toxicidad del etanol en el desarrollo embrionario del diente de ratón, y estos cambios podrían estar asociados a los defectos en la mineralización previamente reportados (Hernández, 1990). Asimismo, se sugiere que alteraciones en la expresión de carbohidratos (específicamente estructuras sialiladas) en los tejidos dentales embrionarios, podrían afectar las interacciones epitelio-mesenquimales esenciales para la correcta histo-morfodiferenciación de las células dentarias hacia estructuras maduras.

HIPÓTESIS

El consumo de etanol durante la gestación genera alteraciones morfológicas del germen dentario de primer molar inferior en crías de ratón de 16.5 y 18.5 días prenatales y los cambios están relacionados con la expresión del factor de crecimiento epidérmico tipo I (EGF-R) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico tipo II (erbB-2), así como con las alteraciones en el patrón de moléculas sialiladas.

OBJETIVOS

Objetivo General

Estudiar la relación entre las alteraciones en la expresión de los receptores EGF-R y erbB-2, y las moléculas sialiladas, con la proliferación y diferenciación de las estructuras dentales embrionarias murinas expuestas a etanol durante la gestación.

Objetivos específicos

Evaluar los cambios en el patrón de expresión de receptores EGF (EGF-R y erbB-2) durante la morfogénesis de gérmenes dentarios murinos expuestos a etanol *in utero*.

Evaluar los cambios en el patrón de expresión de estructuras sialiladas durante la morfogénesis de gérmenes dentarios murinos expuestos a etanol *in utero*.

METODOLOGÍA

RATONES

Los ratones núbiles utilizados en el estudio provenían de la cepa Balb/c obtenidos del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Durante la fase experimental, los ratones se mantuvieron en el Bioterio de la División de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Odontología, UNAM. Los ratones tuvieron condiciones controladas de luz/oscuridad (12 horas/12 horas) y temperatura (20-22°C). La alimentación durante todo el experimento fue a base de una dieta comercial dura (Purina Chow) y agua *ad libitum* (grupos control) y alcohol *ad libitum* en los grupos experimentales) (alcohol etílico absoluto anhidro, Mallinckrodt Baker, México). A las ocho semanas de edad, se seleccionaron sólo a los ratones con un peso entre 21 a 23 g. Las hembras fueron asignadas aleatoriamente a los grupos de tratamiento experimental o control establecidos como sigue: 5%, 10%, 15%, 20% y 25% de etanol (n= 50, 5 hembras para cada grupo de tratamiento y edad gestacional) y grupos control (n=20, 10 hembras para cada grupo de edad).

ADMINISTRACIÓN DE ETANOL

Los grupos experimentales bebieron en forma inicial 1% de etanol, concentración que aumentó cada tercer día hasta alcanzar la concentración asignada para cada grupo de tratamiento. Todos los grupos consumieron los líquidos en botes de plástico de 150 ml con puntas especiales metálicas para evitar la pérdida de líquidos y la evaporación. Durante todo el experimento se llevó a cabo el registro diario del peso de las hembras y consumo de líquidos. Cuando se alcanzó la concentración de etanol designada, los

ratones se mantuvieron en ella durante 13 semanas. Después de este tiempo, dos hembras fueron colocadas con un macho por caja, registrando la hora y manteniéndolos juntos hasta el siguiente día, separándolos a la misma hora en que fueron reunidos. Se verificó la presencia del tapón vaginal como indicio de apareamiento. A partir de ese momento se registró el día de gestación como 0.5 (Kaufman, 1995). Todos los días posteriores se tomó diariamente el registro de peso de las hembras, hasta el día de su sacrificio. Las hembras preñadas fueron sacrificadas los días 16.5 y 18.5 de gestación de acuerdo al grupo de tratamiento asignado.

PROCEDIMIENTO HISTOLÓGICO

El sacrificio de animales y obtención de fetos se realizó en condiciones asépticas bajo una campana de flujo laminar (Lolten, Lamin Air). Las hembras de 16.5 y 18.5 días de gestación se sacrificaron por dislocación cervical, mientras las crías fueron sacrificadas por decapitación (Theiler, 1989). A todas las hembras experimentales y controles, se les registró el número de crías vivas y muertas, así como el peso y talla de cada cría. Las crías fueron decapitadas y las cabezas obtenidas se fijaron inmediatamente en paraformaldehído al 4% 0.1M PBS, pH 7.4 durante 24 h.

Las muestras fijadas se procesaron para obtener bloques en parafina (Leica, Jung Histokinette 2000). Se obtuvieron cortes seriados de 4 μ m colocados en portaobjetos con silano (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). A todos los especímenes se les realizó la técnica de tinción con hematoxilina y eosina. Se seleccionaron aleatoriamente 10 especímenes pertenecientes a cada grupo de alcoholización/edad para las técnicas de inmunohistoquímica (detección de EGF-R y erbB-2), y doble tinción (para la colocalización

de los receptores EGF-R o erbB-2 y, lectinas). El panel de lectinas utilizado se menciona a continuación.

| LECTINA | ESPECIFICIDAD |
|--|--------------------------------------|
| SNA (<i>Sambucus nigra</i>) ^a P.M 150 kDa | Neu5Ac α 2,6Gal/GalNAc |
| MAA (<i>Maackia amurensis</i>) ^a P.M 140 kDa | Neu5Ac α 2,3Gal |
| MRL (<i>Machrobrachium rosenbergii</i>) ^o P.M 19 kDa | Neu5,9Ac |
| ALL (<i>Amaranthus leucocarpus</i>) ^o P.M 70 KDa | Neu5Ac/Gal β 1,3GalNAc-Ser/Thr |

^a E-Y Laboratories, Inc., San Mateo, CA, USA.

^o Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM.

EVALUACIÓN HISTOLÓGICA E INMUNOHISTOQUÍMICA DE LOS RESULTADOS

Se consideraron los cambios morfológicos del gérmen dentario, talla dental, así como las características celulares. Se realizó un análisis semicuantitativo del patrón de unión anti-EGF-R y anti-erbB-2, así como el de lectinas (Jiménez et al., 2005a; Jiménez et al., 2005b).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos de peso de las madres, nivel de alcohol en sangre materna (Blood Alcohol Level –BAL-), peso y talla de los fetos y talla dental se evaluaron por un análisis de *t* de Student y análisis de varianza a través del paquete estadístico SPSS versión 10.0.

RESULTADOS

Efectos del consumo de etanol sobre las madres

El peso de las madres al inicio del experimento fue de 21.81 ± 0.169 . Durante el período pre-gestacional (antes del apareamiento) no se observaron cambios en el peso de las madres entre los diferentes grupos de tratamiento (ver ANEXO, Fig. 1 y Tabla 1).

El peso de las madres no representó diferencias significativas durante la primera semana de gestación. A partir del día 11.5 prenatal se observaron diferencias en el peso de las madres en los grupos de 10%, 15%, 20% y 25% de etanol ($p \leq 0.05$). A partir del día 15.5 todos los grupos experimentales mostraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) respecto al grupo control (ver ANEXO, Fig. 2). El peso de las madres al momento de obtención de las crías (16.5 y 18.5 días prenatal) varió significativamente ($p \leq 0.01$, excepto para el grupo de 16.5 días prenatal al 5% de alcoholización, $p \leq 0.05$) entre los diferentes grupos de tratamiento y día de gestación (ver ANEXO, Tabla 2).

Niveles de alcohol en sangre materna (Blood Alcohol Level –BAL–)

El control de consumo de líquidos se realizó en los grupos control y experimentales. En la Tabla 3 (ver ANEXO) se muestran los valores promedio \pm SD. De acuerdo a los resultados hubo una reducción significativa ($p \leq 0.001$) en el consumo de líquidos, comparado con el grupo control. Sin embargo, el volumen y masa de alcohol consumidos incrementaron proporcionalmente en los diferentes grupos conforme incrementaba la concentración de etanol en el líquido ingerido.

Los niveles de etanol en sangre fueron obtenidos al momento del sacrificio de las madres. Los resultados se muestran en la Tabla 4 (ver ANEXO). Conforme la concentración de

etanol incrementó en los grupos experimentales, hubo una cantidad mayor de éste detectada en sangre ($p \leq 0.01$ en los grupos de 10% y 15% y, $p \leq 0.001$ en los grupos de 20% y 25%, respecto al grupo de etanol al 5%).

Efectos del consumo de etanol sobre las crías

El número total de crías obtenidas en ambas edades fue de 406 (de 50 hembras gestantes), observándose una reducción significativa en el número de crías del grupo control respecto a los grupos experimentales 10%, 15% ($p < 0.01$), 20% y 25% de etanol ($p < 0.001$) (ver ANEXO, Tabla 5). Se observaron reabsorciones fetales en ambas edades, presentándose 30 reabsorciones (14.28%) en el grupo de 16.5 días prenatal y, 21 (10.71%) en el día 18.5 prenatal. En ambas edades las reabsorciones fetales se observaron a partir del 15%, 20% y 25% de etanol. El grupo de 25% de etanol mostró mayor frecuencia de reabsorciones fetales.

La talla corporal de las crías de 16.5 días prenatal en los grupos tratados, mostró diferencias significativas ($p < 0.01$) cuando se comparó con el grupo control (ver ANEXO, Fig. 3). Las crías de 18.5 días prenatal mostraron diferencias significativas entre los grupos de 20% y 25% de etanol comparados con el grupo control ($p < 0.05$) (ver ANEXO, Fig. 4).

El peso corporal de las crías de 16.5 y 18.5 días prenatal mostró diferencias significativas en todos los grupos de tratamiento comparados con el grupo control ($p < 0.01$ y $p < 0.001$, respectivamente) (ver ANEXO, Fig. 5 y 6).

Efectos del consumo de etanol sobre los gérmenes dentarios

El análisis morfológico de los gérmenes dentarios reveló una reducción significativa ($p < 0.01$) de la talla dental en los grupos de 15%, 20% y 25%, tanto a los 16.5 como a los 18.5 de desarrollo prenatal (ver ANEXO, Fig. 7 y 8). Asimismo, se observó retraso en la diferenciación y cambios degenerativos en los tejidos epiteliales dentales, membrana basal y células preodontoblásticas y subodontoblásticas en ambas edades (ver ANEXO, Fig. 1 y 2 en Jiménez-Farfán et al., 2005a).

Se observó incremento en la inmunoreactividad de EGF-R y erbB-2 en los grupos de 15%, 20% y 25% de etanol comparado con las dosis más bajas y el grupo control en ambas edades prenatales (ver ANEXO, Fig. 1 y 2 y, Tabla 2 en Jiménez-Farfán et al., 2005a y, Fig. 2 en Jiménez-Farfán et al., 2005b). El patrón de expresión de lectinas que reconocen estructuras sialiladas mostró cambios a partir del grupo de 15% hasta el 25% de etanol (ver ANEXO, Fig. 1 y Tabla 1 en Jiménez-Farfán et al., 2005b).

DISCUSIÓN

Los efectos del etanol durante el desarrollo embrionario se han evaluado en diversos modelos animales indicando que durante cualquier etapa del embarazo, los embriones son susceptibles de sufrir daño (Streissguth et al., 1980, Sulik et al., 1981, Edwards & Dow-Edwards 1991, Weston et al., 1994, Astley et al., 1999, Tran et al., 2000). Algunas características clínicas en el Síndrome del Feto Alcoholizado (Fetal Alcohol Syndrome – FAS-) son retraso en el crecimiento, alteraciones del sistema nervioso central, alteraciones cardíacas, anomalías articulares, anomalías hepáticas, fallas en el sistema inmunológico, alteraciones del sistema musculoesquelético y, dismorfologías craneales y faciales (talla craneal reducida, micrognatia, paladar hendido, defectos oculares) (Jones & Smith 1973; Ouellette et al., 1977; Hanson et al. 1978; Kotch & Sulik 1982a; Kotch & Sulik 1982b; Sulik & Johnston 1983; Jacobson et al. 1994; Mattson et al. 1996; Habbick et al. 1998; Roebuck et al., 1998; Chan 1999; Su et al., 2001).

Una de las características clínicas comúnmente observadas en los hijos de mujeres alcohólicas es el peso y la talla bajos al nacer (Jones et al., 1973; Hanson et al., 1978; Day et al., 1991; Habbick et al., 1998). Experimentalmente, esta característica ha sido comprobada también en estadios prenatales (Jun-Tze & Lee, 1975; Becker et al., 1987; Desroches et al., 1987; Pullen et al., 1988; Hernández, 1990). El bajo peso al nacer se relaciona con una masa muscular y orgánica reducidas (por ejemplo, hígado o cerebro) (Chaudhuri 2000). La reducción en la talla revela el efecto del etanol sobre el crecimiento y desarrollo óseo prenatal (incluyendo el macizo maxilofacial) (Giglio et al., 1987; Hernández, 1990; Edwards & Dow-Edwards, 1991; Hernández-Guerrero et al., 1998; Astley et al., 1999). En el presente estudio, la reducción en el peso y la talla fue

significativa en los estadios prenatales 16.5 y 18.5 días de desarrollo del ratón en los diferentes grupos de tratamiento. Diversos estudios han evidenciado la recuperación en el peso y talla (denominado fenómeno "catch up") de los niños con FAS después del nacimiento (Habbick, 1998). Así, los hijos de mujeres alcohólicas cuyo peso y talla fueron bajos al nacer, con el tiempo van disimulando y reduciendo estas diferencias, no obstante que éstos nunca llegan a ser completamente normales. En el caso de las estructuras óseas afectadas con una reducción en el crecimiento, es posible esperar que tras la eliminación del agente tóxico (etanol) proveniente de la madre, las células óseas y cartilaginosas con altas capacidades para proliferar y diferenciarse durante la infancia temprana puedan llevar al individuo a una normalidad en su talla y peso corporales y craneofaciales. Sin embargo, en el caso de los gérmenes dentarios esta respuesta no podría esperarse debido a que las etapas de proliferación, diferenciación, secreción y conformación de las estructuras duras se llevan a cabo antes del nacimiento (en el caso de la dentición primaria) y, se ha iniciado la formación de las estructuras de la dentición secundaria en este mismo periodo (Ten Cate, 1998).

El desarrollo dental es un proceso complejo que involucra diversas interacciones entre el epitelio oral y las células mesenquimatosas derivadas de la cresta neural. Estas interacciones epitelio-mesenquimales han sido investigadas en relación a los mecanismos regulados por factores transcripcionales, factores de crecimiento, moléculas de la matriz extracelular y moléculas de adhesión (Ruch et al., 1995; Zeichner-David et al., 1995; Thesleff & Nieminen, 1996; Thesleff & Sharpe, 1997; Peters & Balling, 1999). Las interacciones de las moléculas de la matriz extracelular y sus receptores de la superficie celular son importantes para mediar la morfogénesis dental y la citodiferenciación. La membrana (o lámina) basal es requerida para la diferenciación de los odontoblastos y, la

desintegración de ésta, favorece la diferenciación terminal de los ameloblastos (Thesleff & Hurmerinta, 1981; Ruch, 1995). Nuestros resultados mostraron alteraciones en los derivados epiteliales y la membrana basal, mismos que se encuentran en íntimo contacto con el ectomesénquima de la papila dental. Los cambios morfológicos fueron más evidentes en los grupos de mayor concentración de etanol (15%, 20% y 25%). Teniendo en cuenta lo anterior, podría considerarse que la alteración o desaparición temprana de la membrana basal durante los procesos iniciales de la odontogénesis puede provocar cambios importantes en las interacciones del epitelio dental interno-ectomesénquima y, en etapas posteriores en las interacciones preameloblasto-preodontoblasto.

Los receptores del factor de crecimiento epidérmico tipo I (EGF-R, también llamado HER-1) y tipo II (erbB-2, también conocido como HER-2/Neu) tienen una distribución amplia en los tejidos en desarrollo normales, especialmente los tejidos epiteliales y células de la cresta neural (Erickson & Turley, 1987; Kokai et al., 1987; Mendley & Toback, 1988; Mercola & Stiles, 1988; De Potter et al., 1989; Quirke et al., 1989; Carpinter & Cohen, 1990; Gassmann et al., 1995; Lee et al., 1995; Meyer & Birchmeier, 1995; Morris et al., 1997; Lin et al., 2000). Estas glicoproteínas regulan el desarrollo craneofacial en los mamíferos (Partanen et al., 1985, Partanen & Thesleff 1987; Cho et al., 1988, Snead et al., 1989; Kronmiller et al., 1991; Hu et al., 1992) y diversos procesos dentales relacionados con el crecimiento y la diferenciación celular (Thesleff et al., 1983; Partanen et al., 1985; Topham et al., 1987; Hu et al., 1992), erupción dental (Rithniemi & Thesleff 1987; Thesleff, 1987; Thesleff et al., 1987; Martineau-Doizé et al., 1991; Lin & Wise, 1993), y secreción de matrices extracelulares como cartilago (Steidler & Reade, 1981), hueso (Cho et al., 1988), esmalte y dentina (Martineu-Doizé et al., 1991; Casasco et al., 1994; Tanikawa & Bawden, 1999).

Los resultados clínicos dentales han evidenciado una talla reducida de los dientes con alteraciones en el esmalte (Clarren & Smith, 1978). No obstante que estas "alteraciones" no han sido claramente definidas (por ejemplo, como modificaciones en número de dientes, talla, morfología o estructura dental), los estudios experimentales revelan que los ratones expuestos a etanol *in utero* presentan retraso en el crecimiento mandibular, alteraciones en la mineralización dental, dientes pequeños y retardo en la erupción dental (Hernández, 1990), lo que ha sugerido el posible papel de la familia EGF (EGF) en estos defectos, dado que la expresión de su ligando (EGF) se redujo en gérmenes dentarios expuestos a etanol (Hernández-Guerrero et al., 1996).

Se ha demostrado que el EGF participa activamente durante la erupción dental (Cohen 1962; Wise, 2002) y puede afectar la proliferación de las células odontogénicas (Steidler & Reade, 1981). Asimismo, puede afectar la formación de las cúspides de molar de ratón (Hu et al., 1992) y generar inhibición de la proliferación en las células del ectomesénquima dental (Thesleff et al., 1983; Partanen et al., 1985). La inhibición o expresión baja de EGF en estadios tempranos del desarrollo dental puede provocar anodoncia, mientras que en estadios posteriores provoca hipodoncia con retraso en la morfogénesis y diferenciación ameloblástica (Zeichner-David et al., 1995). La respuesta de los tejidos dentales murinos y humanos al EGF se relaciona con la etapa de desarrollo, tipo celular y, cantidad y distribución de los receptores EGF en el órgano dentario (Partanen & Thesleff, 1987). Debido a la intensa inmunoreactividad a EGF-R y erbB-2 en las células subodontoblásticas y ameloblastos en proliferación y diferenciación se ha sugerido la posible participación de estos receptores en la formación del esmalte y la dentina (Martineu-Doizé et al., 1991; Casasco et al., 1994).

Durante los días 16.5 y 18.5 prenatal del desarrollo dental del ratón, se presentan eventos celulares de proliferación y diferenciación (Ten Cate, 1998). En el presente estudio, los grupos de alcoholización al 15%, 20% y 25% de 16.5 y 18.5 días de desarrollo prenatal incrementaron la expresión de receptores EGF cuando se compararon con las dosis más bajas y grupos control. A los 16.5 de desarrollo prenatal, el epitelio dental interno, epitelio dental externo y papila dental fueron las estructuras histológicamente más afectadas y con un incremento en la inmunoexpresión de receptores EGF en condiciones experimentales. La inmunoreactividad de EGF-R y erbB-2 fue diferente a los 18.5 días de desarrollo prenatal. El erbB-2 fue escasamente reconocido en los grupos experimentales al 2% y 5% sobre el epitelio dental interno y preodontoblastos, mientras que el EGF-R no mostró cambios comparado con el grupo control. Sin embargo en los grupos experimentales de 15%, 20% y 25% de etanol, ambos receptores mostraron una inmunoreactividad incrementada específicamente sobre estructuras de origen epitelial (epitelio dental interno, epitelio dental externo, preameloblastos, células del estrato intermedio). Aunadas a estas modificaciones también observamos que en ambos grupos de edad, a partir del 15%, 20% y 25% de alcoholización se presentaron severos cambios histológicos, tales como talla dental reducida, ausencia de morfología dental, sin diferenciación celular y retraso en el desarrollo dental. Estos resultados se relacionan con otros estudios utilizando EGF, donde éste pudo estimular el crecimiento celular de los molares, pero tuvo efectos inhibitorios a elevadas concentraciones, así como provocó la reducción del volumen dental, alterando irreversiblemente la formación de las cúspides en el ratón (Thesleff et al., 1983; Partanen et al., 1985; Hu et al., 1992). En el presente estudio es evidente que las más altas concentraciones de alcohol alteraron la morfología dental y la presencia de receptores EGF, generando cambios en la proliferación y

diferenciación celular del germen dental del ratón. La inmunoreactividad incrementada podría estar relacionada con alteraciones en el proceso de internalización/degradación de los receptores EGF-R ocupados, como ha sido señalado en hepatocitos fetales de rata expuestos a etanol (Henderson et al., 1989b). Es interesante considerar que diversos glicoconjugados, incluyendo los factores de crecimiento situados sobre las membranas celulares actúan como moléculas receptoras que median mecanismos de señalización. Los efectos sincrónicos o antagónicos entre los diversos factores de crecimiento permiten suponer que los cambios generados en una vía de señalización a través de un factor trófico pueden afectar otros factores de crecimiento y vías de señalización. Un ejemplo es el TGF β , que es capaz de estimular la transcripción del ARNm de EGF-R e incrementar el número de dichos receptores en la membrana citoplasmática de células dentales (Lin & Wise, 1993). Asimismo, el NGF puede inducir la transcripción de TGF β (Mitsiadis & Luukko, 1995). Particularmente, el TGF β y sus receptores se encuentran en forma abundante durante el desarrollo embrionario en las matrices extracelulares óseas, cartilaginosas y dentales, estimulando a su vez más síntesis de matriz (Vaahtokari et al., 1991). Por tanto, si existiera una falla en la bioquímica extracelular ocasionada por agentes tóxicos como el etanol, las estructuras dentarias (específicamente durante los estadios secretores) podrían verse afectadas (Matthiessen & Romert, 1988), traduciéndose en una estructura de esmalte y dentina alteradas.

Durante el desarrollo craneofacial y dental se producen cambios en la expresión de ciertos carbohidratos (Partanen and Thesleff, 1987; Tanikawa and Bawden, 1999; Wise et al., 2002; Yamamoto, 2003). Las estructuras dentales presentan ácido siálico, GlcNAc, GalNAc, manosa y glucosa en la membrana basal, odontoblastos y ameloblastos durante la diferenciación (Meyer et al., 1981; Jowett et al., 1994; Lemus et al., 1996; Lemus et al.,

1997), así como durante estadios posnatales (formación radicular y secreción de cemento) (Sasano et al., 1992). Alteraciones en los procesos de glicosilación durante estadios embrionarios pueden provocar modificaciones que afectan el entorno craneofacial (Wilson & Wyatt 1995; Gheri et al., 1997; Quondamatteo et al., 2000; Miosge et al., 1998; Grûnewald et al., 2002). Las alteraciones en los procesos de glicosilación afectan las interacciones epitelio-mesenquimales y las interacciones de receptores y ligandos en la superficie celular (Vallejo et al., 2000). En el caso de las células del epitelio dental interno (que se diferenciarán hacia ameloblastos) y sus células adyacentes del ectomesénquima de la papila dental (que formarán a los odontoblastos) necesitan interactuar activamente para lograr este proceso y, finalmente formar el esmalte y la dentina (Ten Cate, 1998).

