

ESTUDO DO DESENVOLVIMENTO DE GERMES DENTAIS DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À AÇÃO TRANSPLACENTÁRIA DE AMINOACETONITRILA

Sebastião HETEM*
Maria Tereza Giroto MATHEUS*
Stefan Fiuza de Carvalho DEKON**

RESUMO: Foi estudado o efeito do aminoacetoneitrila, administrado durante o período de gestação, sobre o desenvolvimento dos germes dentais do camundongo. Os animais foram sacrificados a 1, 3, 8 e 10 dias após o nascimento. Verificou-se que o aminoacetoneitrila retarda o desenvolvimento dos germes dentais, porém, não de maneira irreversível, uma vez que há uma recuperação da fase de desenvolvimento.

UNITERMOS: Odontogênese; aminoacetoneitrila.

INTRODUÇÃO

O germe dental tem-se mostrado um excelente modelo para estudo do desenvolvimento normal e anormal^{9,10,15,16}.

Após a verificação que a colagenase suprime, reversivelmente, a morfogênese das glândulas salivares "in vitro"⁴, o papel do colágeno durante a morfogênese tem interessado um grande número de investigadores que relatam efeito supressivo sobre o desenvolvimento do germe dental determinado pela alteração da formação do colágeno^{3,8,9}.

Supressão semelhante é imposta aos germes dentais pela adição de beta-aminopropionitrila à cultura de germes dentais de camundongos^{10,11,12}; a recolocação das culturas inibidas no meio de cultura controle leva à sua recuperação sob todos os aspectos¹⁰.

Enquanto as drogas laticogênicas atuam extracelularmente, outras substâncias alteram a biossíntese intracelular ou secreção dos precursores do colágeno inibindo a morfogênese dental "in vitro"^{2,6}.

Também "in vivo" o beta-aminopropionitrila leva à deposição de um tipo anormal de dentina, à ausência de um diafragma epitelial reconhecível e à formação de um ápice radicular apenas de cimento¹³.

Assim, considerando-se os fatos relatados na literatura, é o propósito deste trabalho verificar os efeitos do aminoacetoneitrila sobre o desenvolvimento do germe dental do camundongo "in vivo" e a reversibilidade dos efeitos possivelmente encontrados.

* Departamento de Morfologia – Faculdade de Odontologia – UNESP – 16100 – Araçatuba – SP.

** Estagiário da Disciplina de Histologia e Embriologia – Departamento de Morfologia – Faculdade de Odontologia – UNESP – 16100 – Araçatuba – SP.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados neste trabalho 12 camundongos-fêmeas (*Mus musculus*, var. albino, Swiss) com 60 dias de idade, que após o acasalamento por um período de 14 horas foram examinados para a verificação do "plug" vaginal. A partir do 13º dia de gestação um grupo de 8 animais recebeu injeções intraperitoneais de 0,2 ml de solução aquosa de aminoacetona, na proporção de 50 mg/kg de peso corporal por dia, e passou a constituir o grupo tratado, e outro grupo de 4 animais recebeu injeções de 0,2 ml de água destilada, passando a constituir o grupo controle. As injeções foram feitas em 3 dias consecutivos; durante todo o período experimental, os animais foram alimentados com ração granulada e água à vontade.

A partir do nascimento, os animais foram sacrificados com 1, 3, 8, e 10 dias de idade, por decapitação, sendo que animais de uma mesma ninhada prestaram-se para o sacrifício em mais de uma etapa de observação. As mandíbulas foram dissecadas, seccionadas no plano sagital mediano, descalcificadas e processadas para análise em microscopia óptica. A inclusão foi feita de ambas as hemi-mandíbulas em um único bloco de parafina.

As peças foram cortadas de modo a fornecer cortes semi-seriados com 6 micrômetros de espessura e coradas pelo método da hematoxilina e eosina.

