

Desenvolvimento do germe dental do Hamster sob ação do Ácido Acetil Salicílico

Daniela GARCIA*

Lizeti Toledo de Oliveira RAMALHO**

RESUMO: A relação entre os efeitos do Ácido Acetil Salicílico (aspirina) e o dente em desenvolvimento na vida intra-uterina parece ser muito complexa e até o momento pobremente estudada. Sabe-se que esse fármaco analgésico- antipirético antiinflamatório é usado indiscriminadamente nas clínicas médica e odontológica e sem apresentar a correta prescrição. A proposta do presente estudo foi a de verificar se o tratamento crônico com essa droga altera o desenvolvimento do germe dental em fetos de Golden Hamster durante a prenhez, uma vez que se conhece a transposição placentária do referido medicamento. Desta maneira, propusemo-nos analisar microscopicamente os germes de molares dos filhotes sacrificados com 1 dia, 3, 5 e 10 dias após o nascimento e constatamos alterações estruturais desses germes.

PALAVRAS-CHAVE: Mesocricetus; gravidez; germe de dente; aspirina

Introdução

Alguns animais de laboratório, tais como o rato, o camundongo e o hamster são roedores extremamente usados em experimentos de pesquisa e apresentam uma diferença fundamental que compreende a duração do desenvolvimento embrionário. O rato 21 dias, o camundongo 19 dias e o hamster 16 dias (FERM⁷,1976).

Pelo fato do desenvolvimento embrionário do hamster ser extremamente curto (16 dias) , a odontogênese processa-se em poucos dias, e em se tratando de um órgão altamente diferenciado, as células do germe dental estão sujeitas a agressões diversas tais como: da vimblastina (HAY⁷,1961), do actinomycin D (KIGUEL⁸,1964), pelo fluoreto (KOCH⁹,1965), (BRONCKERS & JANSEN¹,1984), (BRONCKERS et al. ⁴, 1984), (BRONCKERS & WÖLTGENS²,1985), (LYARUU et al. ¹⁷,1986), da colchicina (BRONCKERS et al. ³,1983), do 1-p-bromotetramisole (LYARUU et al. ¹³,1987), de metais pesados (chumbo, zinco, arsênio,

*Bolsista CNPq/PIBIC/1999-2000 - Departamento de Morfologia - Faculdade de Odontologia - UNESP - 14801-903 - Araraquara - SP.

**Departamento de Morfologia - Faculdade de Odontologia – UNESP - 14801-903 - Araraquara – SP.

cobre e índio) (LYARUU et al. ¹⁴,1987), do cádmio (LYARUU et al. ¹⁵,1995), e da methotrexate (WÖLTGENS et al. ²¹, 1998). Sabemos que o Ácido Acetil Salicílico (aspirina) é um fármaco analgésico-antipirético e antiinflamatório amplamente utilizado na nossa sociedade e sem o devido acompanhamento médico. O uso indiscriminado pode provocar um quadro de intoxicação chamado salicilismo, cujos sinais e sintomas desta intoxicação são: cefaléia, vertigem, zumbido no ouvido, confusão mental, sonolência, sudorese, sede, hiperventilação pulmonar, náusea, vômitos, erupções na pele e grande alteração no equilíbrio ácido-básico (FLEISCH⁸, 1964), (WEBER et al. ¹⁹,1999). Também sabemos, através de estudos concluídos, que a ação analgésica do Ácido Acetil Salicílico ocorre em concentrações que variam de 50mg/Kg a 300mg/Kg e a ação antinflamatória em pequenas concentrações de 10mg/Kg (LAOUI et al. ¹⁰,1998). Sendo assim, pelo rápido desenvolvimento embrionário que o hamster apresenta, fato que faz os dentes ficarem mais sensíveis à ação da droga, propusemo-nos a trabalhar com a análise dos germes dentais do Golden Hamster (*Mesocricetus auratus*) pós-natal, após ter administrado Ácido Acetil Salicílico (aspirina) diluído via oral à mãe durante a prenhez.