Debido a que los principales cambios observados en este estudio estuvieron asociados a aquellas estructuras encargadas de producir en etapas posteriores esmalte y dentina, y al sugerido papel de los ácidos siálicos en las interacciones célula-célula, así como en su función potencial como receptores de diversas moléculas de reconocimiento celular en la superficie de diversas estructuras embrionarias durante la proliferación y la diferenciación (Fazel et al., 1989), utilizamos lectinas que reconocen moléculas sialiladas del tipo Neu5Ac α 2,3Gal/GalNAc, Neu5Ac α 2,6Gal/GalNAc, Neu5,7,9Ac y Neu5Ac/Gal β 1,3GalNAc. Observamos que las lectinas SNA, MAA, MRL y ALL reconocieron estructuras del epitelio dental interno, preameloblastos, preodontoblastos y membrana basal en los grupos control. Esta distribución varió entre el citoplasma y el núcleo, y estuvo relacionada al estadio de diferenciación celular. Asimismo, la papila dental (de origen ectomesenquimatoso) marcó escasamente con la lectina derivada de *Maackia aurens* -MAA- que reconoce Neu5Ac α 2,3Gal/GalNAc. Estos resultados sugieren que la

expression de Neu5Ac α -2,6Gal/GalNAc (reconocido por *Sambucus nigra* –SNA-) podría estar involucrada en la diferenciación celular de los gérmenes dentales más que Neu5Ac α 2,3Gal/GalNAc, como ha sido reportado en otros tipos celulares (Dall'Olio et al., 1996) y en diversos tejidos humanos y de rata (Kaneko et al., 1995). En el caso de los preameloblastos y preodontoblastos del grupo control se pudo notar que el reconocimiento de la lectina derivada de *Machrobrachium rosenbergii*, MRL (que presenta una sustitución en el ácido siálico de tipo 9-O-acetil) (Vázquez et al., 1993) fue significativamente reducido en el epitelio dental interno y papila dental de los grupos experimentales respecto al control. No obstante, la lectina derivada del *Amaranthus leucocarpus* –ALL-, la cual reconoce glicanos sialilados con uniones O-glicosídicas (Neu5Ac/Gal β 1,3GalNAc-Ser/Thr) (Zenteno et al., 1992) mostró una reducida marca en el epitelio dental interno y en algunas áreas de la papila dental (zona subodontoblástica cuspídea) en condiciones experimentales. Estos resultados sugieren que sólo algunos ácidos siálicos podrían ser importantes para el adecuado funcionamiento del mesénquima y epitelio dental interno, pero la eficiente expresión de estos azúcares es necesaria en aquellas células con el potencial para ser diferenciadas a odontoblastos y ameloblastos. Los resultados mostraron que los preodontoblastos y preameloblastos fueron afectados especialmente en aquellas áreas asociados a las cúspides (Jiménez et al., 2005a). Los sitios donde ocurre la primera diferenciación celular sobre el epitelio dental interno, representa el sitio de las futuras cúspides (Ten Cate, 1998). En este estudio, las células sin las características asociadas a los preodontoblastos y los preameloblastos (Ten Cate, 1998) estuvieron relacionadas con las áreas de pérdida de la membrana basal y retraso en el desarrollo cuspídeo. Estos cambios estuvieron también asociados a una expresión reducida de ácidos siálicos y GalNAc. Esta distribución sugiere que los ácidos siálicos

reconocidos por las lectinas SNA, MAA, MRL y ALL podrían estar mediando algunas interacciones epitelio-mesenquimales durante los diferentes estadios del desarrollo dental normal. Por otra parte, nuestros resultados mostraron que los ácidos siálicos tienen una función normal también dentro del núcleo de las células dentales, pero que en condiciones experimentales su presencia se alteró (Jiménez et al., 2005b). Se sabe que algunos factores de transcripción son estructuras sialiladas del tipo O-GlcNAc (Vosseller et al., 2001). Por tanto, los cambios observados podrían también estar asociados no solo a la expresión de factores tróficos como la familia EGF, sino a cambios a otros niveles en las vías de señalización, incluso a nivel nuclear.

La membrana basal es una matriz extracelular especializada compuesta de diversos glicoconjugados (Garbarsch et al., 1994; Engvall, 1995). La membrana basal participa en el alineamiento, polarización y diferenciación de las células de la papila dental hacia células odontoblásticas. Asimismo, la desaparición de esta membrana favorece la diferenciación terminal de los ameloblastos (Thesleff and Hurmerinta, 1981; Ruch, 1995). Los resultados de este estudio muestran que en condiciones experimentales existió un retraso en la diferenciación del epitelio dental interno y papila dental, el cual no correspondió con el estadio de desarrollo dental (Theiler, 1989; Ten Cate, 1998). En este sentido es importante considerar la importancia de las moléculas de la membrana basal y los receptores de la superficie celular durante el desarrollo dental, debido a que cualquier modificación en estas interacciones puede alterar considerablemente la morfogénesis y citodiferenciación del germen dentario (Ruch, 1987). De acuerdo a esto, parece que el etanol puede afectar a las células precursoras de los ameloblastos y odontoblastos, incluso en etapas tempranas cuando están adquiriendo las características de células secretoras (Ten Cate, 1998). En este sentido, las alteraciones observadas podrían

explicar la apariencia anómala del esmalte en los hijos de mujeres alcohólicas (Clarren and Smith, 1978), la secreción alterada de los ameloblastos de fetos de cobayos expuestos a etanol (Matthiessen and Romert, 1988) y los resultados preliminares de nuestro laboratorio, que muestran que a los 3 días de desarrollo posnatal, la expresión de ácidos siálicos se altera considerablemente en relación a la cantidad de matriz de dentina y esmalte depositadas en condiciones experimentales al 15% de etanol comparada con el grupo control.

Debido a los efectos cooperadores o sinérgicos de los factores de crecimiento con otras glicoproteínas presentes en las matrices extracelulares (para favorecer el crecimiento y la morfogénesis) y con las observaciones obtenidas del presente estudio, parece que más de una molécula podría ser afectada y como consecuencia alterar la forma en que éstas son presentadas y reconocidas sobre la membrana de las células dentales. Algunos estudios mencionan que el etanol afecta la integridad de la membrana celular (alterando la síntesis proteica y lipídica) y su transporte (McCall D et al., 1989; Renau-Piqueras et al., 1997). Asimismo, el etanol puede inducir la retención de proteínas nacientes (Larkin et al., 1996). Estos cambios podrían alterar la permanencia de las glicoproteínas localizadas dentro o cerca de la membrana plasmática. De acuerdo a nuestros resultados, conjuntamente con el incremento en la expresión de los receptores EGF-R en los gérmenes dentario expuestos a etanol, también se observaron alteraciones en la expresión de estructuras sialiladas. Estas modificaciones podrían afectar tanto la capacidad de reconocimiento y/o unión de los receptores con sus ligandos, la forma en que estos receptores son presentados sobre la membrana plasmática (Henderson et al., 1989b), así como el reconocimiento de otras moléculas a nivel intra o extracelular.

La glicosilación es un proceso complejo en el cual interactúan diversos organelos, vías de señalización y enzimas. Esta actividad coordinada permite el control y detección de moléculas deficientemente formadas (tanto en su estructura proteica como glicana), evitando así su secreción. Organelos como la mitocondria (Matthiessen and Romert, 1988; Xu et al., 2005), el citoesqueleto (Azorin et al., 2001), el retículo endoplásmico (Romert and Matthiessen, 1983) y el aparato de Golgi, así como las enzimas asociadas a la glicosilación son alteradas por exposición a etanol durante el desarrollo (Guasch et al., 1992; Estrada et al., 1996; Renau-Piqueras et al., 1987; Renau-Piqueras et al., 1997). Reportes previos han demostrado alteraciones en algunas glicoproteínas en fetos de ratón expuestos a etanol (Henderson et al., 1989b). Asimismo, el etanol puede incrementar (Gottesfeld et al., 1990; Vallés et al., 1994; Moore et al., 2004) o disminuir la expresión de glicoproteínas (Hernández-Guerrero et al., 1996; Kim and Druse 1996; Singh et al., 1996; Climent et al., 2002) o, inducir la acumulación intracelular de glicoconjugados (Vallés et al., 1994). De acuerdo a nuestros resultados mientras se observaron áreas de colocalización, parece que la diferencia en la distribución de las lectinas estuvo asociada con más de una glicoproteína en el germen dentario. En este estudio se mostró el patrón de sialilación del germen dentario en condiciones normales y cómo éste cambió cuando el etanol estuvo presente. Nuestros resultados coinciden con reportes previos (Sierra et al., 2001; Cerna et al., 2002), en donde los cambios en la expresión de ácidos siálicos durante la diferenciación celular fueron buenos marcadores para determinar el grado de maduración celular. Los resultados sugieren que cambios en el patrón de sialilación podrían ser el resultado de una alteración en la maquinaria celular involucrada en la glicosilación, incluyendo organelos, moléculas adaptadoras y enzimas (tales como, las sialiltransferasas) (Harduin-Lepers A et al., 2005).

CONCLUSIONES

La alteración del perfil de sialilación en el gérmen dentario, como resultado de la exposición a etanol durante el desarrollo embrionario, puede modificar la función de diversos glicoconjugados relacionados con el entorno dental, incluyendo factores de crecimiento (como los receptores EGF-R y erbB-2), mismos que son determinantes para un adecuado reconocimiento célula-célula y célula-matriz extracelular. La falla en alguna de estas interacciones puede afectar los procesos de proliferación, morfodiferenciación y secreción en las diferentes estructuras de los órganos dentarios expuestos a etanol. La suma de estas alteraciones genera un retraso en el desarrollo evidenciado por una morfología afectada y talla dental reducidas.

PERSPECTIVAS

Debido al origen común del germen dentario con diversas estructuras afectadas por el FAS, el modelo dental representa un modelo útil para el estudio de los mecanismos celulares y moleculares, así como de las interacciones epitelio-mesenquimales que regulan la morfogénesis de diversos órganos y tejidos después de la exposición a etanol.

De esta manera, dado que el etanol puede afectar las estructuras duras craneofaciales y dentales, se sugiere el estudio de factores de crecimiento como la familia TGF β y NGF, esenciales para los procesos de secreción y mineralización en los ameloblastos secretores y cartílago de Meckel (asociado a eventos de crecimiento y diferenciación en la mandíbula, tanto como EGF) (Kronmiller et al., 1991; Chai et al., 1994). El estudio de los cambios en los mecanismos moleculares de los factores tróficos involucrados en eventos de biomineralización auxiliará en la comprensión de las alteraciones provocadas por el etanol sobre las estructuras óseas maxilofaciales y dentales (retraso en el crecimiento mandibular, retrognatia y matriz adamantina alterada) reportadas en los niños con FAS. Asimismo, el estudio de factores de crecimiento como la familia EGF y TGF, importantes para la regulación de eventos apoptóticos en condiciones normales durante el desarrollo dentario (D'Souza et al., 1990), nos guiará en el entendimiento del papel que tienen los cambios en el microambiente local dental de factores de crecimiento respecto al retraso en el desarrollo dentario y mandibular previamente reportado.

Debido a la importancia de los glicoconjugados durante el desarrollo embrionario en el entorno craneofacial, será importante evaluar los cambios en tiempo y espacio, tanto de las moléculas terminadas, así como de la maquinaria relacionada con la glicosilación (como organelos y enzimas), y su relación con las vías de señalización mediadas por

factores de crecimiento. El análisis de la expresión de glicosiltransferasas durante el desarrollo dental en condiciones de alcoholización materna y el empleo de inhibidores de la glicosilación nos guiará en la comprensión de los mecanismos moleculares asociados a este fenómeno.

En este sentido, será importante el análisis de etapas posteriores del desarrollo dental relacionadas con la mineralización dental, el crecimiento radicular y la erupción dental, con el fin de determinar si la exposición a etanol materno afecta también estructuras como el ligamento periodontal, cemento radicular y hueso alveolar, y sus relación con la susceptibilidad para el desarrollo de procesos patológicos comunes como caries dental y enfermedad periodontal.

BIBLIOGRAFÍA

- AAP (American Academy of Pediatrics, Comité on Substance Abuse and Committee on Children with Disabilities). Fetal alcohol syndrome and alcohol-related neurodevelopmental disorders. *Pediatrics* 2000; 106:358–361.
- Aebi M, Hennet T. Congenital disorders of glycosylation: genetic model systems lead the way. *Trends Cell Biol* 2001; 11:136-141.
- Akita H, Fukae M, Shimoda S, Aoba T. Localization of glycosylated matrix proteins in secretory porcine enamel and their possible functional roles in enamel mineralization. *Arch Oral Biol* 1992; 37:953-962.
- Alroy I, Yarden Y. The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Lett* 1997; 410:83-86.
- Astley S, Magnuson S, Omnell L, Clarren S. Fetal alcohol syndrome: changes in craniofacial form with age, cognition, and timing of ethanol exposure in the macaque. *Teratology* 1999; 59:163-172.
- Azorin I, Lazaro F, Martines JM, Portoles M, Guerri C, Renau-Piqueras J. Prenatal exposure to alcohol affects the cytoskeleton in the developing rat liver. *Int J Dev Biol* 2001; 45:151-S152.
- Baskin G, Schenker S, Frosto T, Henderson GI. Transforming growth factor β 1 inhibits epidermal growth factor receptor endocytosis and down-regulation in cultured fetal rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1991; 266:13238-13242.
- Becker HC, Randall CL. Two generations of maternal alcohol consumption in mice: effect on pregnancy outcome. *Alcohol Clin Exp Res* 1987; 11:240-242.

- Brown NA, Goulding EH, Fabro S. Ethanol embryotoxicity: direct effect on mammalian embryos in vitro. *Science* 1979; 206:573-575.
- Burd L, Wilson H. Fetal, infant, and child mortality in a context of alcohol use. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2004; 127:51-58.
- Carpenter G. Receptors for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens. *Ann Rev Biochem* 1987; 56:881-914.
- Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *J Biol Chem* 1990; 265:7709-7712.
- Casasco A, Casasco M, Corbett I, Calligaro A. Expression of c-erbB-2 proto-oncogene encoded protein (p185^{erbB-2}) in functional rat ameloblasts. *Arch Oral Biol* 1994; 39:917-919.
- Cerna A, Janega P, Martanovic P, Lisy M, Babal P. Changes in sialic acid expression in the lung during intrauterine development of the human fetus. *Acta Histochem* 2002; 104:339-42.
- Chan D. Fetal alcohol syndrome. *Optom Vis Sci* 1999; 76:678-685.
- Chai Y, Mah A, Crohin C, Groff S, Bringas P, Le T, Santos V, Slavkin HC. Specific transforming growth factor- β subtypes regulate embryonic mouse Meckel's cartilage and tooth development. *Dev Biol* 1994; 162:85-103.
- Chan R, Hardy W, Laing M, Hardy S, Muller W. The catalytic activity of the ErbB-2 receptor tyrosine kinase is essential for embryonic development. *Mol Cell Biol* 2002; 22:1073-1078.
- Chaudhuri J. Alcohol and the developing fetus –a review. *Med Sci Monit* 2000; 6:1031-1041.
- Cho M, Lee Y, Garant P. Radioautographic demonstration of receptors for epidermal growth factor in various cells of the oral cavity. *Anat Rec* 1988; 222:191-200.

- Cho MI, Garant P, Lee Y. Periodontal ligament fibroblast, preosteoblast, and prechondrocytes express receptors for epidermal growth factor in vivo: A comparative radioautographic study. *J Periodont Res* 1988; 23:287-294.
- Clarren S, Smith D. The fetal alcohol syndrome. *N Engl J Med* 1978; 298:1063-1067.
- Climent E, Pascual M, Renau-Piqueras R, Guerri C. Ethanol exposure enhances cell death in the developing cerebral cortex: role of brain-derived neurotrophic factor and its signaling pathways. *J Neurosci Res* 2002 ; 68:213-225.
- Cohen S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J Biol Chem* 1962; 237:1555-1562.
- Cohen M. Malformations of the craniofacial region: evolutionary, embryonic, genetic, and clinical. *Am J Med Genet* 2002; 115:245–268.
- Cohn SA. Development of the molar teeth in the albino mouse. *Am J Anat* 1957; 101:295-319.
- Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, Gray A, McGrath J, Seeburg PH, Libermann TA, Schlessinger J, Francke U, Levinson A, Ullrich A. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* 1985; 230:1132-1139.
- Dall'Olio F, Malagolini N, Guerrini S, Lau JT, Serafini-Cessi F. Differentiation -dependent expression of human beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase mRNA in colon carcinoma CaCo-2 cells. *Glycoconj J* 1996; 13:115-121.
- Day NL, Robles N, Richardson G, Geva D, Taylor P, Scher M, Stoffer D, Cornelius M, Goldschmidt L. The effectsof prenatal alcohol use on the growth of children at three years of age. *Alcohol Clin Exp Res* 1991; 15:67-71.

- De Potter C, Van Daele S, van de Kerckhove D, Roels H. The expression of the neu oncogene product in breast lesions and in normal fetal and adult human tissues. *Histopathology* 1989; 15:351-362.
- Dennis JW, Granovsky M, Warren CE. Glycoprotein glycosylation and cancer progression. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1473:21-34.
- Desroches D, Ryan K, Vleck E, Benno RH. Effects of acute, in utero, alcohol exposure on growth and electrolyte metabolism in male offspring of C57BL/10J mice. *Alcohol Drug Res* 1987; 7:415-422.
- D'Souza RN, Happonen RP, Ritter NM, Butler WT. Temporal and spatial patterns of transforming growth factor- β_1 expression in developing rat molars. *Arch Oral Biol* 1990; 35:957-965.
- Edwards H, Dow-Edwards D. Craniofacial alterations in adult rats prenatally exposed to ethanol. *Teratology* 1991; 44:373-378.
- Engvall E. Structure and function of basement membranes. *Int J Dev Biol* 1995; 39:781-787.
- Erickson C, Turley E. The effects of epidermal growth factor on neural crest cells in tissue culture. *Exp Cell Res* 1987; 169:267-279.
- Estrada G, Del Rio JA, Garcia-Valero J, Lopez-Tejero MD. Ethanol *in utero* induces epithelial cell damage and altered kinetics in the developing rat intestine. *Teratology* 1996; 54:245-54.
- Favoni R, De Cupis A. The role of polypeptide growth factors in human carcinomas: new targets for a novel pharmacological approach. *Pharm Reviews* 2000; 52:179-206.

- Fazel A, Sumida H, Schulte B, Thompson R. Lectin histochemistry of the embryonic heart: fucosa-specific lectin binding sites in developing rats and chicks. *Am J Anat* 1989; 184:76-84.
- Garbarsch C, Matthiessen ME, Olsen BE, Moe D, Kirkeby S. Immunohistochemistry of the intercellular matrix components and the epithelio-mesenchymal junction of the human tooth germ. *Histochem J* 1994; 26:110-118.
- Gassmann M, Casagrande F, Orioli D, Simon H, Lai C, Klein R, Lemke G. Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the erbB4 neuregulin receptor. *Nature* 1995; 378:390-394.
- Gheri-Bryk S, Gheri G, Sgambati E, Pastore I. Changes in expression of the oligosaccharides in the human fetal skin. *Anat Anz* 1997; 179:49-56.
- Gheri G, Sgambati E, Bryk G. Glycoconjugates sugar residues in the chick embryo developing lung: a lectin histochemical study. *J Morphol* 2000; 243:257-264.
- Giglio MJ, Vieiro M, Friedman S, Bozzini CE. Effect of prenatal ethanol exposure on the growth of rat mandible skeletal units. *J Biol Buccale* 1987; 15:211-216.
- Gir A, Aksharanugraha K, Harris E. A cephalometric assessment of children with fetal alcohol syndrome. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 1989; 95:319-326.
- Gnaedinger JM, Druse MJ. Glycoproteins and proteins in an axolemma-enriched fraction and myelin from developing rat: effect of maternal ethanol consumption. *J Neurosci Res* 1984; 12:633-645.
- Gottesfeld Z, Morgan B, Perez-Polo J. Prenatal alcohol exposure alters the development of sympathetic synaptic components and of nerve growth factor receptor expression selectivity in lymphoid organs. *J Neurosci Res* 1990 ; 26:308-316.

- Grünewald S, Matthijs G, Jaeken J. Congenital disorders of glycosylation: a review. *Pediatr Res* 2002; 52:618-624.
- Guasch R, Renau-Piqueras J, Guerri C. Chronic ethanol consumption induces accumulation of proteins in the liver Golgi apparatus and decreases galactosyltransferase activity. *Alcohol Clin Exp Res* 1992; 16:942-948.
- Guevara J, Espinosa B, Zenteno E, Vázquez L, Luna J, Perry G, Mena R. Altered glycosylation pattern of proteins in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998; 57:905-914.
- Habbick B, Blakley P, Houston S, Snyder R, Senthilselvan A, Nanson J. Bone age and growth in fetal alcohol syndrome. *Alcohol Clin Exp Res* 1998; 22:1312-1316.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. Lipid peroxidation: a radical chain reaction. In: *Free Radicals in Biology and Medicine*. 2nd Edition. UK: Clarendon Press. 1989. p. 188-276.
- Haltiwang RS. Regulation of signal transduction pathways in development by glycosylation. *Curr Opin Struct Biol* 2002; 12:593-598.
- Hanover JA. Glycan-dependent signaling: O-linked N-acetylglucosamine. *FASEB J* 2001; 15:1865-1876.
- Hanson J, Streissguth A, Smith D. The effects of moderate alcohol consumption during pregnancy on fetal growth and morphogenesis. *J Pediatrics* 1978; 92:457-460.
- Harduin-Lepers A, Mollicone R, Delannoy P, Oriol R. 2005. The animal sialyltransferases and sialyltransferase-related genes: a phylogenetic approach. *Glycobiology* 15:805-17.
- Helenius A, Aebi M. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* 2001; 291:2364-2369.
- Henderson GI, Frosto TA, Heitman DW, Schenker S. Ethanol stimulates leucine uptake by rat fetal hepatocytes via trans-stimulation. *Am J Physiol* 1989a; 256:G386-G389.

- Henderson GI, Baskin GS, Horbach J, Porter P, Schenker S. Arrest of epidermal growth factor-dependent growth in fetal hepatocytes after ethanol exposure. *J Clin Invest* 1989b; 84:1287-1294.
- Henderson GI, Chen JJ, Schenker S. Ethanol, oxidative stress, reactive aldehydes, and the fetus. *Frontiers in Bioscience* 1999; 4:541-550.
- Hernández J. Morphologic effects of maternal ethanol intake on skull, mandible and tooth of the offspring in mice. *Jpn J Oral Biol* 1990; 32:460-469.
- Hernández-Díaz P, Martín-González O, Rodríguez de Pablos-Vélez Y, Ganem-Báez FA. Aplicaciones de las lectinas. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 1999; 15:91-95.
- Hernández-Guerrero JC, Portilla-Robertson J, Ledezma-Montes C, Ponce-Bravo S, Miranda-Gomez A, Arias-Rivera EM. Immunoexpression of epidermal growth factor in odontogenesis of the offspring of alcoholic mice. *Bol Estud Med Biol Mex* 1996; 44:25-30.
- Hernández J, Ledesma C, Loyola J. Effects of maternal ethanol intake on second alcoholic generation murine skull and mandibular size. *Arch Med Res* 1998; 29:297-302.
- Heymann R, About I, Lendahl U, Franquin JC, Öbrink B, Mitsiadis T. E- and N-cadherin distribution in developing and functional human teeth under normal and pathological conditions. *Am J Pathol* 2002; 160:2123-2133.
- Hiranruengchok R, Harris C. Glutathione oxidation and embryotoxicity elicited by diamide in the developing rat conceptus in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* 1993; 120:62-71.
- Horiguich T, Susuki K, Comas-Urrutia AC, Mueller-Heubach E, Boyer-Mil AM, Moroshima HO, James LS, Anderson K. Effect of ethanol upon uterine activity and fetal acid-base state of the rhesus monkey. *Am J Obstet Gynecol* 1971; 109:910-917.

- Hu CC, Sakakura Y, Sasano Y, Shum L, Bringas P Jr, Werb Z, Slavkin HC. Endogenous epidermal growth factor regulates the timing and pattern of embryonic mouse molar tooth morphogenesis. *Int J Dev Biol* 1992; 36:505-516.
- Hynes NE, Lane HA. ErbB receptors and cancer: the complexity of target inhibitors. *Nat Rev* 2005; 5:341-354.
- Jacobson J, Jacobson S, Sokol R. Effects of prenatal exposure to alcohol, smoking, and illicit drugs on postpartum somatic growth. *Alcohol Clin Exp Res* 1994; 18:317-323.
- Jenkinson PC, Danderson & SD Gangolli: Malformations induced in cultured rat embryos by enzymically generated active oxygen species. *Teratogen Carcinogen Mutagen* 1986; 6:547-554.
- Jiménez-Farfán D, Guevara J, Zenteno E, Malagón H, Hernández-Guerrero JC. EGF-R and erbB-2 in murine tooth development after ethanol exposure. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2005a; 73:65-71.
- Jiménez-Farfán D, Guevara J, Zenteno E, Hernández-Guerrero JC. Alteration of the sialylation pattern of the murine tooth germ after ethanol exposure. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2005b; 73 (in press).
- Jiménez-Martínez MM, Trejo MH, Herrera SA, Romero IJ. Alteraciones de la glicosilación en enfermedades humanas. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 2002; 15:39-47.
- Johnston MC, Bronsky PT. Prenatal craniofacial development: new insights on normal and abnormal mechanisms. *Crit Rev Oral Biol Med* 1995; 6:368-422.
- Jones KL, Smith DW, Ulleland CN, Streissguth P. 1973. Pattern of malformation in offspring of chronic alcoholic mothers. *Lancet* 1:1267-71.