RESULTADOS

Animais sacrificados 1 dia após o nascimento

Grupo controle – 1º molar

Identificavam-se germes dentais bem estruturados, com todos os seus componentes, compatíveis com a idade do animal analisado (Fig. 1). O órgão do esmalte possuía todas as camadas desde o epitélio externo até a camada ameloblástica. O retículo estrelado era mais espesso nas áreas intercuspídicadas e os ameloblastos eram altos, possuíam núcleo basal e citoplasma abundante; a altura das células variava conforme a área do órgão dental analisada.

Uma delgada faixa de dentina seguida de uma de pré-dentina pôde ser identificada. A camada de odontoblastos era constituída de células altas, com núcleo basal.

O restante do tecido pulpar era altamente celularizado, especialmente junto à abertura cervical; alguns vasos sanguíneos puderam ser identificados no seu interior.

Circundando o germe dental havia algumas fileiras de células orientadas paralelamente à sua superfície e, mais externamente, encontravam-se áreas de tecido ósseo esponjoso.

Grupo tratado – 1º molar

Os germes dentais obtidos de animais injetados mostravam aspecto satisfatório (Fig. 2). O órgão do esmalte era semelhante ao descrito para os animais do grupo controle.

As camadas de tecido mineralizado estavam ausentes ou havia apenas uma delgada camada de pré-dentina. Os aspectos gerais da polpa, assim como as estruturas circundantes, inclusive o tecido ósseo esponjoso, eram semelhantes aos descritos para os animais controle.

Grupo controle – incisivo

Os germes dentais mostravam-se com as características próprias deste grupo dental e bem estruturados (Figs. 3 e 4).

Os germes dentais não estavam irrompidos e as camadas do órgão do esmalte, exceto a camada de ameloblastos, eram pouco nítidas. Os ameloblastos eram células altas, com núcleo

basal e citoplasma abundante; na face lingual não havia esmalte e as células periféricas à dentina eram cúbicas baixas.

Havia uma faixa de esmalte mais espessa próxima à borda incisal. Seguiu-se a esta uma faixa de dentina, também mais espessa junto à borda incisal, e uma faixa de pré-dentina; áreas de osteodentina puderam ser identificadas próximo à borda incisal.

Os odontoblastos forravam toda a camada de pré-dentina, eram altos na superfície voltada para a face vestibular e baixos na superfície voltada para a face lingual, mesmo onde a dentina já havia sido depositada.

O tecido pulpar mostrava-se rico em células, especialmente junto à abertura cervical, e em vasos sanguíneos.

Circundando o órgão dental via-se uma faixa de tecido organizado com células dispostas paralelamente à sua superfície; externamente a esta havia tecido ósseo esponjoso.

Grupo tratado – incisivo

Os germes dentais apresentavam-se bem constituídos e com as características próprias deste grupo dental (Fig. 5).

De uma forma geral, todos os aspectos dos germes do grupo controle repetiram-se nos deste grupo, tendo se mostrado, especificamente, menos acentuada a quantidade de tecidos mineralizados depositada.

Com relação às camadas do órgão do esmalte, à polpa e às estruturas circunjacentes, não havia nenhuma particularidade digna de nota.

Animais sacrificados 3 dias após o nascimento

Grupo controle – 1º molar

Germes dentais com características próprias dos órgãos pertencentes ao grupo dos molares estavam presentes e bem constituídos (Fig. 6).

O órgão do esmalte apresentava todos os seus componentes; a camada ameloblástica mostrava variações na altura das células conforme a região considerada e nas áreas carentes de esmalte eram baixas.

A camada de esmalte depositada era espessa e subjacente a ela havia dentina e pré-dentina. Internamente à pré-dentina, situava-se a camada de odontoblastos. O tecido pulpar era rico em células, particularmente junto à abertura cervical, e em vasos sanguíneos.

Circundando o germe dental havia células dispostas paralelamente à sua superfície e, externamente a estas, tecido ósseo esponjoso.

Grupo tratado – 1º molar

Os germes dentais mostravam-se bem constituídos e com todas as estruturas presentes (Fig. 7).