Material e método

Preparação dos animais: Um grupo de 8 animais fêmeas de Golden Hamster virgens, de 2 a 4 meses de idade (120g de peso corporal), foi usado neste experimento, bem como 2 animais machos de Golden Hamster adultos. Foram colocados em gaiolas plásticas e alimentados com ração e água *ad libitum*. O cruzamento aconteceu da seguinte maneira: 2 fêmeas para 1 macho, colocados na mesma gaiola das 18h de um dia até às 8h da manhã seguinte. Às 8h da manhã fizemos a observação do plug vaginal. As fêmeas foram pesadas e removidas para gaiolas individuais para tratamento posterior. Com a detecção do plug vaginal- presença de espermatozóides na vagina da fêmea- determinou-se o dia zero da gestação.

A partir do 1º dia da gestação, começamos administrar aos hamsters fêmeas prenhes, via oral, o Ácido Acetil Salicílico* na dose de 65 mg/Kg, diluído em água. Essa administração foi dividida em 2 doses diárias (YAZDI et al. ²²,1992), uma pela manhã e outra pela tarde utilizando seringa de insulina e agulha curva com a extremidade especialmente preparada com uma esfera oca de acrílico que permite a passagem de líquidos. O

*ASPIRINA- comprimidos 500mg- BAYER, Ind. Bras.

animal era pesado toda manhã para que fosse possível calcular a dosagem a ser administrada. A fêmea recebeu o medicamento, diariamente, do primeiro dia da gestação até um dia antes do nascimento que é previsto para o 16º dia de gestação. Salientamos que utilizamos, também, fêmeas prenhes controle as quais administramos, com o mesmo dispositivo e no mesmo período de tempo, apenas soro fisiológico, somente para repetição do protocolo.

O sacrifício da ninhada foi realizado utilizando-se: anestésico Francotar* na dose de 0,08mL/100g de peso corporal associado com Virbaxyl*, 2%, relaxante muscular, analgésico e sedativo na dose de 0,04mL/100g, via intra- muscular. Este procedimento foi realizado nos animais com 1 dia, 3, 5 e 10 dias de vida, sendo usados um total de 35 filhotes, cujas cabeças foram decaptadas, imersas em formol neutro tamponado (LILLIE¹¹,1954), permanecendo no líquido fixador durante 3 dias. Foram, ainda, imersas durante 5 dias em solução descalcificadora de Morse, neutralizadas em sulfato de sódio e lavadas em água corrente durante 24 horas. A seguir foram processadas através da rotina histológica de desidratação em álcoois crescentes, diafanização em xilol, embebição e inclusão em parafina, confecção dos blocos, identificação criteriosa e microtomia** com 6 µm de espessura em cortes frontais. As lâminas foram submetidas à coloração de rotina pela Hematoxilina e Eosina para análise morfológica dos eventos ocorridos sobre os germes dentários em desenvolvimento e a posterior documentação fotográfica.

Análise morfológica: Procedemos a análise morfológica dos molares em desenvolvimento da ninhada experimental: 2 cabeças para 1 dia de idade, 2 cabeças para 3 dias, 6 cabeças para 5 dias e 1 cabeça para 10 dias; e também da ninhada controle: 3 cabeças para 1 dia de idade, 7 cabeças para 3 dias, 7 cabeças para 5 dias e 7 cabeças para 10 dias utilizando-se para isto o fotomicroscópio óptico comum***.

* Virbac do Brasil – Ind. Com. Ltda.