- Jowett AK, Kimber SJ, Ferguson MWJ. Sialylation of terminal saccharides of glycoconjugates expressed by murine molar tooth germs developing in vitro and in vivo. *J Anat* 1994; 185:85-94.
- Jun-Tze W, Lee M. Adverse effects of maternal alcohol consumption on pregnancy and foetal growth in rats. *Nature* 1975; 257:479-480.
- Jürgen R. Subcellular organization of glycosylation in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1987; 405-436.
- Kaneko Y, Yamamoto H, Colley KJ, Moskal JR. Expression of Gal beta 1,4GlcNAc alpha 2,6-sialyltransferase and alpha 2,6-linked sialoglycoconjugates in normal human and rat tissues. *J Histochem Cytochem* 1995; 43:945-954.
- Kaufman M. *The atlas of mouse development*. San Diego CA: Academic Press. 1995. p. 8.
- Kim J, Druse M. Deficiency of essential neurotrophic factors in conditioned media produced by ethanol-exposed cortical astrocytes. *Dev Brain Res* 1996; 96:1-10.
- Kokai Y, Cohen J, Drebin J, Greene M. Stage and tissue specific expression of the neu oncogene in rat development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:8498-8501.
- Kotch L, Sulik K. Experimental fetal alcohol syndrome: proposed pathogenic basis of a variety of associated facial and brain anomalies. *Am J Med Genet* 1982a; 44:168-176.
- Kotch L, Sulik K. Patterns of ethanol-induced cell death in the developing nervous system of mice: Neural fold states through the time of anterior neural tube closure. *Int J Dev Neurosci* 1982b; 10:273-279.
- Kronmiller JE, Upholt WB, Kollar E. Expression of epidermal growth factor mRNA in the developing mouse mandibular process. *Archs Oral Biol* 1991; 36:405-410.
- Kronmiller JE, Upholt WB, Kollar EJ. EGF antisense oligodeoxynucleotides block murine odontogenesis in vitro. *Dev Biol* 1991; 147:484-488.

- Larkin JM, Oswald B, McNiven MA. Ethanol-induced retention of nascent proteins in rat hepatocytes is accompanied by altered distribution of the small GTP-binding protein rab2. *J Clin Invest* 1996; 98:2146–2157.
- Lee K, Simon H, Chen H, Bates B, Hung MC, Hauser C. Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development. *Nature* 1995; 378:394-398.
- Lemoine P, Harousseau H, Borteyru JP, Menuet JC. Les enfants de parents alcooliques: anomalies observees a propos de 127 cas. *Ouest Med* 1968; 21:476-482.
- Lemus D, Romero S, Lemus R, Garcia J, Fuenzalida M. Light microscopic detection of sugar residues in rabbit embryo teeth with lectin-horseradish peroxidase conjugates. *J Morphol* 1996; 227:185-195.
- Lemus D, Lemus R, Romero S, Arancibia N, Fuenzalida M. Detection of sugar residues in rabbit embryo teeth with lectin-horseradish peroxidase conjugate: II. A light microscopical study. *J Morphol* 1997; 231:175-184.
- Levi-Montalcini R, Cohen S. Effects of the extract of the mouse submaxillary salivary glands on the sympathetic system of mammals. *Ann N Y Acad Sci* 1960; 85:324-41.
- Lin F, Wise G. Effect of epidermal growth factor on expression of transforming growth factor - β 1 mRNA in stellate reticulum cells of rat mandibular molars. *Dev Dynamics* 1993; 198:22-27.
- Lin W, Sanchez H, Deerinck T, Morris J, Ellisman M, Lee K. Aberrant development of motor axons and neuromuscular synapses in erbB2-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:1299-1304.
- Lis H, Sharon N. Protein glycosylation. Structural and functional aspects. *Eur J Biochem* 1993; 218:1-27.

- Lis H, Sharon N. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chem Rev* 1998; 98:637-674.
- Martensson J, Jain A, Stole E, Frayer W, Ault PAM, Meister A. Inhibition of glutathione synthesis in the newborn rat: a model for endogenously produced oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:9360-9364.
- Martineau-Doizé B, Warshawsky H, Dickson K, Lai WH, Bergeron JJ. Localization of epidermal growth factor receptors in cells of the enamel organ of the rat incisor. *Dev Biol* 1991; 148:590-601.
- Martin-Rendon E, Blake DJ. Protein glycosylation in disease: new insights into the congenital muscular dystrophies. *Trends Pharmacol Sci* 2003; 24:178-183.
- Matthiessen ME, Romert P. Ethanol-induced changes of granular endoplasmic reticulum in hepatocytes of mini-pig fetuses. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [A]* 1983; 91:413-417.
- Matthiessen ME, Romert P. Changes of secretory ameloblasts in mini-pig fetuses exposed to ethanol in vivo. *J Dent Res* 1988; 67:1402-1404.
- Mattson S, Riley E, Sowell E, Jernigan T, Sobel D, Jones K. A decrease in the size of the basal ganglia in children with fetal alcohol syndrome. *Alcohol Clin Exp Res* 1996; 20:1088- 1093.
- May PA, Brooke L, Gossage JP, Croxford J, Adnams C, Jones KL, Robinson L, Viljoen D. Epidemiology of fetal alcohol syndrome in a South African community in the Western Cap Province. *Am J Public Health* 2000; 90:1905-1912.
- McCall D, Henderson G, Gray P, Schenker S. Ethanol effects on active Na^+ and K^+ transport in cultured fetal rat hepatocytes. *Biochemical Pharmacology* 1989; 38:2593-2600.

- Mendley S, Toback F. Autocrine and paracrine regulation of kidney epithelial cell growth. *Annu Rev Physiol* 1988; 51:33-50.
- Mercola M, Stiles CD. Growth factor superfamilies and mammalian embryogenesis. *Development* 1988; 102:451-460.
- Meyer J, Staubil A, Ruch J. Ultrastructural localization of concanavalin A binding sites on the surface of differentiation odontoblasts. *Biol Cell* 1981; 42:193-196.
- Meyer D, Birchmeier C. Multiple essential functions of neuregulin in development. *Nature* 1995; 378:386-390.
- Miettinen PJ, Chin JR, Shum L, et al. Epidermal growth factor receptor function is necessary for normal craniofacial development and palate closure. *Nature Genetics* 1999; 22:69-73.
- Minana R, Climent E, Baretino D, Segui JM, Renau-Piqueras J, Guerri C. Alcohol exposure alters the expression pattern of neural cell adhesion molecules during brain development. *J Neurochem* 2000; 75:954-964.
- Miosge N, Götz W, Quondamatteo F, Herken R. Comparison of lectin binding patterns in malformed and normal human embryos and fetuses. *Teratology* 1998; 57:85-92.
- Mitsiadis TA, Luukko K. Neurotrophins in odontogenesis. *Int J Dev Biol* 1995; 39:195-202
- Moore B, Madorsky I, Paiva M, Barrow-Heaton M. Ethanol exposure alters neurotrophin receptor expression in the rat central nervous system: effects of prenatal exposure. *Neurobiol* 2004; 60:101-113.
- Morris J, Lin W, Hauser C, Marchuk Y, Getman D, Lee K. Rescue of the cardiac defect in ErbB2 mutant mice reveals essential roles of erbB2 in peripheral nervous system development. *Neuron* 1997; 23:273-283.

- Noronha A, Druse M. Maternal ethanol consumption and synaptic membrane glycoproteins in offspring. *J Neurosc Res* 1982; 8:83-97.
- Oullete E, Rosett H, Rosman P, Weiner L. Adverse effects on offspring of maternal alcohol abuse during pregnancy. *N Engl J Med* 1977; 297:528-530.
- Parekh R. Gene expression-glycosilation. *Biologicals* 1994; 22:113-119.
- Partanen A, Ekblom P, Thesleff I. Epidermal growth factor inhibits morphogenesis and cell differentiation in cultured mouse embryonic teeth. *Dev Biol* 1985; 111:84-94.
- Partanen A, Thesleff I. Localization and quantitation of ¹²⁵I-epidermal growth factor binding in mouse embryonic tooth and other embryonic tissues at different developmental stages. *Dev Biol* 1987; 120:186-197.
- Peters H, Balling. Teeth. Where and how to make them. *Trends Genet* 1999; 15:59-65.
- Poirier F & Kimber S. Cell surface carbohydrates and lectins in early development. *Mol Hum Reprod* 1997; 3:907-918.
- Pullen GL, Singh SP, Snyder AK. Growth patterns of the offspring of alcohol-fed rats. *Growth Dev Aging* 1988; 52:85-89.
- Quirke P, Pickles A, Tuzi N, Mohamdee O, Gullick W. Patterns expression of c-erbB-2 oncoprotein in human fetuses. *Br J Cancer* 1989; 60:64-69.
- Quondamatteo F, Zieger J, Gotz W, Miosge N, Herken R. Extensive glycosylation changes revealed by lectin histochemistry in morphologically normal prenatal tissues of the mouse mutant undulated (un/un). *Anat Rec* 2000; 258:243-51.
- Renau-Piqueras J, Miragall F, Guerri C, et al. Prenatal exposure to etanol alters lateral plasma membranes and gap junctions on newborn rat hepatocytes as revealed by freeze-fracture. *J Submicrosc Cytol* 1987; 19:397-404.

- Renau-Picheras J, Miragall F, Gerri C, Baguena-Cervellera R. Prenatal alcohol exposure affects galactosyltransferase activity and glycoconjugates in the Golgi apparatus of fetal rat hepatocytes. *Hepatology* 1997; 25:343-350.
- Rithniemi L, Thesleff I. An autoradiographic study on the effect of epidermal growth factor on cell proliferation in eruption mouse incisors. *Arch Oral Biol* 1987; 32:859-863.
- Roebuck T, Mattson S, Riley E. A review of the neuroanatomical findings in children with fetal alcohol syndrome or prenatal exposure to alcohol. *Alcohol Clin Exp Res* 1998; 22:339-344.
- Rubin I, Yarden Y. The basic biology of HER2. *Ann Oncol* 2001; 12(Suppl 1):S3-S8.
- Ruch J. Determinants of odontogenesis. *Cell Biol Rev* 1987; 14:1-112.
- Ruch JV, Lesot H, Begue-Kim C. Odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol* 1995; 39:51-68.
- Rudd PM, Merry AH, Wormald MR, Dwek RA. Glycosylation and prion protein. *Curr Opin Struct Biol* 2002; 12:578-586.
- Sasano Y, Kaji Y, Nakamura M, Kindaichi K, Slavkin HC, Kagayama M. Distribution of glycoconjugates localized by Peanut and Maclura pomifera agglutinins during mouse molar root development. *Acta Anat* 1992; 145:149-155.
- Schauer R. Chemistry, metabolism and biological functions of sialic acids. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 1982; 40:131-235.
- Shih C, Padhy C, Murria M, Weinberg RA. Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into Mouse fibroblasts. *Nature* 1981; 290:261-264.
- Sierra C, Guevara J, Lascurain R, Perez A, Agundis C, Zenteno E, Vazquez L. Sialylation is modulated through maturation in hemocytes from *Macrobrachium rosenbergii*. *Comp Biochem Physiol C* 2001; 130:179-189.

- Singh S, Ehmann S, Snyder A. Ethanol-induced changes in insulin-like growth factors and IGF gene expression in the fetal brain. *Proc Soc Exp Biol Med* 1996; 212:349-354.
- Snead M, Luo W, Oliver P, Nakamura M, Don-Wheeler G, Bessem C, Bell G, Rall L, Slavkin H. Localization of epidermal growth factor precursor in tooth and lung during embryonic mouse development. *Dev Biol* 1989; 134:420-429.
- Steidler N, Reade P. Epidermal growth factor and proliferation of odontogenic cells in culture. *J Dent Res* 1981; 60:1977-1982.
- Stöcklin E, Botteri F, Groner B. An activated allele of the c-erbB-2 oncogene impairs kidney and lung function and causes early death of transgenic mice. *J Cell Biol* 1993; 122:199-208.
- Stoler JM, Holmes LB. Recognition of Facial Features of Fetal Alcohol Syndrome in the Newborn. *Am J Med Gen Part C* 2004; 127C:21-27.
- Stratton K, Howe C, Battaglia F. *Fetal Alcohol Syndrome: Diagnosis, epidemiology, prevention and treatment*. Washington: National Academy Press. 1996.
- Streissguth A, Landesman-Dwyer S, Martin J, Smith D. Teratogenic effects of alcohol in humans and laboratory animals. *Science* 1980; 209:353-361.
- Su B, Debelak K, Tessmer L, Cartwright M, Smith S. Genetic influences on craniofacial outcome in an avian model on prenatal alcohol exposure. *Alcohol Clin Exp Res* 2001; 25:60-69.
- Sulik K, Johnston M, Webb M. Fetal alcohol syndrome: embryogenesis in a mouse model. *Science* 1981; 214:936-938.
- Sulik K, Johnston M. Sequence of developmental alterations following acute ethanol exposure in mice: Craniofacial features of the fetal alcohol syndrome. *Am J Anat* 1983; 166:257-269.

- Tanikawa Y, Bawden J. The immunohistochemical localization of phospholipase C γ and the epidermal growth-factor, platelet-derived growth-factor and fibroblast growth-factor receptors in the cells of the rat molar enamel organ during early amelogenesis. *Arch Oral Biol* 1999; 44:771-780.
- Ten Cate AR. *Oral histology*. 5th ed. St. Louis: Mosby. 1998.
- Theiler K. *The house of mouse. Atlas of embryonic development*. New York: Springer-Verlag. 1989. p. 122-125.
- Thesleff I, Hurmerinta K. Tissue interactions in tooth development. *Differentiation* 1981; 18:75-88.
- Thesleff I, Ekblom P, Keski-Oja J. Inhibition of morphogenesis and stimulation of vascular proliferation in embryonic tooth cultures by a sarcoma growth factor preparation. *Can Res* 1983; 43:5902-5909.
- Thesleff I. Epithelial cell rests of Malassez bind epidermal growth factor intensely. *J Period Res* 1987; 22:419-421.
- Thesleff I, Partanen A, Rihtniemi L. Localization of epidermal growth factor receptors in mouse incisors and human premolars during eruption. *Eur J Orthodontics* 1987; 9:24-32.
- Thesleff I, Vaahtokari A, Partanen A. Regulation of organogenesis: common molecular mechanisms regulating the development of teeth and other organs. *Int J Dev Biol* 1995; 39:35-50.
- Thesleff I, Nieminen P. Tooth differentiation and cell differentiation. *Curr Opin Cell Biol* 1996; 8:884-850.
- Thesleff I, Sharpe P. Signalling networks regulating dental development. *Mech Dev* 1997; 67:111-123.

- Topham R, Chiego D, Gattone V, Hinton D, Klein R. The effect of epidermal growth factor on neonatal incisor differentiation in the mouse. *Dev Biol* 1987; 124:532-543.
- Tran T, cronies K, Marino M, Jenkins W, Kelly S. Critical periods for the effects of alcohol exposure on brain weight, body weight, activity and investigation. *Behav Brain Res* 2000; 116:99-110.
- Vaahtokari A, Vainio S, Thesleff I. Associations between transforming growth factor β_1 RNA expression and epithelial-mesenchymal interactions during tooth morphogenesis. *Development* 1991; 113:985-994.
- Vallejo V, Reyes J, Hernández J, Ramírez H, Delannoy P, Zenteno E. Differential expresión of sialic acid on porcine organs during the maturation process. *Comp Biochem Physiol Part B* 2000; 126:415-424.
- Valles S, Lindo L, Montoliu C, Renau-Piqueras J, Guerri C. Prenatal exposure to ethanol induces changes in the nerve growth factor and its receptor in proliferating astrocytes in primary culture. *Brain Res* 1994; 656:281-286.
- Van der Geer P, Hunter T, Lindberg RA. Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Ann Rev Cell Biol* 1994; 10:251-337.
- Vázquez L, Massó F, Rosas P, et al. Purification and characterization of a lectin from *Macrobrachium rosenbergii* (Crustacea decapoda) hemolymph. *Comp Biochem Physiol* 1993; 105B:617-623.
- Villacara A, Kumami K, Yamamoto T, Mrsulja BB, Spatz M. Ischemic modification of cerebrocortical membranes: 5-hydroxytryptamine receptors, fluidity, and inducible in vitro lipid peroxidation. *Neurochem* 1989; 53:595-601.
- Vosseller K, Wells L, Hart GW. Nucleocytoplasmic O-glycosylation: O-GlcNAc and functional proteomics. *Biochimie* 2001; 83:575-581.

- Watts LT, Rathinam ML, Schenker S, Henderson GI. Astrocytes protect neurons from ethanol-induced oxidative stress and apoptotic death. *J Neurosci Res* 2005; 80:655–666.
- Weston W, Greene R, Uberti M, Pisano M. Ethanol effects on embryonic craniofacial growth and development: implications for study of the fetal alcohol syndrome. *Alcohol Clin Exp Res* 1994; 18:177-182.
- Wilson DB, Wyatt DP. Patterns of lectin binding during mammalian neurogenesis. *J Anat* 1995; 186:209-216.
- Wise G, Frazier-Bowers S, D'Souza R. Cellular, molecular, and genetic determinants of tooth eruption. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13:323-334.
- Xu Y, Liu P, Li Y. Impaired development of mitochondria plays a role in the central nervous system defects of Fetal Alcohol Syndrome. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2005; 73:83-91.
- Yamamoto T, Cuis XM, Schuler CF. Role of ERK1/2 signaling during EGF-induced inhibition of palatal fusion. *Dev Biol* 2003; 260:512-521.
- Yamane A, Mayo ML, Bringas P Jr, Chen L, Huynh M, Thai K, Shum L, Slavkin HC. TGF- α , EGF, and their cognate EGF receptor are co-expressed with desmin during embryonic, fetal and neonatal myogenesis in mouse tongue development. *Dev Dyn* 1997; 209:353-366.
- Yarema K, Bertozzi C. Characterizing glycosylation pathways. *Gen Biol* 2001; 2:0004.1-0004.10.
- Yoshida K et al. Expression and localization of laminin-5 subunits during mouse tooth development. *Dev Dyn* 1998; 211:164-176.

Zeichner-David M, Diekwisch T, Fincham A, et al. Control of ameloblast differentiation. *Int J Dev Biol* 1995; 39:69-92.

Zenteno E, Lascurain R, Montaña LF, Vázquez L, Debray H, Montreuil J. Specificity of *Amaranthus leucocarpus* lectin. *Glycoconjugate J* 1992; 9:204-208.

ANEXO

Fig. 1 Pesos de las madres durante el período pregestacional

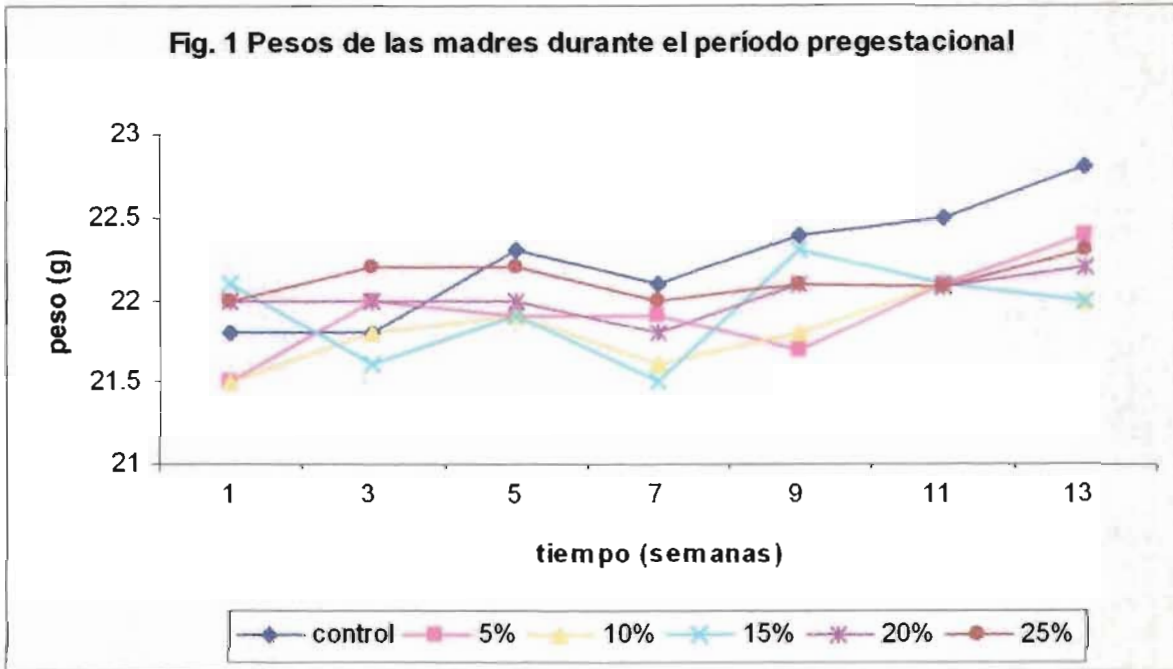


Fig. 2 Peso corporal de las madres durante la gestación hasta el día 18.5 prenatal

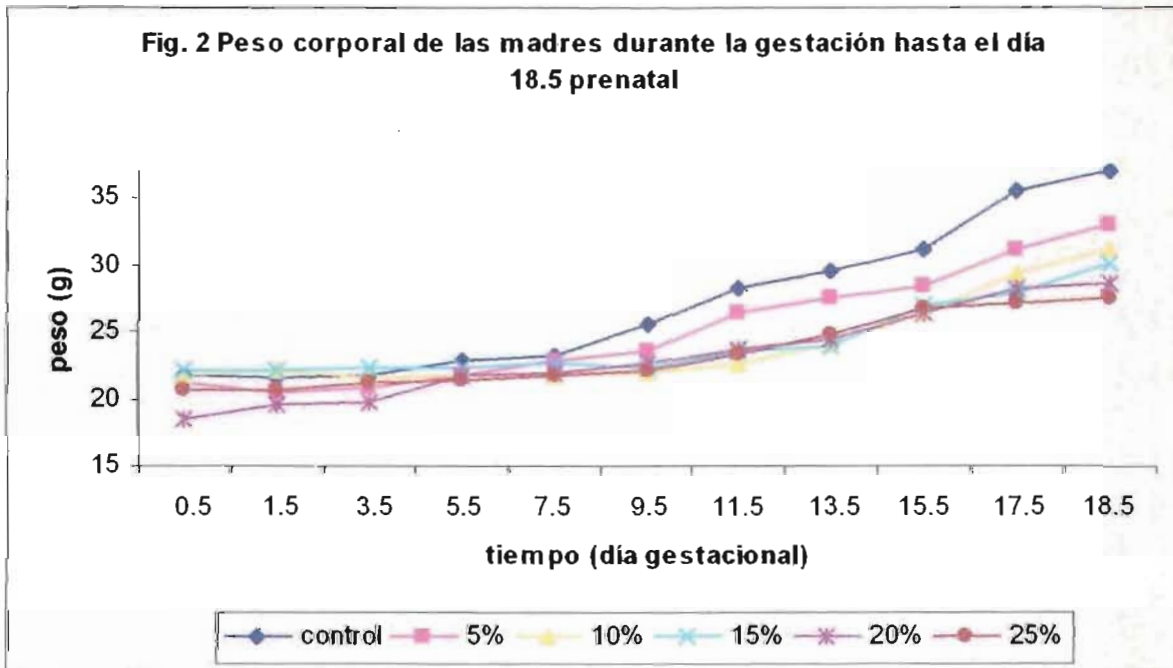
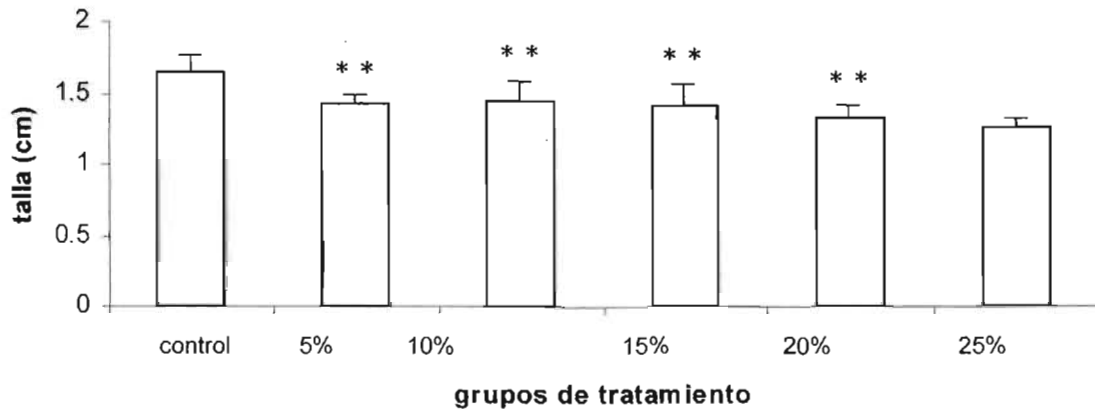
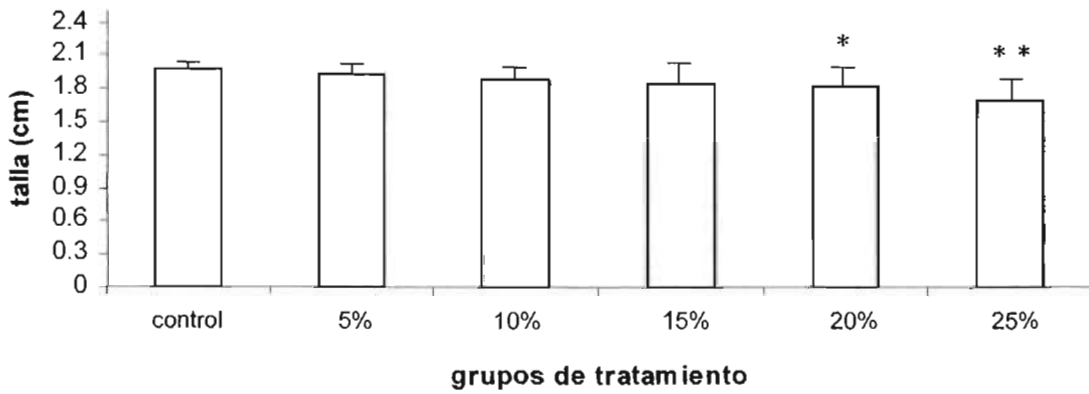


Fig. 3 Talla corporal de los fetos de 16.5 días prenatal



** p < 0.01

Fig. 4 Talla corporal de los fetos de 18.5 días prenatal



* p ≤ 0.05

** p < 0.01

Fig. 5 Peso corporal de los fetos de 16.5 días prenatal

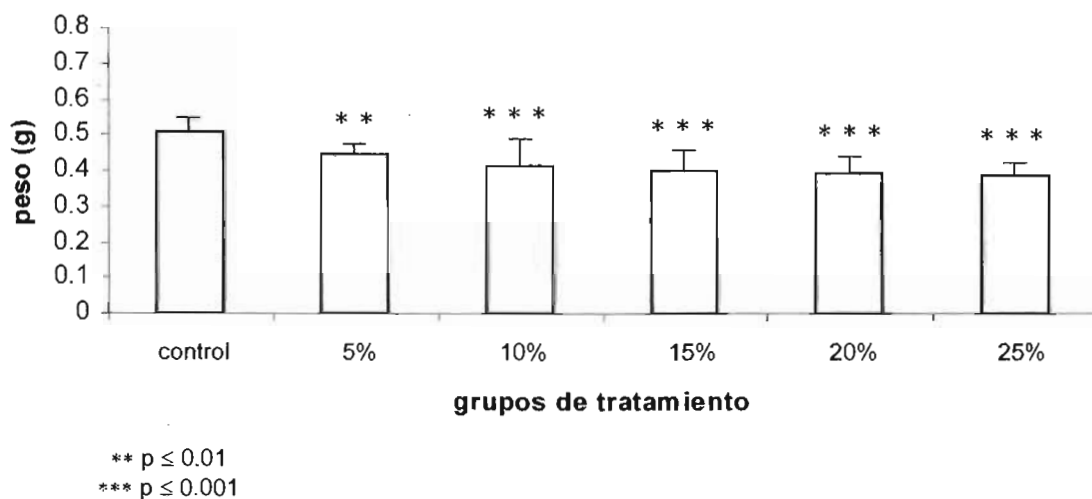


Fig. 6 Peso corporal de los fetos de 18.5 días prenatal

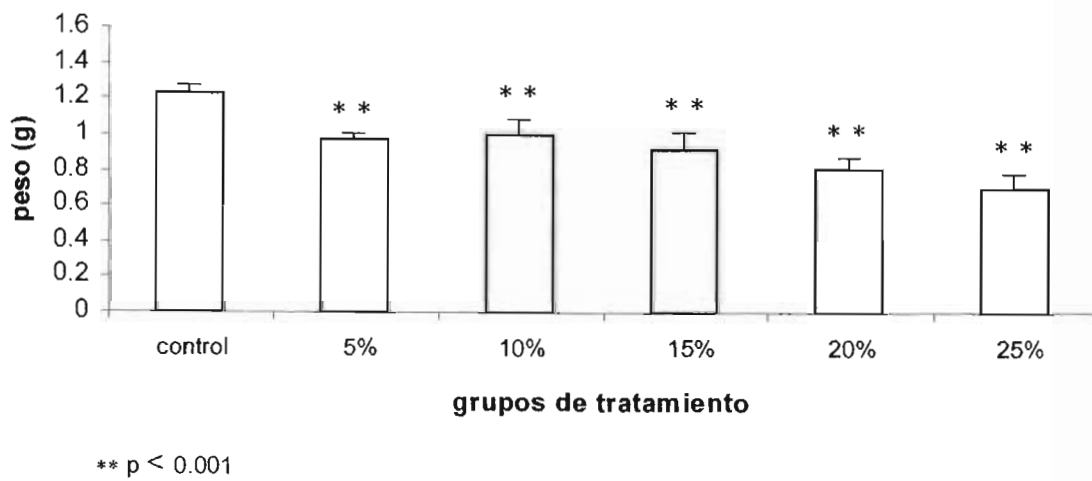


Fig. 7 Talla dental de primer molar inferior de fetos de 16.5 días

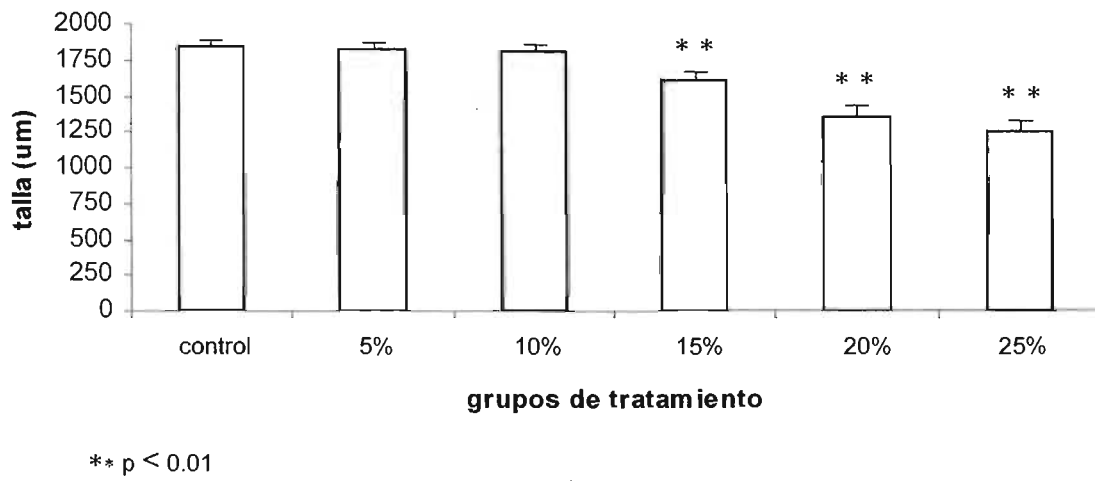


Fig. 8 Talla dental de primer molar inferior de fetos de 18.5 días

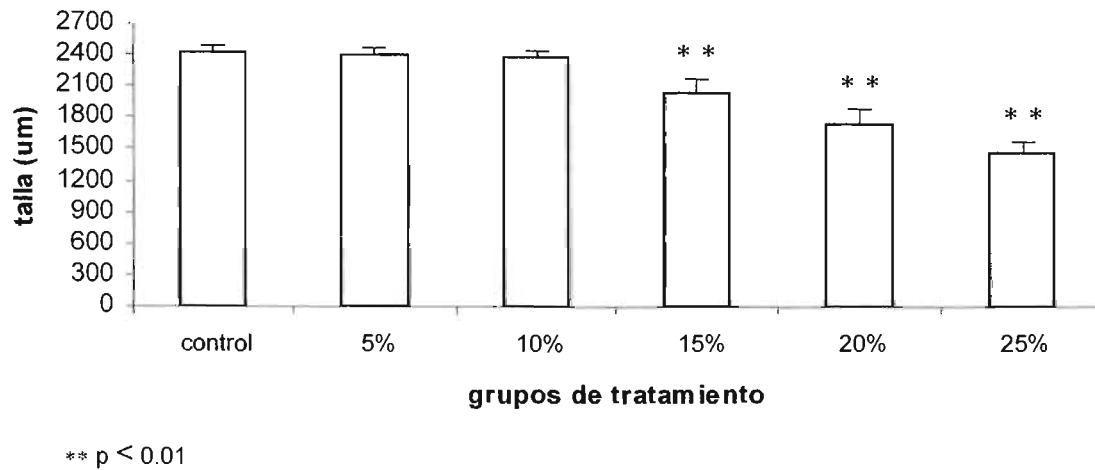


Tabla 1. Peso de las madres durante el periodo de alcoholización pregestacional

| grupo de tratamiento | peso (g) ^a |
|-----------------------------|------------------------------|
| control | 22.02 ± 0.46 |
| 5% de etanol | 21.75 ± 0.38 |
| 10% de etanol | 21.61 ± 0.30 |
| 15% de etanol | 21.64 ± 0.40 |
| 20% de etanol | 21.91 ± 0.35 |
| 25% de etanol | 21.93 ± 0.37 |

^a Representa el promedio ± SD de las 13 semanas previas a la fertilización.

ANOVA, F= 0.1599 (no significativo)

Tabla 2. Peso de las madres al momento de obtención de las crías

| grupo de tratamiento | día 16.5 de gestación^o | día 18.5 de gestación^o |
|-----------------------------|--|--|
| control | 30.51 ± 3.32 | 37.0 ± 1.3 |
| 5% de etanol | 29.85 ± 2.41 * | 33.0 ± 1.9 ** |
| 10% de etanol | 28.10 ± 1.60 ** | 31.2 ± 1.4 ** |
| 15% de etanol | 27.50 ± 3.63 ** | 30.1 ± 2.1 ** |
| 20% de etanol | 27.35 ± 3.89 ** | 28.6 ± 2.3 ** |
| 25% de etanol | 26.95 ± 2.04 ** | 27.5 ± 1.9 ** |

^o gramos (promedio ± SD)

* p ≤ 0.05

** p < 0.01

Tabla 3. Consumo de alcohol durante la gestación por día

| grupo de tratamiento | consumo de liquido | volumen de alcohol (ml) | masa de alcohol (mg) |
|-----------------------------|---------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| control (agua) | 5.81 ± 0.75 | - | - |
| 5% | 4.0 ± 0.5 ** | 0.081 ± 0.010 | 63 ± 8.3 |
| 10% | 3.2 ± 1.4 ** | 0.168 ± 0.078 | 133 ± 61 |
| 15% | 2.7 ± 0.4 ** | 0.273 ± 0.047 | 215 ± 35 |
| 20% | 3.8 ± 0.2 * | 0.587 ± 0.037 | 465 ± 33 |
| 25% | 3.3 ± 1.8 ** | 0.799 ± 0.451 | 630 ± 35.3 |

* $p \leq 0.01$

** $p < 0.001$

Tabla 4. Nivel de alcohol materno en sangre (Blood Alcohol Level –BAL–)

| grupo de alcoholización | concentración de etanol (mg) / 100 ml de plasma |
|--------------------------------|--|
| 5% | 43.0 ± 0.08 |
| 10% | 63.0 ± 0.30 * |
| 15% | 56.6 ± 0.81 * |
| 20% | 273.1 ± 1.74** |
| 25% | 346.8 ± 3.6 ** |

* $p \leq 0.01$

** $p < 0.001$

Tabla 5. Total de crías por grupo de tratamiento

| grupo de tratamiento | número de crías |
|-----------------------------|------------------------|
| control | 7.3 ± 0.98 |
| 5% | 7.2 ± 0.78 |
| 10% | 6.2 ± 0.79* |
| 15% | 4.8 ± 1.23* |
| 20% | 4.2 ± 1.55** |
| 25% | 3.6 ± 1.64** |

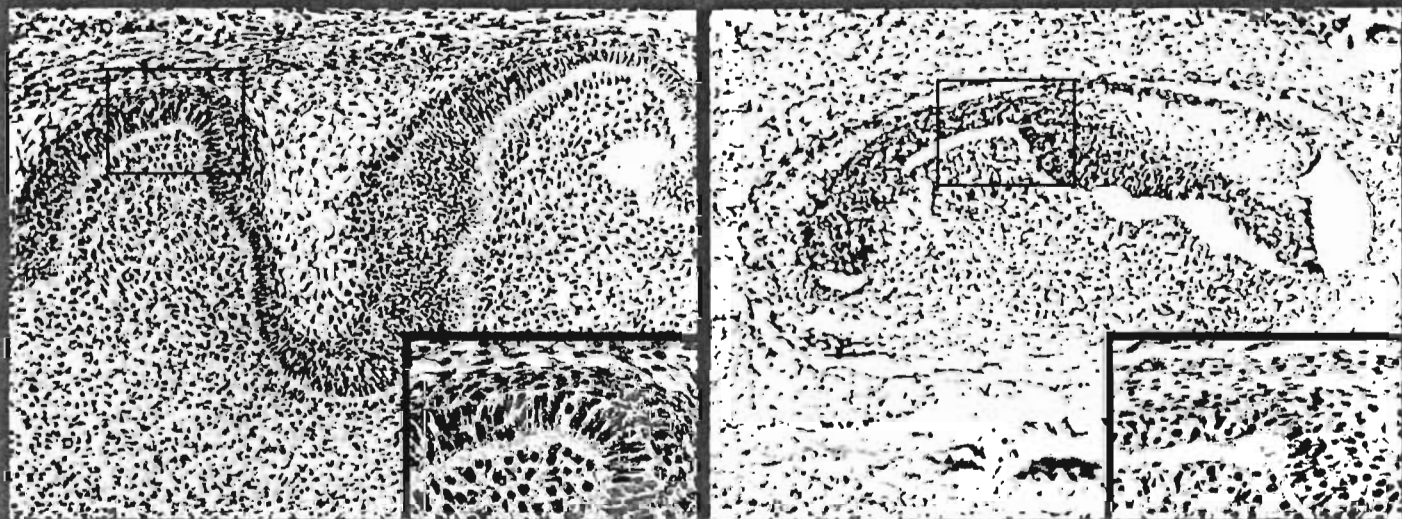
* $p \leq 0.01$

** $p < 0.001$

birth defects research

PART A:

CLINICAL AND MOLECULAR TERATOLOGY



Delayed Dental Morphogenesis in Mice
Exposed to Ethanol in Utero

Philip E. Mirkes
Editor



ISSN 1542-0752

WILEY-LISS

ONLINE SUBMISSION AND PEER REVIEW
bdr-wiley.manuscriptcentral.com
 Discover papers in this journal online, ahead of the print issue, through EarlyView.
WILEY InterScience®
 DISCOVER SOMETHING GREAT
www.interscience.wiley.com



birth defects research

The Official Publication of the Teratology Society
www.teratology.org

PART A: CLINICAL AND MOLECULAR TERATOLOGY
Formerly published as *Teratology*

Editor

Philip E. Mirkes

Center for Environmental and Rural Health
Department of Veterinary Physiology and Pharmacology
Texas A&M University
College Station, Texas

Deputy Editor

Michael L. Cunningham
Seattle, Washington

Assistant Editor

Donna Z. Mirkes
College Station, Texas

Andrew J. Copp

London, England

Ronald N. Hines

Milwaukee, Wisconsin

Jeanne M. Manson

Philadelphia, Pennsylvania

Raymond B. Runyan

Tucson, Arizona

Susan M. Smith

Madison, Wisconsin

Editors Emeriti (*Teratology*)

Harold Kalter (1968-1976)

Robert L. Brent (1977-1992)

Thomas W. Sadler (1993-1997)

Lewis B. Holmes (1998-2002)

Publications Committee

Deborah Hansen (Chair)

Barbara F. Hales (Vice Chair)

Richard K. Miller (Past Chair)

Karen A. Augustine

Stephen B. Harris

Wafa A. Harrouk

Jeffrey M. Peters

Anthony R. Scialli

Kenneth Lyons Jones (President)

George P. Daston (Editor, Part B)

Philip E. Mirkes (Editor, Part A)

Rocky Tuan (Editor, Part C)

Nancy A. Olsen (Wiley-Liss)

Associate Editors

Richard H. Finnell

Houston, Texas

Diana M. Juriloff

Vancouver, BC, Canada

Jeffrey C. Murray

Iowa City, Iowa

Gary M. Shaw

Oakland, California

Martha M. Werler

Boston, Massachusetts

Case Report Editor

Mason Barr, Jr.

Ann Arbor, Michigan

Teratogen Update Editor

Robert L. Brent

Wilmington, Delaware

Book Review Editor

Janine E. Polifka

Seattle, Washington

TERATOLOGY SOCIETY COUNCIL 2003-2004

Kenneth Lyons Jones, President

Melissa Sherman Tassinari, Vice President

Elaine M. Faustman, Vice President-elect

Ida W. Smoak, Treasurer

George E. Dearlove, Secretary

Rochelle W. Tyl, Past President

Karen Filkins, Councilor

John M. Graham, Jr., Councilor

Robert M. Parker, Councilor

Deborah Hansen, Chair, Publications Committee

Anthony R. Scialli, Chair, Public Affairs Committee

Tonia M. Masson, Executive Director; (703) 438-3104

Original Articles

EGF-R and erbB-2 in Murine Tooth Development after Ethanol Exposure

Dolores Jiménez-Farfán,¹ Jorge Guevara,² Edgar Zenteno,³ Héctor Malagón,¹ and Juan Carlos Hernández-Guerrero^{1*}¹Laboratorio de Inmunología, DEPEI, Facultad de Odontología, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, Mexico²Laboratorio de Enfermedades Neurodegenerativas, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, México City, Mexico³Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, Mexico

Received 8 July 2004; Accepted 2 December 2004

BACKGROUND: Alcohol consumption during pregnancy can frequently lead to a congenital disorder known as fetal alcohol syndrome (FAS); however, not all children born to alcoholic women develop FAS. Alcohol consumption may affect diverse organs and systems during embryonic development, including craniofacial structures. Small teeth, enamel alterations, and delayed eruption have been observed after ethanol exposure. Epidermal growth factor receptors (EGF-Rs) participate in dental proliferation and differentiation, and changes in these receptors were considered here to be a likely mechanism associated to the dental anomalies observed in this syndrome. Epidermal growth factor receptor type 1 (EGF-R) and epidermal growth factor receptor type 2 (erbB-2) immunoreexpression during the lower first molar morphogenesis was investigated in mouse fetuses exposed to ethanol during gestation. **METHODS:** Pregnant female mice were divided into groups, consuming either 5, 10, 15, 20, or 25% ethanol solutions, or water (control group). Heads were obtained from 16.5- and 18.5-day fetuses. Immunohistochemistry was applied to EGF-R and erbB-2. **RESULTS:** At days 16.5 and 18.5, fetuses from 15%, 20%, and 25% ethanol groups showed delayed differentiation, degenerative changes in dental epithelial tissues and reduced dental size; additionally, they displayed an enhanced immunoreactivity to EGF-R and erbB-2. **CONCLUSIONS:** Our results suggest that ethanol consumption during pregnancy affects the expression of EGF receptors and induces a delay in murine fetal dental morphogenesis. Dental development is a process that involves a number of growth factors; hence we consider that further research is required to show whether the changes in glycosylation and growth-factor signaling pathways observed in other cells are also involved in the alterations observed in this study. *Birth Defects Research (Part A)* 73: 65–71, 2005. © 2005 Wiley-Liss, Inc.

Key words: ethanol; EGF-R; erbB-2; odontogenesis; mice

INTRODUCTION

Fetal alcohol syndrome (FAS) groups a number of physical alterations that occur in children of women who have consumed ethanol during pregnancy. These alterations include a dysfunctional central nervous system, growth impairment, and a number of facial anomalies (Jones et al., 1973). To date, the mechanisms behind the effect of prenatal ethanol exposure on dental growth and development have not been identified. Clinical dentofacial analyses have revealed a reduced tooth size and faulty enamel in FAS children (Clarren and Smith, 1978). Growth factors participate during craniofacial and dental development (Partanen and Thesleff, 1987), and specific receptors for growth factors, such as epidermal growth factor (EGF)-R and

erbB-2, as well as neural crest cells, are widely distributed in normal developing epithelial tissues (Kokai et al., 1987;

Grant sponsor: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT); Grant number: G38590N; Grant sponsor: Programa de Investigación Estratégica en Salud Secretaría de Salud y Asistencia (SSA)-CONACYT; Grant number: MO-354; Grant sponsor: Fundación Mexicana para Salud (FUNSALUD), Dirección General de Apoyo al Personal Académico-Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA-UNAM); Grant number: PAPIIT-IN207901.

*Correspondence to: Juan Carlos Hernández, Laboratorio de Inmunología, DEPEI, Facultad de Odontología, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Institutos s/n, Ciudad Universitaria, México D.F. C.P. 04510. E-mail: jcarlosh@servidor.unam.mx

Published online 2 February 2005 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

DOI: 10.1002/bdra.20113

Mercola and Stiles, 1988; De Potter et al., 1989; Quirke et al., 1989). Dental processes, such as mitogenesis, cellular differentiation (Topham et al., 1987), dental eruption (Thesleff et al., 1987), and enamel and dentine-matrix secretion (Tanikawa and Bawden, 1999), have all been related to the EGF-R family. Delayed calcification and dental eruption in mice have been reported in offspring exposed to ethanol in utero (Hernández, 1990).

Since mice exposed to ethanol display a reduced EGF expression in the tooth germ, a potential role of the EGF family in these disorders has been suggested (Hernández-Guerrero et al., 1996). Tooth germ represents a suitable model to study the cellular and molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal interactions regulating the morphogenesis of many organs and tissues after prenatal ethanol exposure. During 16.5 and 18.5 days of prenatal murine dental development, diverse cellular events specifically related to proliferation and differentiation take place. Dental morphogenesis, cytodifferentiation, and dentin and enamel-matrix formation are all mechanisms regulated by growth factors. Many organs, including the tooth germ, are known to increase their EGF-binding sites in stages with a higher proliferative activity (Partanen and Thesleff, 1987; Thesleff et al., 1995).

We investigated the effect of ethanol on growth factors during dental development in mice. Through immunohistochemistry, we demonstrate the distribution pattern of EGF-R and erbB-2 in the lower first molar of 16.5- and 18.5-day prenatal mice exposed to ethanol during development.

MATERIALS AND METHODS

Approval to conduct this study was granted by the Facultad de Odontología's Ethics Committee at Universidad Nacional Autónoma de México. The maximum tolerated dose in this study was confirmed in a preliminary experiment using incremental dosing in five nonpregnant, female Balb/c mice for two consecutive weeks. Nevertheless, mice that refused to consume ethanol during the course of the experiment were excluded.