** Micrótomo Rotatório MICROM, modelo HM 325, Espanha.

*** ZEISS, modelo JENAVAL.

Resultado

Grupo Controle de 1 dia:

Ameloblastos bem organizados em paliçada, poligonais, em processo de produção da 1ª camada de esmalte, fino, bem corado ao longo da cúspide (Figura 1) e na sua vertente nas porções subseqüentes, as proximais, os ameloblastos encontram-se ligeiramente atrasados na secreção de matriz orgânica, e, assim com menor diferenciação em relação àqueles situados na altura das cúspides.

Grupo Controle de 3 dias:

Presença de matriz de esmalte, 2 camadas de dentina evidentes e espessas (Figura 2). Polpa com odontoblastos em paliçada e normais.

Grupo controle de 5 dias:

2 camadas de dentina. Matriz de esmalte espessa em processo de mineralização inicial (Figura 3). Na porção cervical, a matriz de esmalte apresenta-se em forma de cunha muito bem delineada. Odontoblastos normais.

Grupo controle de 10 dias:

Aos 10 dias o esmalte encontra-se mineralizado e surge somente a sua imagem negativa (Figura 4) e a dentina subjacente apresenta-se espessa, mineralizada e canalicular. Grupo experimental de 1 dia:

Os ameloblastos são baixos, não apresentam a característica normal de células poliédricas (Figura 5). A matriz orgânica produzida se restringe a uma estreita faixa. No tecido conjuntivo pulpar as células são imaturas e em grande concentração aleatoriamente dispostas. Não há fortes evidências da angiogênese.

Grupo experimental de 3 dias:

2 camadas de estreita matriz dentinária e matriz orgânica de esmalte sem vestígios de mineralização (Figura 6). O germe dentário é pouco desenvolvido como um todo e o tecido conjuntivo pulpar encontra-se em processo de desenvolvimento.

Grupo experimental de 5 dias:

Matriz de esmalte fina seguida de 2 finas camadas de dentina em processo de mineralização (Figura 7) e odontoblastos em processo de secreção de dentina.

Grupo experimental de 10 dias:

Os ameloblastos estão bem formados em processo de secreção de matriz de esmalte sendo que a camada anteriormente formada já se encontra mineralizada oferecendo estreita faixa de imagem negativa. Os odontoblastos encontram-se produzindo estreita camada de dentina circumpulpar (Figura 8).

Discussão

Poucos estudos existem sobre como o germe dental dos Golden Hamster desenvolve-se (proliferação e diferenciação das células, mineralização, vascularização) bem como a maneira com que este germe comporta-se mediante ao contato com algumas substâncias. A invasão de vasos sanguíneos em meio às células do retículo estrelado deve-se à penetração dos mesmos por entre as dobras ou vilosidades formadas pelas células do epitélio externo que se modificam para permitir tal situação que vai levar nutrientes necessários aos ameloblastos em processo de secreção de matriz orgânica do esmalte.

Sendo assim, sabemos que drogas ingeridas ganham a corrente sanguínea e chegam ao germe dental causando uma série de alterações celulares, retardo da mineralização de esmalte e de dentina e com isso, atrasa a amelogênese e a dentinogênese. Alguns pesquisadores chegaram a essas conclusões, porém utilizando-se de substâncias diferentes do Ácido Acetil Salicílico.

Kiguel⁸ (1964), por exemplo, sugeriu que a fosfatase alcalina é necessária para a diferenciação celular e proliferação durante os estágios de morfogênese dos germes dentais. Fleisch⁶ (1964) contestou que a função da fosfatase alcalina é a remoção do pirofosfato inorgânico, um importante inibidor da mineralização, fato que ocorre com os germes dos filhotes do hamster prenhe submetido à ação do Ácido Acetil Salicílico, a partir do grupo 3 dias experimental até o grupo 10 dias experimental.

De acordo com Roger et al.¹⁸ (1968) o desenvolvimento embrionário dos Golden Hamster é curto, de 16 dias, dos quais quase metade desses dias de gestação são gastos com a embriogênese para compensar a demora na implantação que se processa 6 dias após o coito. Estudaram a embriogênese desde de 2h após o coito até o 16º dia da gestação e com isso toda evolução de células, tecidos e formação de órgãos e estruturas que fazem parte do corpo, entre elas o órgão dental que inicia seu desenvolvimento no 11º dia (na maxila) e por isso é altamente susceptível a alterações por substâncias artificialmente produzidas.