A total of 35 eight-week-old (21–23 gm) female BALB/c mice were randomly assigned to five groups that consumed ethanol at different concentrations ($n = 25$), plus a control group of mice that consumed water ($n = 10$) ad libitum. Animals were fed standard laboratory food under controlled temperature and 12-hr/12-hr light/dark cycles during the experiment. Ethanol concentrations in water used in this experiment were 5, 10, 15, 20, and 25% (absolute anhydrous ethyl alcohol; Mallinckrodt Baker, Estado de Mexico, Mexico). In all groups, ethanol and water were administered in 150-ml plastic bottles provided with a tip to minimize leakage and evaporation. Experimental females were gradually introduced to ethanol through a daily increase in concentration until reaching the assigned level. From this moment, 13 weeks were counted for each treatment group. Afterward, female mice were allowed to mate for 24 hr, and the presence of a vaginal plug was considered as prenatal day 0.5 (Kaufman, 1995). Ethanol consumption continued during pregnancy until fetuses were removed. Pregnant mice were weighed and observed daily throughout the experiment to monitor toxicity.

Tooth-Germ Samples

Pregnant BALB/c mice were euthanized by ethyl ether inhalation and sacrificed by cervical dislocation. Fetuses

were removed and killed by decapitation. Prenatal day 16.5 and 18.5 fetuses were processed from each treatment group. Taking into account that each litter has an overall average of six offspring, we obtained 12 heads from each treatment group and age to analyze the ethanol effects. Heads were fixed in 4% paraformaldehyde added with 0.1 M PBS, pH 7.4, for 24 hr. Heads were dehydrated, cleared, and embedded in paraffin. Four-micrometer-thick sections were sliced and stained with hematoxylin-eosin, as well as with immunohistochemical techniques.

Immunohistochemical Staining

Four-micrometer-thick histological sections were deparaffinized and rehydrated. Slides were treated with 3% H_2O_2 , washed twice in 0.1 M PBS, pH 7.4, followed by the addition of 2% BSA. Sections were incubated overnight at 4°C along with rabbit polyclonal EGF-R antibody (sc-03, 1:300 dilution) and monoclonal erbB-2 antibody (sc-7301, 1:200 dilution) obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Goat anti-rabbit conjugated IgG-peroxidase (A0545, 1:100 dilution; Sigma, St. Louis, MO) and horse anti-mouse IgG peroxidase (PI-2000, 1:100 dilution; Vector Laboratories, Burlingame, CA) were added as secondary antibodies for 1 hr. 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) was used as chromogen. Negative controls were prepared by excluding the primary antibody or secondary antibody. To secure the adequate blocking of peroxidase endogen activity, we treated slides with 3% H_2O_2 and DAB was added. To demonstrate the antibody specificity of EGF-R and erbB-2, we used blocking peptides EGF-R (sc-03 P) and Neu (sc-7301 P) obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Sections were dehydrated and mounted for analysis in a DMLS Leica Microscope with an IM1000 system (Leica, Cheerburg, Germany). A semiquantitative method to describe the staining was used. Four levels for staining were considered as follows: – (negative staining), + (light staining), ++ (medium staining), and +++ (heavy staining). We also compared differences in tooth size from control and experimental groups. Data were analyzed by Student's *t*-test and ANOVA ($p < 0.05$) from SPSS Version 9.0 (SPSS, Chicago, IL).

RESULTS

Histology of Prenatal Day 16.5 Lower First Molar

The control group of mice consuming water without ethanol showed an incipient cusped pattern with enlargement of the basement membrane. Inner-enamel epithelial cells appeared well organized and differentiated (Fig. 1A). Dental papilla showed cellular proliferation and a beginning of cellular organization that would later constitute the preodontoblastic layer. Well-defined cubic cells constituted the outer-enamel epithelium (Fig. 1B). Areas of the inner-enamel epithelium showed discontinuity and a loss of the basement membrane in the 5% ethanol group. The 10% ethanol group showed a disorganized inner-enamel epithelium, with vacuolization in the basement membrane and cells displaying pycnotic nuclei. Different levels of nuclear polarity and a cellular disarrangement in the inner-enamel epithelium and dental papilla, as well as vacuolization and loss of the basement membrane, were observed in the 15% and 20% ethanol groups (Fig. 1C and D). The 25% ethanol group showed an inner-enamel epithelium

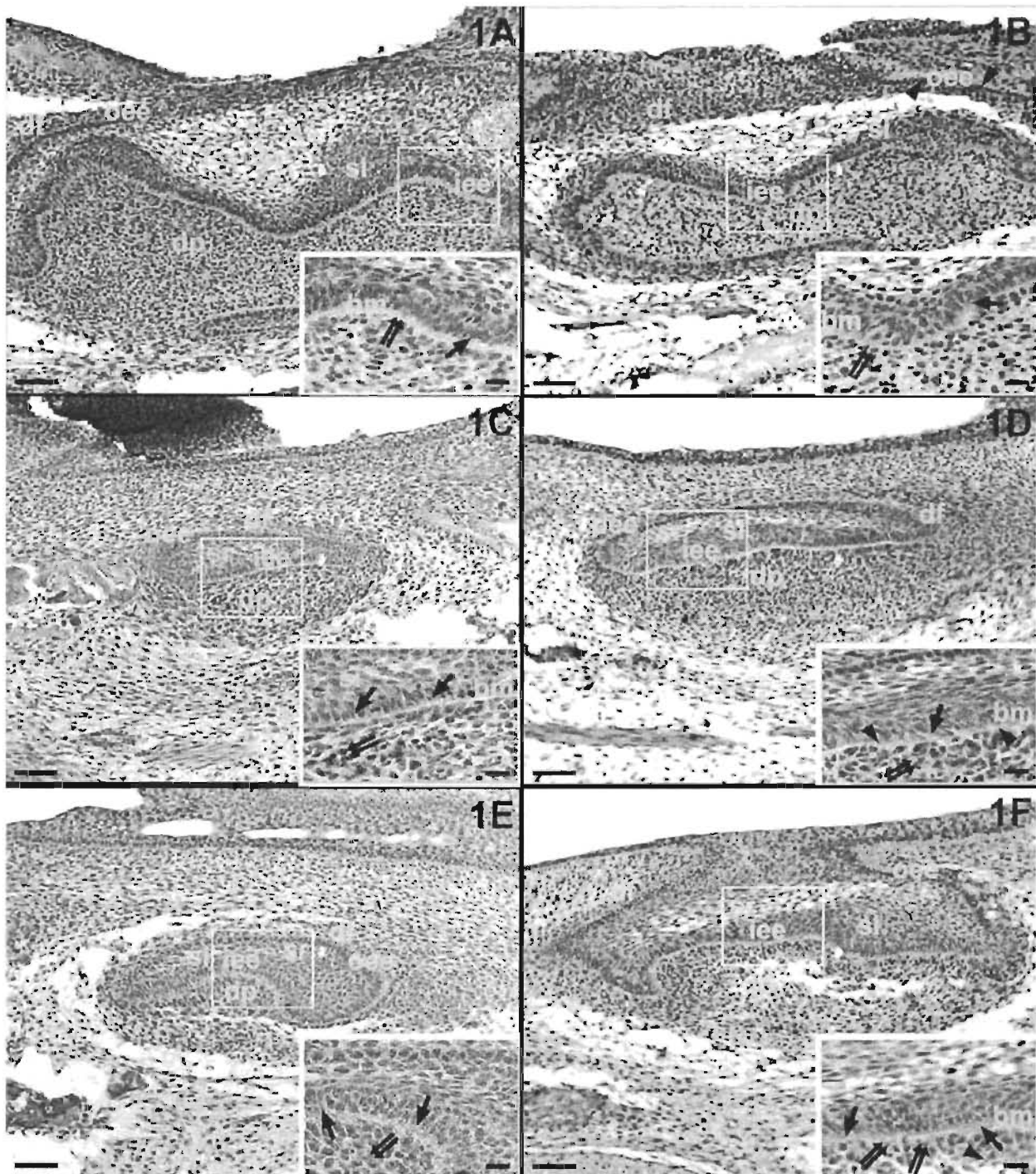


Figure 1. A,C,E: Prenatal day 16.5. EGF-R immunoreactivity. A: Control group. Organized iee (arrow) and well-defined bm (double arrow). Light and homogeneous staining of iee and dp. C: 15% ethanol group. Cellular disarrangement on iee (arrow) and dp (double arrow). Increased staining of iee, si, and dp. E: 25% ethanol group. Loss of cellular limits and absence of cell differentiation of iee (arrow) and dp (double arrow). bm was not observed. Stronger reactivity in iee, dp, and sr. B,D,F: Prenatal day 16.5. erbB-2 immunoreactivity. B: Control group. iee appeared well organized and differentiated (arrow). dp showed cellular proliferation and a beginning of cellular organization (cells adjoining to iee) (double arrow). Well-defined cubic cells constituted the oee (arrowhead). sr, iee, si, and dp displayed mild and homogeneous staining. D: 15% ethanol group. Loss of cellular limits of iee (arrow) and dp (double arrow) with loss of bm (arrowhead). Increased staining of iee, si, dp, and oee. F: 25% ethanol group. Cells with undefined and fragmented nucleus (arrowhead) and loss of the bm (arrow) were also observed. No signs of cellular differentiation in the future preodontoblastic layer were evident (double arrow). sr reduced and disaggregated (arrowhead). Heavier staining of iee, dp, and sr. bm = basement membrane; df = dental follicle; dp = dental papilla; iee = inner-enamel epithelium; si = stratum intermedium; sr = stellate reticulum; oee = outer-enamel epithelium. Large scale bar = 50 μ m. Short scale bar = 10 μ m.

Table 1
Tooth Size of Fetuses from Alcoholized Female Mice

| Treatment group | Prenatal 16.5-day (μm) | Prenatal 18.5-day (μm) |
|-----------------|------------------------------|-------------------------------|
| Control | 1840.82 ± 37.66 | 2414.04 ± 53.25 |
| 5% | 1837.74 ± 37.79 ^a | 2406.80 ± 55.61 ^a |
| 10% | 1807.15 ± 37.75 ^a | 2368.33 ± 33.89 ^a |
| 15% | 1612.83 ± 50.91 ^b | 2027.22 ± 106.67 ^b |
| 20% | 1352.98 ± 62.36 ^b | 1733.55 ± 135.43 ^b |
| 25% | 1261.25 ± 75.16 ^b | 1471.17 ± 81.71 ^b |

Values are expressed as mean ± SD.

^aNot significant differences compared with the control group.

^bSignificantly different ($p < 0.05$) by Student's *t*-test and ANOVA.

with variable nuclear polarity and loss of cellular limits. Dental papilla showed cells with undefined and fragmented nuclei (Fig. 1E). No signs of cellular differentiation in the future preodontoblastic layer were evident. Cellular liquefaction and loss of the basement membrane were also observed (Fig. 1F). Tooth size was smaller in experimental groups consuming 15%, 20%, and 25% ethanol ($p < 0.05$) compared to experimental mice consuming 5–10% ethanol and the control group (Table 1).

Histology of Prenatal Day 18.5 Lower First Molar

Control mice showed well-developed cusps with abundant mitotic cells in the inner-enamel epithelium and nuclear polarization of preameloblasts and preodontoblasts (Fig. 2A and B). The stellate reticulum was well developed and vascularized (Fig. 2A). Enlargement of the basement membrane was observed on cusped areas (Fig. 2B). A disorganized outer-enamel epithelium was observed in mice consuming 5% ethanol. The 10% ethanol group showed shorter cusps compared to the control group, as well as cellular degeneration in the inner-enamel epithelium, cellular vacuolization in the basement membrane, altered cellular polarization in preameloblasts and preodontoblasts, and a discontinuous outer-enamel epithelium. More marked changes were observed in the 15% and 20% ethanol groups compared to the lower-ethanol groups (Fig. 2C and D). The 25% ethanol group showed delayed dental development, evidenced by a shorter tooth germ lacking cellular differentiation and an altered dental cusped pattern, compared to the control group. Numerous short cells with small nuclei were observed in the inner-enamel epithelium and dental papilla, along with fragmented cells (Fig. 2E and F). Stellate reticulum was reduced and disaggregated (Fig. 2F). No histological evidence was found of outer-enamel epithelium and dental follicle. Additionally, the same disordered undifferentiated cell pattern was observed in the lower second molar and the lower incisor. Similar to the 16.5-day fetuses, tooth size was smaller in the experimental groups consuming 15%, 20%, and 25% ethanol ($p < 0.05$) than in mice consuming 5–10% ethanol and the control group (Table 1).

Prenatal Day 16.5 EGF-R Immunostaining

As evidenced in Table 2, the control group showed light and homogeneous EGF-R staining by anti-EGF-R antibodies in the inner-enamel epithelium, outer-enamel epithelium, and dental papilla (Fig. 1A). Experimental mice con-

suming 5% ethanol showed a similar reactivity compared to the control group. The 10% and 15% ethanol groups showed an increased staining of the inner-enamel epithelium, outer-enamel epithelium, and dental papilla. The 15% and 20% ethanol groups also displayed an increased staining of the stellate reticulum and dental follicle (Fig. 1C). The 25% ethanol group showed a more intense staining of the inner-enamel epithelium, outer-enamel epithelium, dental papilla, and stellate reticulum (Fig. 1E) compared to the other experimental and control groups.

Prenatal Day 18.5 EGF-R Immunostaining

The control group presented a light staining of preameloblasts, preodontoblasts, inner-enamel epithelium, and dental papilla (Fig. 2A; Table 3). The 5% ethanol group showed nonsignificant differences compared to the control group; however, the 10% and 15% ethanol groups showed an increased staining of preameloblast, dental papilla, stratum intermedium, and outer-enamel epithelium. An increased reactivity in dental follicle and a light reactivity in preodontoblasts and stellate reticulum were also observed in the 10% ethanol group. The 15% and 20% ethanol groups showed an

Table 2
EGF-R and erbB-2 Immunoreactivity in Prenatal 16.5-Day Fetuses from Alcoholized Female Mice

| Group | Structure | EGF-R | erbB-2 |
|---------|-------------------------|-------|--------|
| Control | Dental papilla | + | + |
| | Outer-enamel epithelium | + | + |
| | Inner-enamel epithelium | + | ++ |
| | Stratum intermedium | + | ++ |
| | Stellate reticulum | - | + |
| | Dental follicle | - | +++ |
| 5% | Dental papilla | + | ++ |
| | Outer-enamel epithelium | ! | ++ |
| | Inner-enamel epithelium | + | ++ |
| | Stratum intermedium | + | ++ |
| | Stellate reticulum | - | + |
| | Dental follicle | - | +++ |
| 10% | Dental papilla | ++ | ++ |
| | Outer-enamel epithelium | ++ | ++ |
| | Inner-enamel epithelium | ++ | ++ |
| | Stratum intermedium | + | ++ |
| | Stellate reticulum | - | + |
| | Dental follicle | - | +++ |
| 15% | Dental papilla | ++ | +++ |
| | Outer-enamel epithelium | ++ | +++ |
| | Inner-enamel epithelium | ++ | ++ |
| | Stratum intermedium | ! | ! |
| | Stellate reticulum | ++ | ++ |
| | Dental follicle | + | +++ |
| 20% | Dental papilla | ++ | +++ |
| | Outer-enamel epithelium | +++ | +++ |
| | Inner-enamel epithelium | ! | + |
| | Stratum intermedium | + | +++ |
| | Stellate reticulum | ++ | + |
| | Dental follicle | + | +++ |
| 25% | Dental papilla | +++ | +++ |
| | Outer-enamel epithelium | +++ | +++ |
| | Inner-enamel epithelium | +++ | +++ |
| | Stratum intermedium | +++ | +++ |
| | Stellate reticulum | +++ | +++ |
| | Dental follicle | + | +++ |

-, negative staining; !, light staining; ++, medium staining; +++, heavy staining.

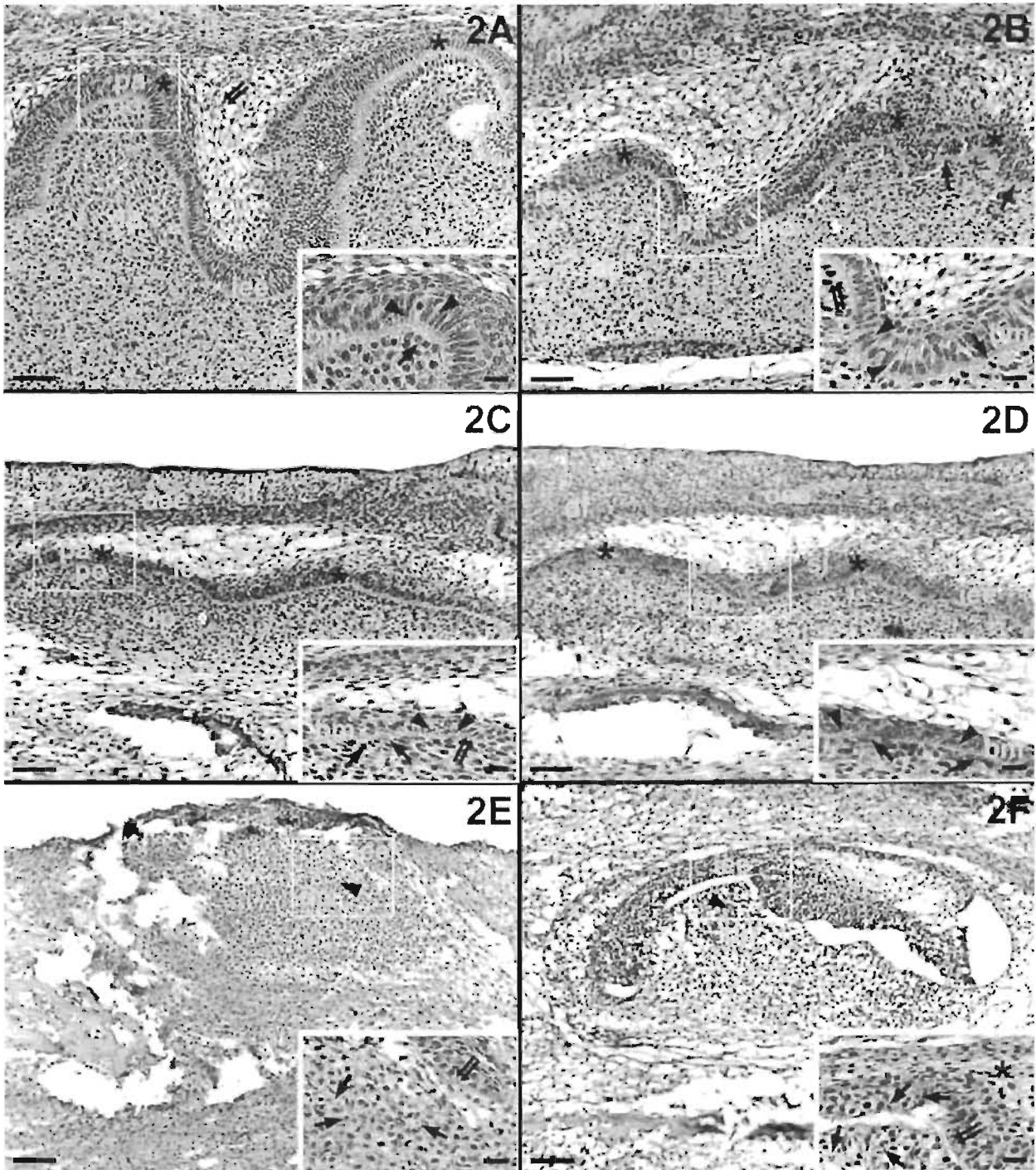


Figure 2. A,C,E: Prenatal day 18.5. EGF-R immunoreactivity. A: Control group. Polarized po (arrow) and pa (arrowhead). sr well developed (double arrow). Cusp well-developed (asterisk). Light staining in iee, pa, po, dp, and si. C: 15% ethanol group. Absence of po (arrow) and pa differentiation (arrowhead). Loss of bm (double arrow). Shorter cusps compared to the control group (asterisk). Increased staining of iee, oee, and dp. E: 25% ethanol group. Delayed dental development, evidenced by absence of histological differentiation, cellular vacuolation, hyperchromic, and pycnotic nuclei (arrow). Structures resembling iee (double arrow) and dp were observed (arrowhead). Overall strong immunoreactivity. B,D,F: Prenatal day 18.5. erbB-2 immunoreactivity. B: Control group. Well-preserved bm (arrow). Polarized po (double arrow) and pa (arrowhead). Cusp well-developed (asterisk). Mild staining of pa and po. si and sr with light staining. D: 15% ethanol group. Absence of po (arrow) and pa (arrowhead) differentiation. Shorter cusps compared to the control group (asterisk). si, iee, and dp with increased staining. F: 25% ethanol group. Structures resembling sr (asterisk), iee (double arrow) and dp (arrowhead) were observed. Numerous short cells with small nuclei were observed in the iee and dp, along with fragmented cells (arrow). Overall heavy staining. bm = basement membrane; df = dental follicle; dp = dental papilla; iee = inner-enamel epithelium; pa = preameloblast; po = preodontoblast; si = stratum intermedium; sr = stellate reticulum. Large scale bar = 50 μ m. Short scale bar = 10 μ m.

Table 3
EGF-R and erbB-2 Immunorexpression in Prenatal
18.5-Day Fetuses from Alcoholized Female

| Group | Structure | EGF-R | erbB-2 |
|---------|-------------------------|-------|--------|
| Control | Dental papilla | + | + |
| | Outer-enamel epithelium | + | + |
| | Inner-enamel epithelium | + | + |
| | Stratum intermedium | + | + |
| | Preameloblast | + | ++ |
| | Preodontoblast | + | ++ |
| | Stellate reticulum | - | + |
| 5% | Dental papilla | + | + |
| | Outer-enamel epithelium | + | + |
| | Inner-enamel epithelium | + | + |
| | Stratum intermedium | + | + |
| | Preameloblast | + | ++ |
| | Preodontoblast | + | ++ |
| | Stellate reticulum | - | + |
| 10% | Dental papilla | + | + |
| | Outer-enamel epithelium | + | + |
| | Inner-enamel epithelium | + | + |
| | Stratum intermedium | + | + |
| | Preameloblast | + | ++ |
| | Preodontoblast | + | ++ |
| | Stellate reticulum | - | + |
| 15% | Dental papilla | + | + |
| | Outer-enamel epithelium | + | + |
| | Inner-enamel epithelium | + | + |
| | Stratum intermedium | + | + |
| | Preameloblast | + | ++ |
| | Preodontoblast | + | ++ |
| | Stellate reticulum | - | + |
| 20% | Dental papilla | + | + |
| | Outer-enamel epithelium | + | + |
| | Inner-enamel epithelium | + | + |
| | Stratum intermedium | + | + |
| | Preameloblast | + | ++ |
| | Preodontoblast | + | ++ |
| | Stellate reticulum | - | + |
| 25% | Dental papilla | + | + |
| | Outer-enamel epithelium | + | + |
| | Inner-enamel epithelium | + | + |
| | Stratum intermedium | + | + |
| | Preameloblast | + | ++ |
| | Preodontoblast | + | ++ |
| | Stellate reticulum | - | + |

*, lacking histological evidence; -, negative staining; +, light staining; ++, medium staining; + + +, heavy staining.

increased staining of preodontoblasts and dental papilla (Fig. 2C). The 25% ethanol group showed an intense and homogeneous staining of anti-EGF-R antibodies in all cellular elements observed (Fig. 2E).

Prenatal Day 16.5 erbB-2 Immunostaining

The control group showed light staining of the inner-enamel epithelium, outer-enamel epithelium, and dental papilla, as well as an intense staining of dental follicle (Fig. 1B; Table 2). The 5%, 10%, and 15% ethanol groups showed a more intense staining of dental papilla, stratum interme-

dium, outer-enamel epithelium, dental follicle, and inner-enamel epithelium (Fig. 1D). An increased reactivity in the inner-enamel epithelium and dental papilla (cells adjoining the inner-enamel epithelium) was observed in the 20% and 25% ethanol groups (Fig. 1F).

Prenatal Day 18.5 erbB-2 Immunostaining

The control group showed light staining in the outer-enamel epithelium, dental papilla, stratum intermedium, preameloblasts, and preodontoblasts (Fig. 2B; Table 3). The 5% ethanol group showed nonsignificant differences compared to the control group. An increased reactivity was observed in the inner-enamel epithelium, stratum intermedium, and dental follicle in the 10% and 15% ethanol groups. The latter showed an increased staining of dental papilla (Fig. 2D). Cell immunoreactivity in the 20% and 25% ethanol groups was increased considerably (Fig. 2F).

DISCUSSION

This study showed the EGF-R and erbB-2 distribution patterns during the morphogenesis of the lower first molar in 16.5- and 18.5-day prenatal mice of mothers who consumed ethanol during pregnancy. Increased ethanol concentrations were observed to interfere with normal dental development in mouse fetuses. The 15%, 20%, and 25% ethanol groups of 16.5- and 18.5-day prenatal mice displayed an increased immunorexpression of epidermal growth factor receptors when compared with the lower doses and control groups.

Ethanol has been recognized as a teratogenic substance (Jones et al., 1973), and its fetotoxicity has been demonstrated in several animal models as a result of effects similar to those in humans (Streissguth et al., 1980; Astley et al., 1999). Chronic ethanol consumption during pregnancy leads to a number of congenital malformations. Clinical evidence of FAS include prenatal growth retardation, cranial and facial dysmorphogenesis, mental retardation, cardiac defects, hepatic anomalies, and skeletal system abnormalities (Jones et al., 1973; Habbick et al., 1998; Roebuck et al., 1998).

EGF-R and erbB-2 are transmembrane glycoproteins of 170 and 185 kDa, respectively (Lupu et al., 1992). These molecules belong to the EGF-R family, a group of receptors located on the cell membrane that initiate specific intracellular signaling pathways in response to binding to extracellular growth factors. These factors are known to play important roles in regulating mitogenesis, cell death, angiogenesis, and cell differentiation (Christensen et al., 2001). EGF-Rs consist of a cysteine-rich extracellular ligand binding site, a transmembrane lipophilic segment, an intracellular domain with tyrosine-kinase catalytic activity, and a terminal carboxyl autophosphorylation segment responsible for translating activation signals into physiological actions (Rubin and Yarden, 2001).

Proliferation, differentiation, and cellular death are indispensable biological events in the morphogenesis of diverse organs including the tooth germ (Baratella et al., 1999). Due to the essential role of EGF-Rs in craniofacial development, there is a likely relationship between them and the reported delay in maxillofacial growth, a characteristic of FAS specifically in children, as inferred from clinical reports about a reduced tooth size and faulty enamel (Clarren and Smith, 1978). Dental effects in mice exposed to ethanol in utero (delayed calcification, retarded dental eruption, and reduced immunoreactivity to EGF) have also been reported (Hernández, 1990; Hernández-Guerrero et al., 1996).

Our results revealed that immunoreactivity to EGF-R and erbB-2 was affected by ethanol concentration. We observed that dental structures of epithelial origin (inner- and outer-enamel epithelium, stratum intermedium, preodontoblasts, and preameloblasts) were mainly affected in 16.5- and 18.5-day prenatal fetuses from females consuming 15–25% ethanol, showing a reduced tooth size, absence of dental morphology, and no cellular differentiation. Thus, the 15%, 20%, and 25% ethanol groups of both ages showed increased EGF-R and erbB-2 immunoreactivity compared to the other experimental and control groups. Our results support previous findings indicating that an increased EGF is related to a reduced dental volume, and irreversibly altered cusp formation in mice molar (Thesleff et al., 1983; Partanen et al., 1985; Hu et al., 1992). Furthermore, immunostaining of the outer dental epithelium, dental papillar cells, and even mature ameloblasts have suggested a direct role of EGF-Rs in dental formation (Martineau-Doizé et al., 1991; Casasco et al., 1994). The increased immunoreactivity to both receptors used in our experimental conditions supports the hypothesis of an impaired internalization/degradation of bound EGF receptors, as suggested in fetal mouse hepatocytes exposed to ethanol (Henderson et al., 1989).

Considering the common origin of the tooth germ and many other structures affected by FAS, the former represents a suitable model to study the cellular and molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal interactions regulating the morphogenesis of many organs and tissues after ethanol exposure. Our results suggest that higher ethanol concentrations affect dental morphology and the presence of EGF receptors and that these concentrations could be associated with changes in tooth-germ cellular proliferation and differentiation in mice. Further studies are needed to show whether the increased immunoreactivity observed in our experiments is related to any interactions between ethanol and EGF-Rs, and whether these changes interfere either with the binding capacity of these receptors or in the way they occur on the cytoplasmic membrane. Dental development is a complex process that involves the interactions of diverse growth factors, hence we consider that further research is necessary to show whether some changes in glycosylation (Renau-Picheras et al., 1997) and changes in some molecules participating in growth-factor signaling pathways (Zhang et al., 1996; Zhang and Farrell, 1999), which have been observed in other cells, are also involved in the alterations observed in this study. Our preliminary histochemical results show changes in the pattern expression of some glycoconjugates. Our results suggest that the EGF-R family could play a role in the mediation of ethanol effects in mouse embryonic teeth during prenatal ethanol exposure.

ACKNOWLEDGMENT

We thank the Universidad Nacional Autónoma de México for the PhD scholarship to Dolores Jiménez Farfán.

REFERENCES

- Astley S, Magnuson S, Omnell L, Clarren S. 1999. Fetal alcohol syndrome: changes in craniofacial form with age, cognition, and timing of ethanol exposure in the Macaque. *Teratology* 59:163–172.
- Baratella L, Arana V, Katchburian E. 1999. Apoptosis in the early involuting stellate reticulum of rat molar tooth germs. *Anat Embryol (Berl)* 200:49–54.
- Casasco A, Casasco M, Corbett L, Calligaris A. 1994. Expression of c-erbB-2 proto-oncogene encoded protein (p185^{erbB-2}) in functional rat ameloblasts. *Arch Oral Biol* 39:917–919.
- Christensen JG, Schreck RE, Chan F, et al. 2001. High levels of HER-2 expression alter the ability of epidermal growth factor receptor (EGF-R) family tyrosine kinase inhibitors to inhibit EGF-R phosphorylation in vivo. *Clin Cancer Res* 7:4230–4238.
- Clarren S, Smith D. 1978. The fetal alcohol syndrome. *N Engl J Med* 298:1063–1067.
- De Potter C, Van Daele S, van de Kerckhove D, Roels H. 1989. The expression of the neu oncogene product in breast lesions and in normal fetal and adult human tissues. *Histopathology* 15:351–362.
- Habbick B, Blakley P, Houston S, et al. 1998. Bone age and growth in fetal alcohol syndrome. *Alcohol Clin Exp Res* 22:1312–1316.
- Henderson G, Baskin G, Horbach J, et al. 1989. Arrest of epidermal growth factor-dependent growth in fetal hepatocytes after ethanol exposure. *J Clin Invest* 84:1287–1294.
- Hernández J. 1990. Morphologic effects on maternal ethanol intake on skull, mandible and tooth of the offspring in mice. *Jpn J Oral Biol* 32:460–469.
- Hernández-Guerrero JC, Portilla Robertson J, Ledezma Montes C, et al. 1996. Immunorexpression of epidermal growth factor in odontogenesis of the offspring of alcoholic mice. *Bol Estud Med Biol* 44:25–30.
- Hu CC, Sakakura Y, Sasano Y, et al. 1992. Endogenous epidermal growth factor regulates the timing and pattern of embryonic mouse molar tooth morphogenesis. *Int J Dev Biol* 36:505–516.
- Jones K, Smith D, Ulleland C, Streissguth A. 1973. Pattern of malformation in offspring of chronic alcoholic mothers. *Lancet* 1:1267–1274.
- Kaufman M. 1995. The atlas of mouse development. Great Britain: Academic Press. pp. 5–8.
- Kokai Y, Cohen J, Drebin J, Greene M. 1987. Stage and tissue specific expression of the neu oncogene in rat development. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:8498–8501.
- Lupu R, Colomer R, Kannan B, Lippman M. 1992. Characterization of a growth factor that binds exclusively to the erbB-2 receptor and induces cellular responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:2287–2291.
- Martineau-Doizé B, Warshawsky H, Dickson K, et al. 1991. Localization of epidermal growth factor receptors in cells of the enamel organ of the rat incisor. *Dev Biol* 148:590–601.
- Mercola M, Stiles CD. 1988. Growth factor superfamilies and mammalian embryogenesis. *Development* 102:451–460.
- Partanen A, Ekblom P, Thesleff I. 1985. Epidermal growth factor inhibits morphogenesis and cell differentiation in cultured mouse embryonic teeth. *Dev Biol* 111:84–91.
- Partanen A, Thesleff I. 1987. Localization and quantitation of ¹²⁵I-Epidermal growth factor binding in mouse embryonic tooth and other embryonic tissues at different developmental stages. *Dev Biol* 120:186–197.
- Quirke P, Pickles A, Tuzi N, et al. 1989. Patterns expression of c-erbB-2 oncoprotein in human fetuses. *Br J Cancer* 60:64–69.
- Renau-Picheras J, Miragall F, Gerri C, Bagueña-Cervellera R. 1997. Prenatal alcohol exposure affects galactosyltransferase activity and glycoconjugates in the Golgi apparatus of fetal rat hepatocytes. *Hepatology* 25:343–350.
- Roebuck T, Mattson S, Riley E. 1998. A review of the neuroanatomical findings in children with fetal alcohol syndrome or prenatal exposure to ethanol. *Alcohol Clin Exp Res* 22:339–344.
- Rubin J, Yarden Y. 2001. The basic biology of HER2. *Ann Oncol* 12:53–58.
- Streissguth A, Landesman-Dwyer S, Martin J, Smith D. 1980. Teratogenic effects of alcohol in humans and laboratory animals. *Science* 209:353–361.
- Tanikawa Y, Bawden J. 1999. The immunohistochemical localization of phospholipase C γ and the epidermal growth-factor, platelet-derived growth-factor and fibroblast growth-factor receptors in the cells of the rat molar enamel organ during early amelogenesis. *Arch Oral Biol* 44:771–780.
- Thesleff I, Ekblom P, Keski-Oja J. 1983. Inhibition of morphogenesis and stimulation of vascular proliferation in embryonic tooth cultures by a sarcoma growth factor preparation. *Cancer Res* 43:5902–5909.
- Thesleff I, Partanen A, Rihliniemi L. 1987. Localization of epidermal growth factor receptors in mouse incisors and human premolars during eruption. *Eur J Orthod* 9:24–32.
- Thesleff I, Vaahokari A, Partanen A. 1995. Regulation of organogenesis: common molecular mechanisms regulating the development of teeth and other organs. *Int J Dev Biol* 39:35–50.
- Topham R, Chiego D, Gattone V, et al. 1987. The effect of epidermal growth factor on neonatal incisor differentiation in the mouse. *Dev Biol* 124:532–543.
- Zhang B, Horsfield B, Farrell G. 1996. Chronic ethanol administration to rats decreases receptor-operated mobilization of intracellular ionic calcium in cultured hepatocytes and inhibits 1,4,5-inositol trisphosphate production: relevance to impaired liver regeneration. *J Clin Invest* 98:1237–1244.
- Zhang BH, Farrell G. 1999. Chronic ethanol consumption disrupts complexation between EGF receptor and phospholipase C- γ_1 : relevance to impaired hepatocyte proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 257:89–94.

Alteration of the Sialylation Pattern of the Murine Tooth Germ after Ethanol Exposure

Dolores Jiménez-Farfán,¹ Jorge Guevara,² Edgar Zenteno,³ and Juan Carlos Hernández-Guerrero^{1*}

¹Laboratorio de Inmunología, División de Estudios de Posgrado e Investigación (DEPeI), Facultad de Odontología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México

²Laboratorio de Enfermedades Neurodegenerativas, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Ciudad de México, México

³Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México

Received 18 May 2005; Revised 6 July 2005; Accepted 21 July 2005

BACKGROUND: Ethanol consumption during pregnancy leads to changes in murine dental morphogenesis, dental size, cellular differentiation, enamel mineralization, and delayed eruption. It has been proposed that glycoproteins play a role during embryonic dental development that may determine the dental morphological pattern and extracellular matrix secretion. O-glycosylation and sialylation appear to actively participate in the differentiation and maturation processes. Because glycosylation may be affected by teratogens that can alter the maturation of several organisms, in this work we describe the main modifications of the sialylation pattern in prenatal day (PD) 18.5 murine tooth germs exposed to ethanol. **METHODS:** Pregnant female mice were divided into groups that were given 15% or 20% ethanol solutions, or water as a control. The histochemistry of tooth germs from PD 18.5 fetuses was revealed with lectins specific for sialic acid (Neu5Ac), such as *Sambucus nigra* (SNA), *Maackia amurensis* (MAA), and *Machrobrachium rosenbergii* (MRL), and for sialylated-O-glycosidically linked glycans, such as *Amaranthus leucocarpus* (ALL). **RESULTS:** The basement membrane, preameloblasts, inner-enamel epithelium, preodontoblasts, and subodontoblastic cells of the test groups showed changes in labeling according to the 4 lectins used. Intranuclear staining was observed with SNA (specific for Neu5Ac α 2,6Gal/GalNAc) in the control group, but this was reduced in the test groups. The nuclei of dental papillary cells under the experimental conditions were stained with MAA (Neu5Ac α 2,3Gal). **CONCLUSIONS:** Dental development involves different types of sialylated O-glycosidically linked glycans that are likely to regulate cell-to-cell and cell-to-matrix interactions. Our results suggest that ethanol consumption during pregnancy alters the sialylation pattern during murine dental morphogenesis. *Birth Defects Research (Part A) 73: 000–000, 2005.* © 2005 Wiley-Liss, Inc.

AQ:1

AQ:1

Key words: sialylation; ethanol; odontogenesis; lectin histochemistry

INTRODUCTION

The cell surface is covered with glycoproteins and glycolipids that vary significantly among cell types and different stages of mammalian development, and contribute to homeostasis in an organism (Miosge et al., 1998; Jiménez-Martínez et al., 2002). Glycosylation is a co- and post-translational modification of proteins that consists of carbohydrates being assembled through diverse glycosyltransferases that are present in the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus (Yarema and Bertozzi, 2001). Because of their specificity for well defined saccharidic structures, lectins have been used to identify modifications in glycosylation (Lis and Sharon, 1998; Peumans and Van Damme, 1998; Nilsson, 2003). Changes in sugar moieties occur during normal embryonic and fetal development

(Miosge et al., 1998; Gheri et al., 2000). These changes have also been observed during craniofacial and dental development (Tanikawa and Bawden, 1999; Wise et al., 2002; Yamamoto et al., 2003). It has been suggested that dental morphogenesis, growth, cytodifferentiation, and dentin and enamel-matrix formation are all regulated by diverse

AQ:2

Grant sponsor: Procter & Gamble Co.; Grant number 2004057; Grant sponsor: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT); Grant number G38590N.

*Correspondence to: Juan Carlos Hernández Guerrero, Laboratorio de Inmunología, DEPeI, Facultad de Odontología, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Institutos s/n, Ciudad Universitaria, México D.F. C.P. 04510. E-mail: jcarlos@servidor.unam.mx

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/bdra.20198

glycoconjugates of the tooth germ (Partanen and Thesleff, 1987; Thesleff et al., 1995).

Sialylation is a complex process that is regulated by Golgi type II transmembrane glycosyltransferases. These enzymes have been identified in both human and murine genomes (Harduin-Lepers et al., in press). Sialic acids influence the cellular enzymatic and receptor functions during tissue proliferation and differentiation. This recognition determines the intercellular communication and cell-to-extracellular matrix interactions. Changes in the expression of specific sialic acids during differentiation may be useful markers for the degree of cell maturation (Sierra et al., 2001; Cerna et al., 2002). Changes in glycosylation have been observed in some congenital diseases (Aebi and Hennen, 2001; Martin-Rendon and Blake, 2003) and pathological processes, such as Alzheimer disease (Guevara et al., 1998), prion protein disease (Rudd et al., 2002), and cancer (Dennis et al., 1999).

Some glycoproteins have been shown to be affected by prenatal ethanol exposure (Gottesfeld et al., 1990; Vallés et al., 1994; Singh et al., 1996; Miñana et al., 2000; Climent et al., 2002; Moore et al., 2004). Furthermore, ethanol is likely to affect the maturation of neural structures (Noronha and Druse, 1982; Gnaedinger and Druse, 1984). Gestational exposure to ethanol is associated with various physical alterations, such as a dysfunctional central nervous system, growth impairment, and a number of facial anomalies known as fetal alcohol syndrome (FAS) (Jones et al., 1973; Gir et al., 1989). Clinical dentofacial analyses showed reduced tooth size and poor enamel development in children with FAS (Clarren and Smith, 1978). Delayed calcification and dental eruption in mice have been reported in offspring exposed to ethanol in utero (Hernández, 1990). Additionally, ethanol has been shown to significantly affect the size and morphology of the tooth germ (Matthiessen and Romert, 1988; Hernández, 1990) and to trigger changes in the expression of some dental glycoproteins (Hernández et al., 1996; Jiménez-Farfán et al., 2005).

In this study we use lectins with well known sugar specificity to identify differences in the sialylation pattern in tooth germs of prenatal day (PD) 18.5 mice in an effort to understand the dysmorphogenesis and tissular dental changes observed in mice exposed to ethanol.

MATERIALS AND METHODS

This study was approved by the Ethics Committee of the Facultad de Odontología, Universidad Nacional Autónoma de México. The maximum tolerated dose in this study was 20% ethanol. Mice that refused to consume ethanol during the course of the experiment were excluded.

Fifteen 8-week-old (21–23 g) virgin female Balb/c mice were randomly assigned to 2 groups that consumed ethanol at different concentrations ($n = 10$; 5 mice in each test group), plus a control group of mice that consumed water ($n = 5$) ad libitum. Animals were fed with standard laboratory food and kept at controlled temperature and 12-hr light/12-hr dark cycles during the experiment. Ethanol concentrations in water used in this experiment were 15% and 20% (absolute anhydrous ethyl alcohol; Mallinckrodt Baker, Mexico City, Mexico). In all groups, ethanol and water were administered in 150-ml plastic bottles provided with a tip to minimize leakage and evaporation. Experimental females were gradually introduced to ethanol

through a daily increase in concentration until the assigned level was reached. Then from that point on, 13 weeks were counted for each treatment group. Afterwards, female mice were allowed to mate during a 24-hr period, and the presence of a vaginal plug was considered as embryonic day (ED) 0.5 (Kaufman, 1995). Ethanol consumption continued during pregnancy until the fetuses were removed. Pregnant mice were weighed and observed daily throughout the experiment to monitor toxicity.

Tooth-Germ Samples

Pregnant Balb/c mice were euthanized by ethyl ether inhalation and killed by cervical dislocation. The fetuses were removed and killed by decapitation. PD 18.5 fetuses were processed from each treatment group. We obtained the heads from each treatment group to analyze dental ethanol effects. The heads were fixed in 4% paraformaldehyde added with 0.1 M PBS, pH 7.4, for 24 hr. They were then dehydrated, cleared, and embedded in paraffin. Sections (4 μm thick) were sliced for histochemistry assays.

Histochemistry

Binding to *Sambucus nigra* agglutinin (SNA, specific for Neu5Ac α 2,6Gal/GalNAc), *Maackia amurensis* agglutinin (MAA, specific for Neu5Ac α 2,3Gal) (both from E-Y Laboratories, San Mateo, CA), *Macrobrachium rosenbergii* lectin (MRL, specific for Neu5,9Ac) (Vázquez et al., 1993), and *Amaranthus leucocarpus* lectin (ALL, specific for Neu5Ac/Gal β 1,3GalNAc-Ser/Thr) (Zenteno et al., 1992) was done using the sections previously sliced for histochemistry. Sections were washed twice in 0.1 M PBS-Ca, pH 7.4 for 5 min, and lectins diluted in 0.1 M PBS-Ca, pH 7.4 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) were applied for 2 hr at 37°C. The sections were thoroughly rinsed with PBS-Ca before they were incubated for 1 hr at 37°C in ExtrAvidin-FITC (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO; dilution 1:100) followed by 2 5-min rinses in 0.1 M PBS, pH 7.4. Finally, the samples were mounted with Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA). The specificity of the lectin staining was confirmed through negative labeling using lectins previously incubated with 200 mM of each lectin-specific sugar.

Double Labeling

A trophic factor (EGF-R antibody) was used as a control to show that differences in the lectin pattern were associated with changes in a glycoprotein that is important for dental development, as previously reported (Jiménez-Farfán et al., 2005). To avoid recognition of the growth-factor receptor antibody by lectins, the samples were first incubated with lectins as described above. After incubation for 1 hr at 37°C in ExtrAvidin-FITC (dilution 1:100), some samples were incubated overnight at 4°C with the rabbit polyclonal EGF-R antibody (sc-03, 1:300 dilution) obtained from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA). The samples were washed in 0.1 M PBS, pH 7.4, for 5 min. Lissamine-rhodamine conjugated-affinity purified goat anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Canada) was applied for 1 hr at room temperature as a secondary antibody to EGF-R. The samples were mounted with Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA). A semiquantitative method to describe lectin staining was used. Scores were assigned by microscopic inspection, and labeling levels were denoted as follows: \pm (some cells with

labeling), + (slight labeling), ++ (moderate labeling), and +++ (intense labeling).

Immunofluorescence Analysis

Single-labeled slides were analyzed with a Leica DMLS microscope (Leica, Bensheim, Germany) equipped with a fluorescence illumination system. Using 20x and 100x oil-immersion objective lenses, images were captured using the Leica IM1000 program (FITC A = 492; E = 520).

Confocal Analysis

Double-labeled slides were analyzed with an inverted Nikon microscope equipped with epi-illumination and a Bio-Rad (Bio-Rad, Mexico City, Mexico) laser confocal system. Images were collected with a 40x objective lens. Images were captured in 2 channels (green for FITC and red for Lissamine-rhodamine). Images were merged using the Confocal Assistant 4.02. In the merged image, a yellow color was interpreted as a colocalization between the 2 markers.

RESULTS

Table 1 shows the mean labeling observed for the 4 lectins used in our study. Reactivity to the lectins in the control group was observed as follows: The control group showed reactivity with *Sambucus nigra* lectin (SNA, specific for Neu5Ac α 2,6Gal/GalNAc) in the preameloblasts (apical cytoplasm) and preodontoblasts, especially in the cusped areas (Figs. 1A and 2A). Cells of dental papilla (subodontoblastic layer), stratum intermedium, stellate reticulum, and basement membrane were also labeled with SNA (Figs. 1A and 2A). The dental papilla also showed intranuclear labeling, and some papillary cells, subodontoblastic cells, and preodontoblasts showed colocalization to SNA and EGF-R (Fig. 2A). The preodontoblasts showed stronger reactivity to *Maackia amurensis* lectin (MAA, specific for Neu5Ac α 2,3Gal) compared to SNA in the control group (Fig. 1A and C). Although dental papilla showed slight MAA labeling, some subodontoblastic cells displayed stronger reactivity compared to the other cells of dental papilla (Fig. 1C). Colocalization to MAA and EGF-R was observed in some preameloblasts, preodontoblasts, and dental papilla in the control group (Fig. 2C). The control group showed intense cytoplasmic labeling in the preameloblasts when *Machrobrachium rosenbergii* (MRL, specific for Neu5,9Ac) was applied (Figs. 1E and 2E). The preodontoblastic cells showed moderate MRL staining (Figs. 1E and 2E). *Amaranthus leucocarpus* lectin (ALL, specific for Neu5Ac/Gal β 1,3GalNAc-Ser/Thr) was observed in the inner-enamel epithelium, basement membrane, and preameloblastic cells (Fig. 1G). Also, dental papilla showed numerous positive cells and increased labeling in the subodontoblastic layer (specifically in areas of cusp growth; Fig. 1G). The stellate reticulum, outer-enamel epithelium, and dental papilla showed colocalization to EGF-R and ALL (Fig. 2G).

The 15%- and 20%-ethanol groups showed similar lectin patterns (Table 1). Thus, the lectin pattern described here corresponds to both test groups, as follows: SNA staining was observed in the basal area of the inner-enamel epithelium. The basement membrane showed slight labeling with SNA (Fig. 1B). The subodontoblastic cells showed slighter SNA staining compared to the control group (Fig.