Este fato pode ser ainda mais profundamente comprovado por Ferm⁵ (1976) que analisou os efeitos de

metais pesados como o chumbo, o cádmio, o arsênio, o cobre e do elemento índio sobre os embriões de hamsters que estavam sendo gerados e desta análise concluiu que estes metais causam síndromes específicas ou malformações de desenvolvimento. Isto ocorre porque muitos destes metais são componentes de algumas metaloenzimas e interferem com elas durante os estágios de desenvolvimento. Chegou também a observar que a placenta é permeável para os metais pesados, permitindo-nos a comprovação do resultado quando observamos as alterações do Ácido Acetil Salicílico.

Wöltgens et al.²⁰ (1989) ainda desenvolveram estudos sobre os efeitos do metal pesado cádmio sobre a atividade da enzima p-nitrofenil fosfatase e sobre a atividade da pirofosfatase inorgânica, ambas originadas da fosfatase alcalina. Concluíram que a Ppi-ase tem o Zn^{2+} como cofator. O Cd^{2+} em concentrações superiores a 10^{-5} mol/L inibe a Ppi-ase, mas não a p-NPP-ase. Além disso, na mineralização do germe dental, o Cd^{2+} repõe Zn^{2+} , trocando o centro ativo necessário para a atividade da Ppi-ase, mas não para a atividade da p-NPP-ase, porém ocorre retardo na mineralização do esmalte.

Outros pesquisadores continuam afirmar que ocorrem alterações dentárias importantes após diferentes agressões durante a odontogênese. Lyaruu et al.¹⁵ (1995) pesquisaram a capacidade de mineralização da matriz de esmalte de um germe dental (1º molar) de hamster com 3 dias de desenvolvimento, que foi pré-exposto numa cultura de 10 partes/ 10^6 de flúor por 24h durante a fase secretora dos ameloblastos. Os autores concluíram que a administração de flúor durante a fase secretória reduz o crescimento em comprimento dos cristais de apatita, mas promove crescimento em largura, indicando que o flúor provavelmente interrompe temporariamente a capacidade da amelogênese, o que acontece com a presença do Ácido Acetil Salicílico na análise do grupo 5 dias experimental. Dois anos depois, os mesmos autores Lyaruu et al.¹⁶ (1997) estudaram os efeitos da actinomycin D no desenvolvimento do germe dental do hamster, 1 dia pós-natal e observaram que os ameloblastos encontram-se normais, no grupo controle, mas no grupo experimental houve alteração celular de pré-ameloblastos e pré-odontoblastos afetando, assim, o processo de proliferação e diferenciação dos mesmos, semelhante aos achados com o hamster que recebeu o Ácido Acetil Salicílico. Um ano após a pesquisa anterior, Lyaruu et al.¹⁷ (1999) fazendo uso, à mãe durante a gestação, de Daunorubicin, observou que os molares dos hamsters filhotes com 3 dias de idade sofreram atraso nos estágios de proliferação e diferenciação de ameloblastos e odontoblastos e também na amelogênese e na dentinogênese.

Ao analisarmos todos os estudos citados podemos notar a preocupação em se pesquisar acontecimentos gestacionais para que as descobertas venham evitar as várias alterações deletérias e permanentes, sejam gerais, sejam locais.

Conclusão

Baseando-nos pelos achados histológicos analisados, obtivemos como conclusões que:

- O Ácido Acetil Salicílico promove alteração celular, principalmente dos ameloblastos e dos odontoblastos atrasando o processo de diferenciação destas células.
- As matrizes orgânicas de esmalte e de dentina sofrem um retardo no processo de mineralização.
- Ocorre um atraso na amelogênese e na dentinogênese acarretando formação de um esmalte e uma dentina finos e por isso hipomineralizados.