Table 1
Lectin Labeling of Dental Structures of 18.5-day Fetuses from Alcohol-Exposed Pregnant Female Mice

| | Control group | 15% ethanol group | 20% ethanol group |
|--|---------------|-------------------|-------------------|
| SNA (<i>Sambucus nigra</i>) | | | |
| Dental papilla | ++ | + | + |
| Outer-enamel epithelium | + | ± | ± |
| Inner-enamel epithelium | ++ | ++ | ++ |
| Stratum intermedium | ++ | ++ | ++ |
| Preameloblast | +++ | + | + |
| Preodontoblast | ++ | ± | ± |
| Basement membrane | +++ | + | + |
| Stellate reticulum | ++ | ± | ± |
| MAA (<i>Maackia amurensis</i>) | | | |
| Dental papilla | + | + | + |
| Outer-enamel epithelium | +++ | ++ | ++ |
| Inner-enamel epithelium | ++ | + | + |
| Stratum intermedium | ++ | + | + |
| Preameloblast | +++ | + | + |
| Preodontoblast | ++ | + | + |
| Basement membrane | + | ± | ± |
| Stellate reticulum | + | + | + |
| MRL (<i>Machrobrachium rosenbergii</i>) | | | |
| Dental papilla | ++ | + | + |
| Outer-enamel epithelium | ++ | + | + |
| Inner-enamel epithelium | ++ | + | + |
| Stratum intermedium | ++ | + | + |
| Preameloblast | +++ | + | + |
| Preodontoblast | ++ | ± | ± |
| Basement membrane | ++ | ± | ± |
| Stellate reticulum | ± | + | + |
| ALL (<i>Amaranthus leucocarpus</i>) | | | |
| Dental papilla | ++ | +++ | +++ |
| Outer-enamel epithelium | + | + | + |
| Inner-enamel epithelium | ++ | + | + |
| Stratum intermedium | + | ++ | ++ |
| Preameloblast | +++ | + | + |
| Preodontoblast | ++ | ± | ± |
| Basement membrane | ++ | ± | ± |
| Stellate reticulum | + | + | + |

±, only some cells showed labeling; +, slight labeling; ++, moderate labeling; +++, intense labeling.

1A and B). Cells of the stratum intermedium associated with the cusped area displayed SNA staining (Fig. 1B and 2B). The stellate reticulum was scarce and showed poorer reactivity to SNA compared to the control group (Fig. 1A and B). Colocalization to SNA and EGF-R was observed in the preameloblasts, dental papilla, inner-enamel epithelium, and stratum intermedium (Fig. 2B). Nevertheless, all dental structures showed increased EGF-R staining compared to that of the control group (Fig. 2A and B). The preodontoblasts showed reduced MAA labeling compared to that of the control group (Fig. 1C and D). The stratum intermedium and stellate reticulum showed some cells positive for EGF-R and MAA (Fig. 2D). The dental papilla showed EGF-R staining in the cytoplasm and labeling to MAA in the nucleus (Fig. 2D). The inner-enamel epithelium showed labeling to MAA and EGF (Fig. 2D). A light reduction of MRL labeling was observed in dental papilla compared to the control group, and colocalization was observed in the test groups (Fig. 2F). The inner-enamel epithelium and subodontoblastic cells showed slight and

AQ: 13

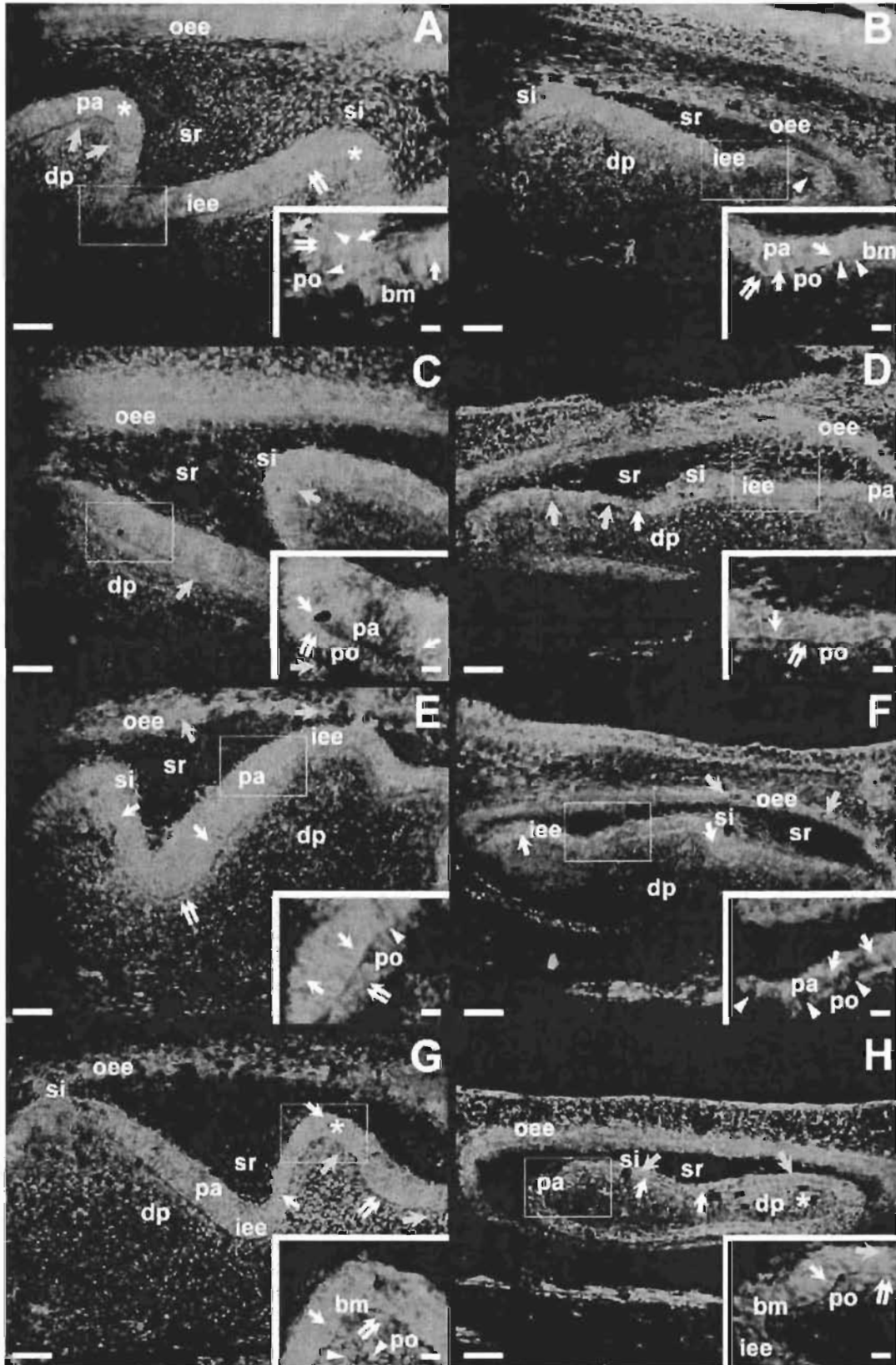


Figure 1.

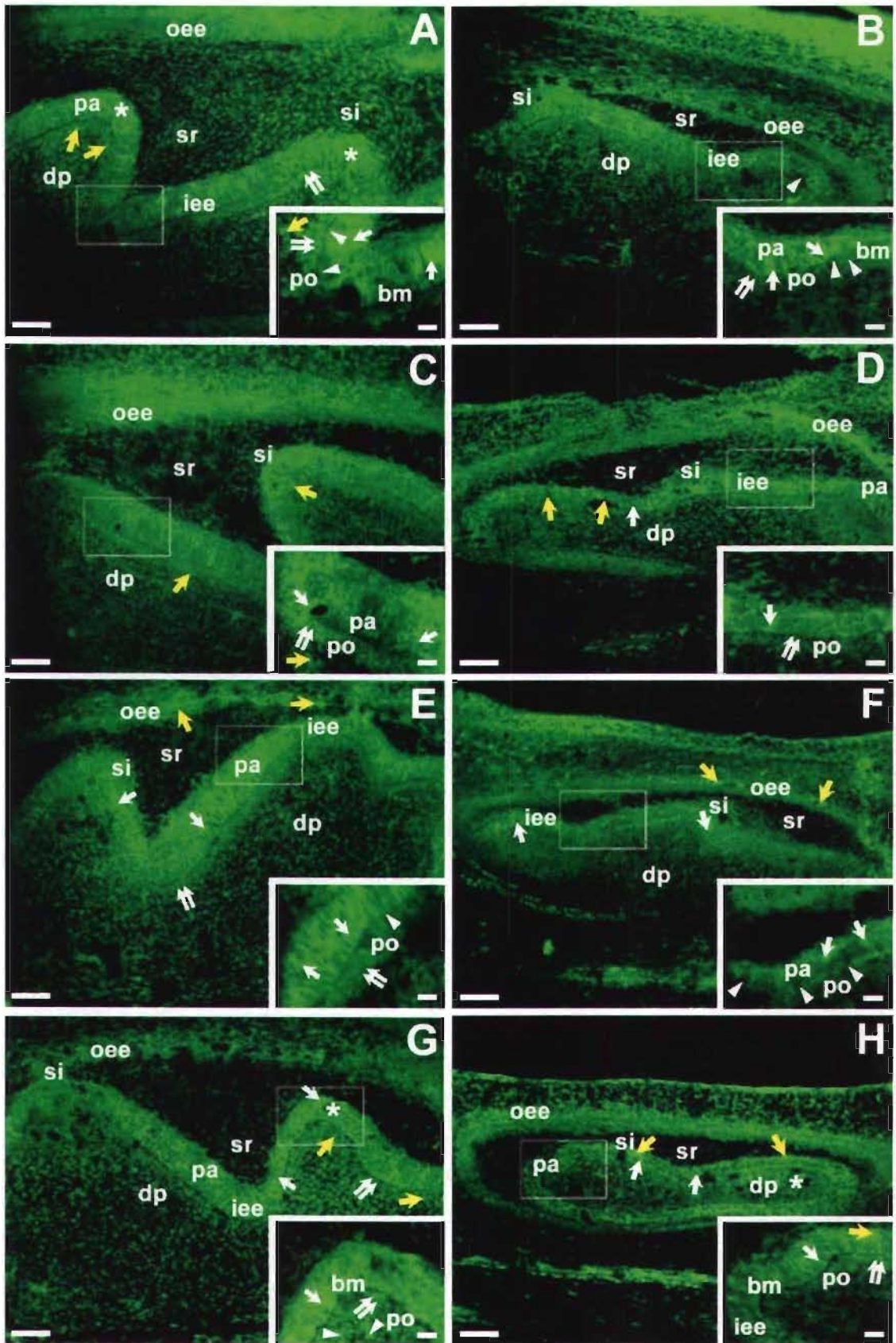


FIGURE 1

homogeneous MRL staining (Fig. 1F). However, some inner-enamel epithelial cells displayed the strongest MRL staining in the test groups (Fig. 1F). The outer-enamel epithelium showed slight staining compared to the control group (Fig. 1E and F). All dental structures showed labeling to EGF-R and MRL in the test groups (Fig. 2F). A lower number of inner-enamel epithelial cells were labeled with ALL compared to the control group (Fig. 1G and H). The stratum intermedium showed some cells with a moderate reactivity to ALL (Fig. 1H). Cells of the dental papilla showed an increased staining to ALL compared to the control group (Fig. 1H and 2H). Diverse areas of ALL and EGF-R reactivity were observed in all dental structures, especially in the inner-enamel epithelium, stratum intermedium, stellate reticulum, outer-enamel epithelium, and dental papilla (Fig. 2H).

DISCUSSION

In this study we used lectins to describe the distribution of sialic acid and sialylated O-glycosidic sialic acids

(Neu5Ac α 2,3Gal/GalNAc, Neu5Ac α 2,6Gal/GalNAc, and Neu5,7,9Ac) and Neu5Ac/Gal β 1,3GalNAc, expressed in the morphogenesis of the lower first molar in PD 18.5 mice of mothers that consumed ethanol during pregnancy. Previous studies of dental structures that used lectin histochemistry showed increased sialic acids, acetyl-glucosamine, α -D-mannose, and α -D-glucose in the basement membrane, odontoblasts, and ameloblasts during the differentiation process (Meyer et al., 1981; Jowett et al., 1994; Lemus et al., 1996, 1997), as well as during postnatal stages (radicular formation and secretion of cementum) (Sasano et al., 1992).

Glycosylation of proteins is an enzymatic co- and post-translational process that takes place mainly in the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus (Lis and Sharon, 1993). Glycoconjugates (glycoproteins or glycolipids) participate in important cellular functions associated with normal development, growth, communication, and survival (Jürgen, 1987; Hennet and Ellies, 1999). Abnormalities in the expression of O-glycans are related to a number of biological functions that become altered in certain disorders, such as neurodegenerative diseases, immunological responses, and neoplasms (Guevara et al., 1998; Jiménez-Martínez et al., 2002).

Glycoconjugates that contain sialic acids have been of particular interest in development studies. Sialic acid belongs to a family of 9-carbon carboxylated sugars that are usually found at the outermost portions of vertebrate oligosaccharides. The most common sialic acid is Neu5Ac, which may be considered the precursor of all other sialic acids. Diversity in sialic acids is generated by the glycosidic linkage at carbon 2, which results in most animals in Neu5Ac α 2,3 or α 2,6 linkages of hydroxyl groups of galactose, or the 6-hydroxyl group of GlcNAc or GalNAc residues (Schauer, 1982). Because of their terminal position in the oligosaccharidic side chain, a likely role has been suggested for them in cell-to-cell interactions, as well as a potential role as receptors of various recognition molecules in the surface of several different embryonic cells (Fazel et al., 1989).

Our study shows that the inner-enamel epithelium, preameloblasts, preodontoblasts, and basement membrane were labeled with SNA, MAA, MRL, and ALL in the control group. Their distribution varied between the cytoplasm and the nucleus, and was also related to the cell differentiation stage. Therefore, dental papilla (mesenchymal origin) was poorly reactive to MAA, which recognizes Neu5Ac α 2,3Gal/GalNAc. These findings suggest that the Neu5Ac α -2,6Gal/GalNAc expression may be more involved in cell differentiation than Neu5Ac α 2,3Gal/GalNAc, as previously shown in studies of colon carcinoma (Dall'Olio et al., 1996) and various human and rat tissues (Kaneko et al., 1995). In the control group, areas that had stronger labeling in relation to the different lectins were preameloblasts, preodontoblasts, and cells close to the basement membrane (subodontoblastic layer) or associated with the cusped areas. An interesting substitution of a sialic acid (9-O-acetyl sialic acid) that is identified by the lectin from freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (Vázquez et al., 1993) was observed mainly in preameloblasts and preodontoblasts in the control group. The presence of this residue was reduced significantly in the inner-enamel epithelium and dental papilla of test groups. Nevertheless, the lectin ALL, which recognizes sialylated

AQ: 30

Figure 1. A and B: *Sanbicus nigra* (SNA: Neu5Ac α 2,6Gal/GalNAc-). A: Control group. Moderate and intense labeling was observed in preodontoblasts (po, double arrow) and preameloblasts (pa, white arrow), respectively. Stronger reactivity was associated with preodontoblasts and preameloblasts in the cusped area (*). Cells of the dental papilla (dp) were moderately stained (yellow arrows). Also, the basement membrane (bm) (arrowhead) was intensely stained. B: 20% ethanol group. Reduced labeling was observed in preodontoblasts (po, double arrow), preameloblasts (white arrow), and the basement membrane (arrowhead). Poor reactivity and scarce stellate reticulum (sr) were evident. C and D: *Maackia amurensis* (MAA: Neu5Ac α 2,3Gal-). C: Control group. Intense and moderate labeling is seen in the preameloblasts (pa, white arrow) and preodontoblasts, (po, double arrow), respectively. Light labeling was observed in the dental papilla (dp). Cells of the dental papilla close to the preodontoblasts (subodontoblastic layer, yellow arrow) showed stronger reactivity than the other cells of the dental papilla. D: 20% ethanol group. Slight labeling was observed in the inner-enamel epithelium (iee, white arrow). Reduced reactivity in the inner-enamel epithelium was evident where the basement membrane was lost (yellow arrow). Cells of the dental papilla adjoining the inner-enamel epithelium were poorly stained (double arrow). E and F: *Macrobrachium rosenbergii* (MRL: Neu5,9Ac-). E: Control group. Preameloblasts (pa, white arrow) showed strong staining; the inner-enamel epithelium (iee) and the preodontoblasts (po, double arrow) showed moderate staining. The outer-enamel epithelium (oee) showed moderate reactivity (yellow arrow). F: 20% ethanol group. Poor labeling is seen in the basement membrane (bm) where membrane integrity was lost (arrowhead). Some of the inner-enamel epithelial cells stained more strongly than others (white arrow). Somewhat reduced staining was observed in the outer-enamel epithelium (yellow arrow) than in the control group, in which more positive cells were seen. G and H: *Amaranthus leucocarpus* (ALL: Neu5Ac/Gal β 1,3GalNAc-Ser/Thr-). G: Control group. The preameloblasts (pa, white arrow) showed more reactivity specifically on cusped areas (asterisk). Similar staining was observed in cells of the dental papilla (dp, arrowhead) and the preodontoblasts (po, double arrow). Also, increased labeling in areas closed to the preodontoblasts (subodontoblastic layer) (yellow arrow) was evident. H: 20% ethanol group. Some of the inner-enamel epithelial cells (iee) showed slight labeling (white arrow). The stratum intermedium (si, yellow arrow) had cells with increased staining compared to the control group. Some cells of the dental papilla showed stronger reactivity compared to the other papillary cells (asterisk). Large scale bar = 50 μ m. Short scale bar = 10 μ m.

AQ: 14

AQ: 15

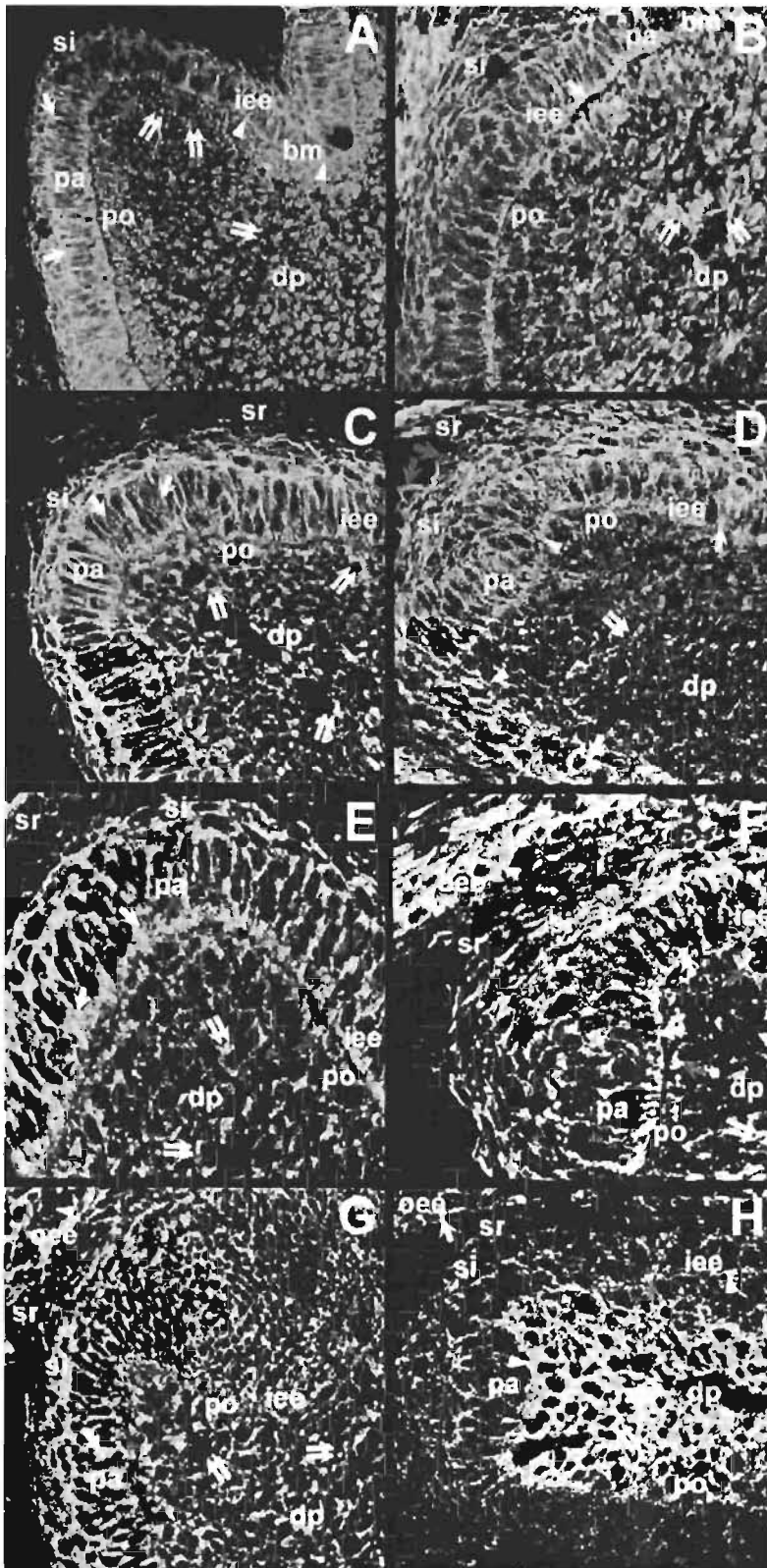


Figure 2. Lectins were marked with FITC (green) and EGF-R with Lissamine-rhodamine (red). Colocalization is shown in yellow. **A and B:** SNA/EGF-R. **A:** Control group. Colocalization was observed in some cells of the dental papilla (dp, double arrow) and preodontoblasts (po, red arrow). The preameloblasts (pa, white arrow) and basement membrane (bm, arrowhead) showed the strongest labeling. **B:** 20% ethanol group. The dental papilla (dp, double arrow), inner-enamel epithelium (iee, white arrow) and preodontoblasts, (po, red arrow) showed numerous cells with colocalization. Labeling with EGF-R was increased in the dental papilla, inner-enamel epithelium, and stratum intermedium (si). **C and D:** MAA/EGF-R. **C:** Control group. Cells of the dental papilla (dp, double arrow) and preodontoblasts (po, red arrow) showed colocalization. Also, the preameloblasts (pa, white arrow) showed colocalization and specific zones recognized by EGF-R. **D:** 20% ethanol group. Colocalization was observed in the inner-enamel epithelium (iee, white arrow). The dental papilla showed cytoplasmic and nuclear staining to EGF-R and MAA, respectively. The basement membrane, (arrowhead), stratum intermedium, and stellate reticulum (red arrow) showed strong labeling to EGF-R. **E and F:** MRI/EGF-R. **E:** Control group. Lectin labeling was predominant in this group. Preodontoblasts (po, red arrow) and dental papilla (dp, double arrow) showed moderate staining. The preameloblasts (pa, white arrow) showed strong labeling to MRI. **F:** 20% ethanol group. Colocalization was observed in outer-enamel epithelium (oee, arrowhead), inner-enamel epithelium (iee, white arrow), dental papilla (dp, double arrow), and some preodontoblasts (po, red arrow). Also, the inner-enamel epithelium, stellate reticulum (sr), and stratum (si) showed areas with increased staining to EGF-R. **G and H:** ALL/EGF-R. **G:** Control group. Predominant lectin staining was observed. Colocalization was observed in some cells of the stellate reticulum (sr, red arrow), dental papilla (dp, double arrow), and outer-enamel epithelium (oee, arrowhead). **H:** 20% ethanol group. Colocalization was observed in the dental papilla (double arrow), the inner-enamel epithelium (iee, red arrow), basement membrane (bm, arrowhead), and outer-enamel epithelium (white arrow).