Agradecimentos

Aos Srs. Luís Antônio Potenza e Pedro Sérgio Simões, técnicos do laboratório de Histologia, pelo processamento histológico e nos cuidados dos animais.

GARCIA, D.; RAMALHO, L.T.O. Hamster tooth germ development under acetyl salicylic acid action.

Rev. Odontol. UNESP, São Paulo, v. 30, n. 1, p....., jan./jun. 2001.

ABSTRACT: The relationship among the effects of the Acid Acetyl Salicylic (aspirin) and the tooth in development in the uterine life seems to be very complex and until the moment poorly studied. It is known that aspirin is used indiscriminately in the medical and odontological clinics and without presenting the correct prescription. The proposal of the present study was the one of verifying the chronic treatment with that drug it alters the development of the dental germ in foetuses of Golden Hamster during the pregnant ones, once one knows the conversion placenta of the referred medicine. Of this it sorts things out, we proceeded a microscopical analysis of the molar germs of the nestling sacrificed with 1 day, 3, 5 and 10 days after the birth and we verified structural alterations of those germ.

KEYWORDS: *Mesocricetus; pregnancy; tooth germ; aspirin.*

Referências bibliográficas

- 1 BRONCKERS, A.L.J.J.; JANSEN, L.L. A histological study of short- term effects of fluoride on enamel and dentine formation in hamster thooth germs in organ culture in vitro. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 29, n. 10, p. 803-810, Oct. 1984.
- 2 BRONCKERS, A.L.J.J.; WÖLTGENS, J.H.M. Short-term effects fluoride on biosynthesis of enamel- matrix proteins and dentine collagens and on mineralization during hamster tooth-germ development in organ culture. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 30, n. 2, p. 181-191, Feb. 1985.
- 3 BRONCKERS, A.L.J.J.; BERVOETES, T.J.M.; WÖLTGENS, J.H.M. Effects of developmental stage of explants on further in-vitro development of hamster molars. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 28, n. 1, p. 69-77, Jan. 1983.
- 4 BRONCKERS, A.L.J.J.; JANSEN, L.L.; WÖLTGENS, J.H.M. Long term (8 days) effects of exposure to low concentrtrions of fluoride on enamel formation in hamster thooth-germs in organ culture in vitro. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 29, n. 10, p. 811-819, Oct. 1984.
- 5 FERM, V.H. Teratogenic effects and placental permeability of heavy metals. **Curr. Top. Pathol.**, Berlin, v. 61, p. 145-151, 1976.
- 6 FLEISCH, H. Role of nucleation and inhibition of calcification. **Clin. Orthop.**, v. 32, p. 170-180, 1964.
- 7 HAY, M.F. The development *in vivo* and *in vitro* of lower incisor and molars of the mouse. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 3, p. 86-109, Feb. 1961.
- 8 KIGUEL, E. Alkaline-phosphatase activity in developing molars of Vit- D- deficient rats in high calcium phosphorous ratio diet. **J. Dent. Res.**, Washington, v. 43, p. 71-77, Jan./Feb.1964.
- 9 KOCH, W.E. In vitro development of tooth rudments of embryonic mice. **Anat. Rec.**, New York, v. 152, p. 513-524, 1965.
- 10 LAOUI, K. et al. Analgesic and anti-inflammatory activity of Saponins of spinoza. **Ann. Pharm. Fr.**, Paris, v. 56, p. 220-228, 1998.
- 11 LILLIE, R.D. **Histopathologic technic and pratical histochemistry**. New York: Mc Graw Hill, 1954.

- 12 LYARUU, D.M.; WÖLTGENS, J.H.M.; BERVOETS, T.J.M. Effect of alkaline phosphatase inhibition by 1-p-bromotetramisole on the formation of trichloroacetic acid [32 P]-insoluble phosphate from inorganic [32 P]-phosphate and [32 P]pyrophosphatase in non-mineralizing and mineralizing hamster molar tooth-germs in vitro. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 32, n. 6, p. 429-432, June 1987.
- 13 LYARUU, D.M. et al. Ultrastructural study of fluoride-induced in vitro hypermineralization of enamel in hamster tooth-germ explanted during the secretory phase of amelogenesis. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 31, n. 2, p. 109-117, Feb. 1986.
- 14 LYARUU, D.M. et al. Ultrastructure of in vitro recovery of mineralization capacity of fluorotic enamel matrix in hamster tooth-germs pre-exposed to fluoride in organ culture during the secretory phase of amelogenesis. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 32, n. 2, p. 107-115, Feb. 1987.
- 15 LYARUU, D.M. et al. Effects of vincristine on the developing hamster tooth-germ in vitro. **Connect. Tissue Res.**, London, v. 32, n. 1/4, p. 281-9, 1995.
- 16 LYARUU, D. M. et al. Effects of in vitro Actinomycin D on developing hamster molar tooth-germ in. **Eur. J. Oral Sci.**, Cambridge, v. 105, n. 1, p. 52-58, Feb. 1997.
- 17 LYARUU, D.M. et al. Daunorubicin- Induced Pathology in the Developing Hamster Molar Tooth Germ in vitro. **Cancer Detect. Prev.**, v. 23, n. 4, p. 343-350, 1999.
- 18 ROGER, A. et al. **The golden hamster its biology and use in medical research**. U.S.A : The Iowa State University Press, 1968. 542p.
- 19 WEBER, A. et al. Means of increasing sensitivity of an in vitro diagnostic test for aspirin intolerance. **Clin. Exp. Allergy**, Oxford, v. 29, p. 1402-1411, 1999.
- 20 WÖLTGENS, J.H.M.; BERVOETS, J.M.; LYARUU, D.M. The effects of cadmium on the p-nitrophenyl phosphatase and inorganic pyrophosphatase activities of alkaline phosphatase in developing hamster tooth-germ. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 34, n. 7, p. 591-592, July 1989.
- 21 WÖLTGENS, J.H.M. et al. Effects of Methotrexate on cell proliferation in developing hamster molar tooth germs in vitro. **Eur. J. Oral Sci.**, Cambridge, v. 106, n. 1, p. 156-159, Feb. 1998.
- 22 YAZDI, M. et al. Effects of non steroidal anti inflammatory drugs on demineralized bone induced bone formation. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v. 27, n. 1, p. 28-33, Jan. 1992.

“DESENVOLVIMENTO DO GERME DENTAL DO HAMSTER SOB AÇÃO DO ÁCIDO ACETIL SALICÍLICO”

LEGENDA DAS FIGURAS:

FIGURA 1- Primeira camada de esmalte (E) e ameloblastos (A) em paliçada. H.E. 250x.

FIGURA 2- 2 camadas de dentina (D) bem formadas e odontoblastos (O) em paliçada. H.E. 100x.

FIGURA 3- Espessa camada de esmalte (CE) formado, em processo de mineralização inicial. H.E. 100x.

FIGURA 4- Espessa imagem negativa do esmalte (INE) e dentina totalmente mineralizada (DM). H.E. 125x.

FIGURA 5- Ameloblastos baixos (AB). H.E. 125x.

FIGURA 6- Estreita camada de matriz de dentina (MD) e matriz de esmalte (ME) sem mineralização. H.E. 125x.

FIGURA 7- Matriz de esmalte fina (MEF) e 2 camadas de dentina (D) em processo de mineralização. H.E. 100x.

FIGURA 8- Estreita imagem negativa de esmalte (EE) e odontoblastos ainda produzindo dentina (D). H.E. 100x.