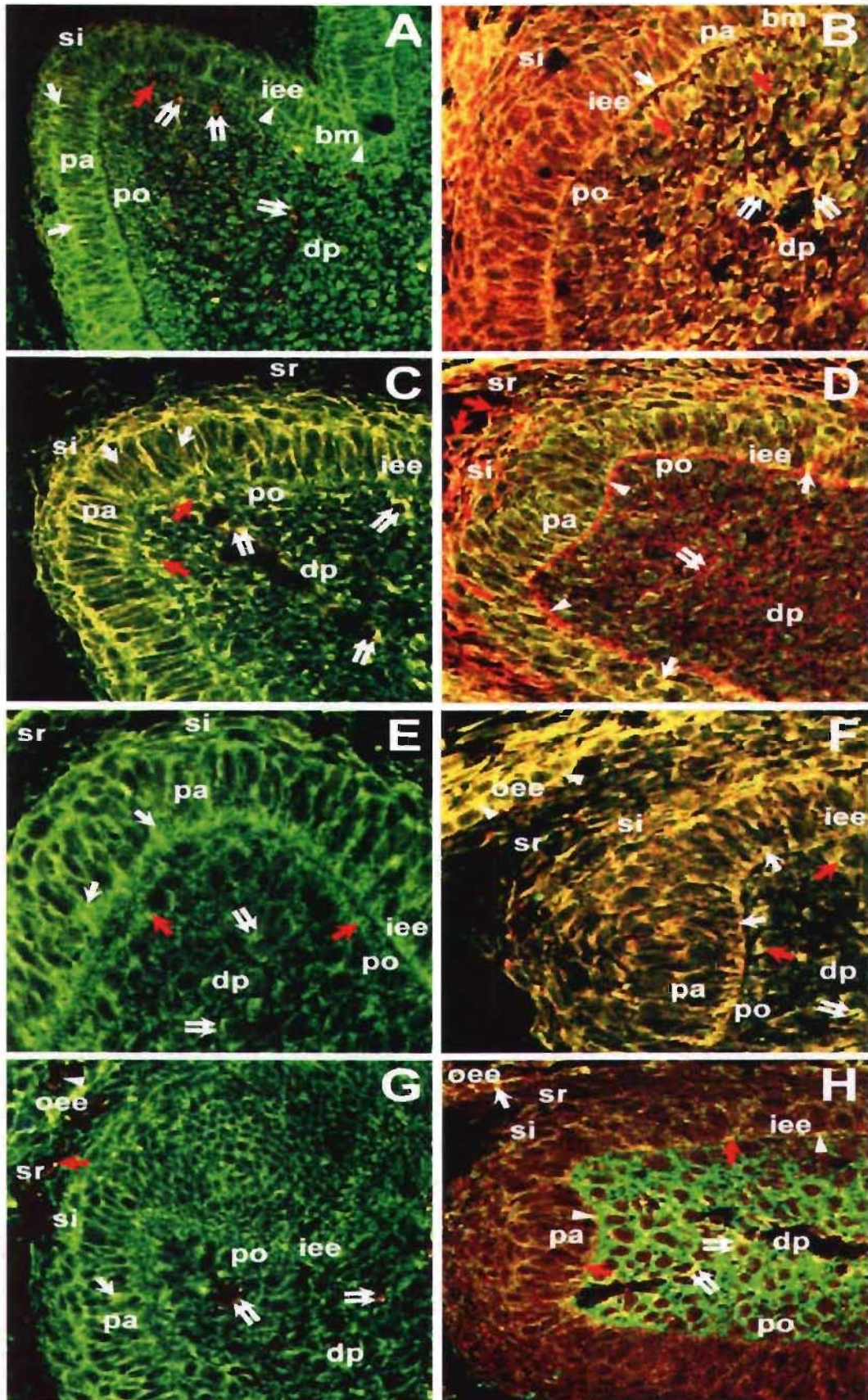


FIGURE 2

O-glycosidically linked glycans (Neu5Ac/Gal β 1,3GalNAc-Ser/Thr) in specific protein backbones (Zenteno et al., 1992), showed reduced labeling in the inner-enamel epithelial cells and areas with increased reactivity in the dental papilla under the experimental conditions. These results suggest that only some sialic acids are necessary for adequate functioning of dental papilla and inner-enamel epithelium, but the efficient expression of these sugar types is necessary in cells with the potential to differentiate into preodontoblasts or preameloblasts. Our experiments showed that preodontoblasts and preameloblasts associated with the cuspids were principally affected, as previously reported (Jiménez-Farfán et al., 2005). The point at which the internal-enamel epithelial cell maturation first occurs represents the site of future cusp development, or the growth center (Ten Cate, 1998). Thus, the cells without characteristics associated with preodontoblasts and preameloblasts (Ten Cate, 1998) were also related to areas with loss of basement membrane and delayed cusped development. These changes were also linked to reduced expression of sialic acids and GalNAc. This distribution suggests that sialic acids recognized by SNA, MAA, and MRL, and GalNAc recognized by ALL may mediate some epithelial-mesenchymal interactions during the bell stage of normal dental development. The basement membrane is a specialized extracellular matrix composed of diverse glycoconjugates (Garbarsch et al., 1994; Engvall, 1995). It has been shown that tissue-specific regulation of the basement membrane is necessary for alignment, polarization, and differentiation of the papillary dental cells resulting in odontoblasts, and that the disintegration of this membrane triggers the terminal differentiation of ameloblasts (Thesleff and Hurmerinta, 1981; Ruch et al., 1995). Our results show that the experimental groups had delayed differentiation of the inner-enamel epithelium and dental papilla that did not correspond to their age and dental development stage (Theiler, 1989; Ten Cate, 1998). Taking into account the important role of the molecules of the basement membrane and receptors in the cell surface for dental development, it is likely that if any change occurred in these interactions, the morphogenesis and cytodifferentiation of tooth germs would in turn be affected (Ruch, 1987).

Several glycoproteins play an essential role in craniofacial development (Johnston and Bronsky, 1995; Yamane et al., 1997; Miettinen et al., 1999; Heymann et al., 2002). Glycoproteins of the EGF family are associated with dental size, cusp formation (Thesleff et al., 1983; Partanen et al., 1985; Hu et al., 1992), and the maintenance of epithelial dental structures, dental papilla, and ameloblasts (Martineau-Doizé et al., 1991; Casasco et al., 1994; Tanikawa and Bawden, 1999). Dental effects in mice exposed to ethanol in utero (delayed calcification, retarded dental eruption, reduced tooth size, disturbed morphogenesis, and altered expression of EGF members) were previously reported (Hernández, 1990; Hernández et al., 1996; Jiménez-Farfán et al., 2005). Previous results suggested that higher ethanol concentrations affect dental morphology and the presence of EGF receptors, and may be associated with changes in tooth-germ cellular proliferation and differentiation of the cells that lead to the production of enamel and dentin (Jiménez-Farfán et al., 2005). Our study demonstrates changes in carbohydrate recognition in those cells associated with the production of enamel and dentin at later

stages. Our results suggest that ethanol may affect preameloblasts and preodontoblasts early in development, when these cells are acquiring the specific characteristics of secretory cells (Ten Cate, 1998). These alterations may determine the clinical enamel appearance previously observed in children of alcoholic mothers (Clarren and Smith, 1978), and explain the altered secretion reported in ameloblasts of minipig fetuses exposed to ethanol (Matthiessen and Romert, 1988).

Diverse growth factors have cooperative or antagonistic effects with other glycoproteins present in the extracellular matrices to enable growth, morphology, and function. We observed that more than 1 moiety could be altered and affect the way in which these glycans were presented or recognized at the cell membrane. Some studies have reported that prenatal ethanol exposure affects the integrity of the cell membrane (through an effect in protein synthesis and lipids) and its transport (McCall et al., 1989; Renau-Piqueras et al., 1997). Also, ethanol may induce the retention of nascent proteins (Larkin et al., 1996). Our results agree with those of a previous study in which the histological dental pattern was affected (Jiménez-Farfán et al., 2005). These changes may alter the permanence of glycoproteins located inside or close to the cytoplasmic membrane.

Glycosylation is a complex process in which diverse organelles, signaling pathways, and enzymes interact. This coordinated activity allows some deficiencies to be controlled during the formation of glycosylated moieties, avoiding their secretion. In this respect, it appears that while some sialic acids have a normal function inside the nucleus of dental cells, their presence is altered under experimental conditions. The mitochondria (Matthiessen and Romert, 1988; Xu et al., 2005), cytoskeleton (Azorin et al., 2001), endoplasmic reticulum (Matthiessen and Romert, 1983), and Golgi apparatus, as well as the enzymes associated with glycosylation, are altered by ethanol exposure during development (Renau-Piqueras et al., 1987, 1997; Guasch et al., 1992; Estrada et al., 1996). Previous reports demonstrated that some glycoproteins may be affected in fetal mice exposed to ethanol (Henderson et al., 1989). Also, ethanol can increase glycoprotein expression (Gottesfeld et al., 1990; Vallés et al., 1994; Moore et al., 2004), decrease glycoprotein expression (Hernández et al., 1996; Kim and Druse, 1996; Singh et al., 1996; Climent et al., 2002), or induce intracellular accumulation (Vallés et al., 1994). According to the present study, in which areas of colocalization were observed, it appears that differences in lectin distribution are associated with >1 glycoprotein in the tooth germ. In this study we showed the sialylation pattern of normal tooth germ and how it changed when ethanol was present in the dental environment. These results suggest that changes in the sialylation pattern probably occur as a result of an alteration of the regulated expression of different sialyltransferases (Harduin-Lepers et al., in press). These observations also suggest the relevance of the interactions between an adequate sialylation process and growth-factor signaling.

Changes in sugar moieties occur during normal embryonic craniofacial and dental development (Partanen and Thesleff, 1987; Tanikawa and Bawden, 1999; Wise et al., 2002; Yamamoto et al., 2003). Sialic acids influence cellular enzymatic and receptor functions during tissue proliferation and differentiation. This recognition determines the

AQ: 19

AQ: 20

AQ: 21

AQ: 22

AQ: 23

AQ: 24

inter- and extracellular interactions. Our results agree with previous studies (Sierra et al., 2001; Cerna et al., 2002) in which changes in the expression of specific sialic acids during cellular differentiation were shown to be good markers for determining the degree of cell maturation. Our results suggest that higher ethanol concentrations affect the sialylation pattern, and that these concentrations may be associated with changes in tooth-germ cellular proliferation and differentiation in mice. It remains to be determined whether changes in the glycosylation machinery (i.e., organelles, enzymes, and adaptors) and the expression of other growth factors present during dental development are related to the loss of differentiation observed under our experimental conditions.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Miguel Angel Mayoral, MSc., for his helpful comments on the manuscript.

REFERENCES

- Aebi M, Hennes T. 2001. Congenital disorders of glycosylation: genetic model system lead the way. *Trends Cell Biol* 11:136–141.
- Azorin I, Lazaro F, Martinez JM, et al. 2001. Prenatal exposure to alcohol affects the cytoskeleton in the developing rat liver. *Int J Dev Biol* 45:5151–5152.
- Casasco A, Casasco M, Corbett I, Calligaro A. 1994. Expression of c-erbB-2 proto-oncogene encoded protein (p185^{erbB-2}) in functional rat ameloblasts. *Arch Oral Biol* 39:917–919.
- Cerna A, Janega P, Martanovic P, et al. 2002. Changes in sialic acid expression in the lung during intrauterine development of the human fetus. *Acta Histochem* 104:339–342.
- Clarren S, Smith D. 1978. The fetal alcohol syndrome. *N Engl J Med* 298:1063–1067.
- Climent E, Pascual M, Renau-Piqueras R, Guerri C. 2002. Ethanol exposure enhances cell death in the developing cerebral cortex: role of brain-derived neurotrophic factor and its signaling pathways. *J Neurosci Res* 68:213–225.
- Dall'Olio F, Malagolini N, Guerrini S, et al. 1996. Differentiation-dependent expression of human beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase mRNA in colon carcinoma CaCo-2 cells. *Glycoconj J* 13:115–121.
- Dennis JW, Granovsky M, Warren CE. 1999. Glycoprotein glycosylation and cancer progression. *Biochim Biophys Acta* 1473:21–34.
- Engvall E. 1995. Structure and function of basement membranes. *Int J Dev Biol* 39:781–787.
- Fazel A, Sumida H, Schulte B, Thompson R. 1989. Lectin histochemistry of the embryonic heart: fucosa-specific lectin binding sites in developing rats and chicks. *Am J Anat* 184:76–84.
- Garbarsch C, Matthiessen M, Olsen B, et al. 1994. Immunohistochemistry of the intercellular matrix components and the epithelio-mesenchymal junction of the human tooth germ. *Histochem J* 26:110–118.
- Cheri C, Sgambati E, Bryk C. 2000. Glycoconjugate sugar residues in the chick embryo developing lung: a lectin histochemical study. *J Morphol* 243:257–264.
- Gir A, Aksharanugraha K, Harris E. 1989. A cephalometric assessment of children with fetal alcohol syndrome. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 95:319–326.
- Gnaedinger J, Druse M. 1984. Glycoproteins and proteins in an axolemma-enriched fraction and myelin from developing rat: effect of maternal ethanol consumption. *J Neurosci Res* 12:633–645.
- Gottesfeld Z, Morgan B, Perez-Polo J. 1990. Prenatal alcohol exposure alters the development of sympathetic synaptic components and of nerve growth factor receptor expression selectivity in lymphoid organs. *J Neurosci Res* 26:308–316.
- Guasch R, Renau-Piqueras J, Guerri C. 1992. Chronic ethanol consumption induces accumulation of proteins in the liver Golgi apparatus and decreases galactosyltransferase activity. *Alcohol Clin Exp Res* 16:942–948.
- Guevara J, Espinosa B, Zenteno E, et al. 1998. Altered glycosylation pattern of proteins in Alzheimer disease. *J Neurochem* 75:905–914.
- Harduin-Lepers A, Mollicone R, Delannoy P, et al. The animal sialyltransferases and sialyltransferase-related genes: a phylogenetic approach. *Glycobiology* (in press).
- Henderson G, Baskin C, Horbach J, et al. 1989. Arrest of epidermal growth factor-dependent growth in fetal hepatocytes after ethanol exposure. *J Clin Invest* 84:1287–1294.
- Hennet T, Elies L. 1999. The remodeling of glycoconjugates in mice. *Biochim Biophys Acta* 1473:123–136.
- Hernández J. 1990. Morphologic effects of maternal ethanol intake on skull, mandible and tooth of the offspring in mice. *Jpn J Oral Biol* 32:460–469.
- Hernández J, Portilla J, Ledesma C, et al. 1996. Immunorepression of epidermal growth factor in odontogenesis of the offspring of alcoholic mice. *Bol Estud Med Biol Mex* 44:25–30.
- Heymann R, About I, Lendahl U, et al. 2002. E- and N-cadherin distribution in developing and functional human teeth under normal and pathological conditions. *Am J Pathol* 160:2123–2133.
- Hu C, Sakakura Y, Sasano Y, et al. 1992. Endogenous epidermal growth factor regulates the timing and pattern of embryonic mouse molar tooth morphogenesis. *Int J Dev Biol* 36:505–516.
- Jiménez-Farfán D, Guevara J, Zenteno E, et al. 2005. EGF-R and erbB-2 in murine tooth development after ethanol exposure. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 73:65–71.
- Jiménez-Martínez MM, Trejo MH, Herrera SA, Romero JJ. 2002. Alteraciones de la glicosilación en enfermedades humanas. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 15:39–47.
- Johnston MC, Bronsky PT. 1995. Prenatal craniofacial development: new insights on normal and abnormal mechanisms. *Crit Rev Oral Biol Med* 6:368–422.
- Jones K, Smith D, Ulleland C, Streissguth A. 1973. Pattern of malformation in offspring of chronic alcoholic mothers. *Lancet* 1:1267–1274.
- Jowett AK, Kimber SJ, Ferguson MWJ. 1994. Sialylation of terminal saccharides of glycoconjugates expressed by murine molar tooth germs developing in vitro and in vivo. *J Anat* 185:85–94.
- Jürgen R. 1987. Subcellular organization of glycosylation in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 405–436.
- Kaneko Y, Yamamoto H, Colley KJ, Moskal JR. 1995. Expression of Gal beta 1,4GlcNAc alpha 2,6-sialyltransferase and alpha 2,6-linked sialylglycoconjugates in normal human and rat tissues. *J Histochem Cytochem* 43:945–954.
- Kaufman M. 1995. The atlas of mouse development. UK: Academic Press. p. 8.
- Kim J, Druse M. 1996. Deficiency of essential neurotrophic factors in conditioned media produced by ethanol-exposed cortical astrocytes. *Dev Brain Res* 96:1–10.
- Larkin JM, Oswald B, McNiven MA. 1996. Ethanol-induced retention of nascent proteins in rat hepatocytes is accompanied by altered distribution of the small GTP-binding protein rab2. *J Clin Invest* 98:2146–2157.
- Lemus D, Romero S, Lemus R, et al. 1996. Light microscopic detection of sugar residues in rabbit embryo teeth with lectin-horseradish peroxidase conjugates. *J Morphol* 227:185–195.
- Lemus D, Lemus R, Romero S, et al. 1997. Detection of sugar residues in rabbit embryo teeth with lectin-horseradish peroxidase conjugate: II. A light microscopic study. *J Morphol* 231:175–184.
- Lis H, Sharon N. 1993. Protein glycosylation. Structural and functional aspects. *Eur J Biochem* 218:1–27.
- Lis H, Sharon N. 1998. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chem Rev* 1998:98:637–674.
- Martin-Rendon E, Blake DJ. 2003. Protein glycosylation in disease: new insights into the congenital muscular dystrophies. *Trends Pharmacol Sci* 24:178–183.
- Martineau-Doizé B, Warshawsky H, Dickson K, et al. 1991. Localization of epidermal growth factor receptors in cells of the enamel organ of the rat incisor. *Dev Biol* 148:590–601.
- Matthiessen M, Romert P. 1983. Ethanol-induced changes of granular endoplasmic reticulum in hepatocytes of mini-pig fetuses. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand Sect A* 91:413–417.
- Matthiessen M, Romert P. 1988. Changes of secretory ameloblasts in mini-pig fetuses exposed to ethanol in vivo. *J Dent Res* 67:1402–1404.
- McCall D, Henderson G, Gray P, Schenker S. 1989. Ethanol effects on active Na⁺ and K⁺ transport in cultured fetal rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 38:2593–2600.
- Meyer J, Staubil A, Ruch J. 1981. Ultrastructural localization of concanavalin A binding sites on the surface of differentiation odontoblasts. *Biol Cell* 42:193–196.
- Miettinen PJ, Chin JR, Shum L, et al. 1999. Epidermal growth factor receptor function is necessary for normal craniofacial development and palate closure. *Nat Genet* 22:69–73.
- Miñana R, Climent E, Barettino D, et al. 2000. Alcohol exposure alters the expression pattern of neural cell adhesion molecules during brain development. *J Neurochem* 75:954–964.
- Miosge N, Götz W, Quondamatteo F, Herken R. 1998. Comparison of lectin binding patterns in malformed and normal human embryos and fetuses. *Teratology* 57:85–92.
- Moore B, Madorsky L, Paiva M, Barrow-Heaton M. 2004. Ethanol exposure alters neurotrophin receptor expression in the rat central nervous system: effects of prenatal exposure. *Neurobiology* 60:101–113.

AQ: 26

AQ: 25

- Nilsson C. 2003. Lectins. Proteins that interpret the sugar code. *Anal Chem* 8:349–353.
- Noronha A, Druse M. 1982. Maternal ethanol consumption and synaptic membrane glycoproteins in offspring. *J Neurosci Res* 8:83–97.
- Partanen A, Ekblom P, Thesleff I. 1985. Epidermal growth factor inhibits morphogenesis and cell differentiation in cultured mouse embryonic teeth. *Dev Biol* 111:84–94.
- Partanen A, Thesleff I. 1987. Localization and quantitation of ¹²⁵I-epidermal growth factor binding in mouse embryonic tooth and other embryonic tissues at different developmental stages. *Dev Biol* 120:186–197.
- Peumans W, Van Damme J. 1998. Plant lectins: specific tools for the identification, isolation, and characterization of O-linked glycans. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 33:209–258.
- Renau-Piqueras J, Miragall F, Guerri C, et al. 1987. Prenatal exposure to ethanol alters lateral plasma membranes and gap junctions on newborn rat hepatocytes as revealed by freeze-fracture. *J Submicrosc Cytol* 19:397–404.
- Renau-Piqueras J, Miragall F, Gerri C, Baguena-Cervellera R. 1997. Prenatal alcohol exposure affects galactosyltransferase activity and glycoconjugates in the Golgi apparatus of fetal rat hepatocytes. *Hepatology* 25:343–350.
- Ruch J. 1987. Determinisms of odontogenesis. *Cell Biol Rev* 14:1–112.
- Ruch J, Lesot H, Bègue-Kirn C. 1995. Odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol* 39:51–68.
- Rudd PM, Merry AH, Wormald MR, Dwek RA. 2002. Glycosylation and prion protein. *Curr Opin Struct Biol* 12:578–586.
- Sasano Y, Kaji Y, Nakamura M, et al. 1992. Distribution of glycoconjugates localized by Peanut and Maclura pomifera agglutinins during mouse molar root development. *Acta Anat* 145:149–155.
- Schauer R. 1982. Chemistry, metabolism and biological functions of sialic acids. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 40:131–235.
- Sierra C, Guevara J, Lascurain R, et al. 2001. Sialylation is modulated through maturation in hemocytes from *Macrobrachium rosenbergii*. *Comp Biochem Physiol C* 130:179–189.
- Singh S, Ehmann S, Snyder A. 1996. Ethanol-induced changes in insulin-like growth factors and IGF gene expression in the fetal brain. *Proc Soc Exp Biol Med* 212:349–354.
- Tanikawa Y, Bawden J. 1999. The immunohistochemical localization of phospholipase C γ and the epidermal growth-factor, platelet-derived growth-factor and fibroblast growth-factor receptors in the cells of the rat molar enamel organ during early amelogenesis. *Arch Oral Biol* 44:771–780.
- Ten Cate AR. 1998. *Oral histology*. 5th ed. St. Louis: Mosby.
- Theiler K. 1989. *The house of mouse. Atlas of embryonic development*. New York: Springer-Verlag.
- Thesleff I, Hurmerinta K. 1981. Tissue interactions in tooth development. *Differentiation* 18:75–88.
- Thesleff I, Ekblom P, Keski-Oja J. 1983. Inhibition of morphogenesis and stimulation of vascular proliferation in embryonic tooth cultures by a sarcoma growth factor preparation. *Cancer Res* 43:5902–5909.
- Thesleff I, Vahtokari A, Partanen A. 1995. Regulation of organogenesis: common molecular mechanisms regulating the development of teeth and other organs. *Int J Dev Biol* 39:35–50.
- Valles S, Lindo L, Montoliu C, et al. 1994. Prenatal exposure to ethanol induces changes in the nerve growth factor and its receptor in proliferating astrocytes in primary culture. *Brain Res* 656:281–286.
- Vázquez L, Massó F, Rosas P, et al. 1993. Purification and characterization of a lectin from *Macrobrachium rosenbergii* (*Crustacea decapoda*) hemolymph. *Comp Biochem Physiol* 105B:617–623.
- Wise G, Frazier-Bowers S, D'Souza R. 2002. Cellular, molecular, and genetic determinants of tooth eruption. *Crit Rev Oral Biol Med* 13:323–334.
- Xu Y, Liu P, Li Y. 2005. Impaired development of mitochondria plays a role in the central nervous system defects of fetal alcohol syndrome. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 73:83–91.
- Yamamoto T, Cui X-M, Shuler C. 2003. Role of ERK1/2 signaling during EGF-induced inhibition of palatal fusion. *Dev Biol* 260:512–521.
- Yamane A, Mayo ML, Bringas P Jr, et al. 1997. TGF- α , EGF, and their cognate EGF receptor are co-expressed with desmin during embryonic, fetal and neonatal myogenesis in mouse tongue development. *Dev Dyn* 209:353–366.
- Yarema K, Bertozzi C. 2001. Characterizing glycosylation pathways. *Gen Biol* 2:0004.1–0004.10.
- Zenteno E, Lascurain R, Montaña LF, et al. 1992. Specificity of *Amaranthus leucocarpus* lectin. *Glycoconj J* 9:204–208.

AQ: 28

AQ: 29

AQ: 27

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo intelectual.

NOMBRE: María Dolores
Jiménez García

FECHA: 09-10-05

FIRMA: 