Foram identificadas todas as camadas do órgão do esmalte com as características próprias, as camadas de esmalte, de dentina e de pré-dentina, as áreas carentes de esmalte faceadas por células baixas, a camada odontoblástica, a polpa rica em células e em vasos sanguíneos e as estruturas circunjacentes de tecido conjuntivo e de tecido ósseo esponjoso.

Apesar do aspecto geral dos órgãos dentais serem semelhantes aos dos germes dos animais controle, a espessura das camadas de tecidos mineralizados depositadas eram relativamente delgadas.

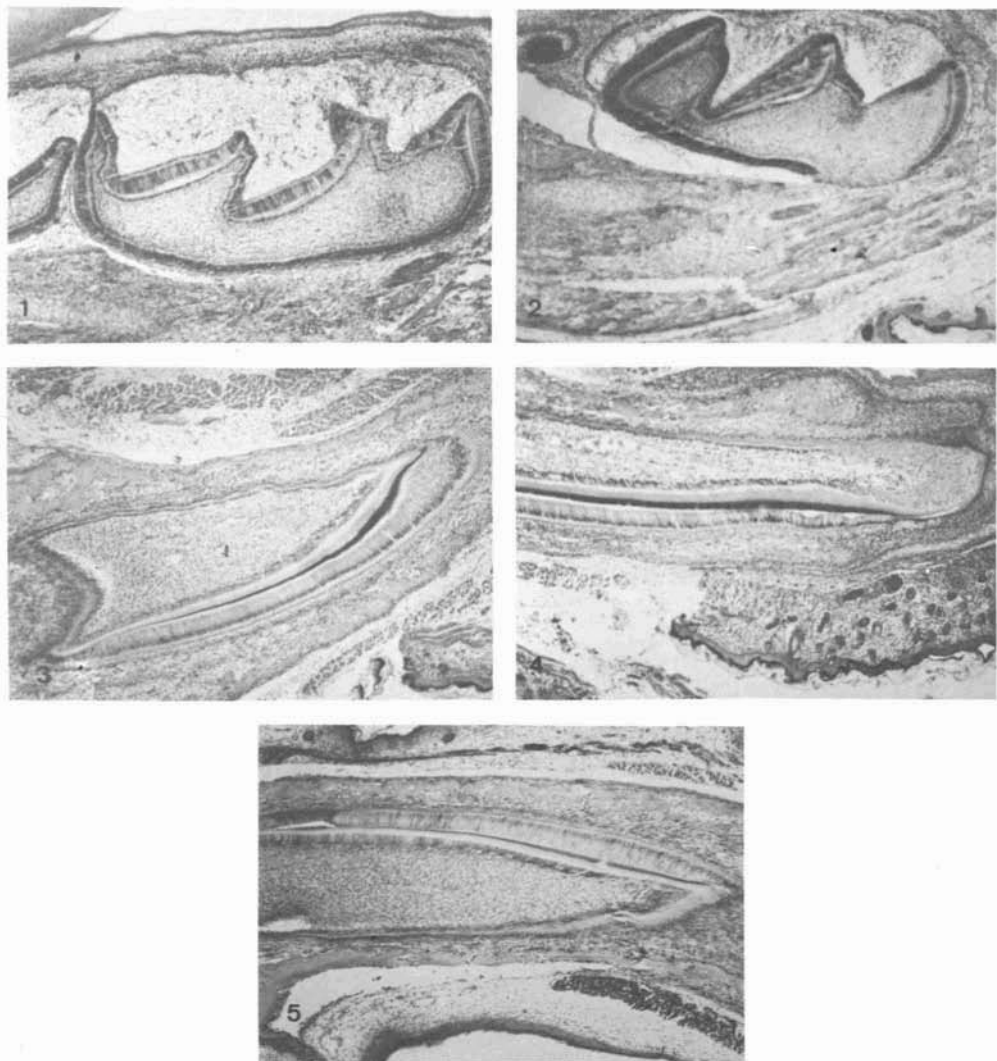


FIG. 1 – Germe dental de molar controle, 1 dia após o nascimento. H.E. 63X.
 FIG. 2 – Germe dental de molar tratado, 1 dia após o nascimento. H.E. 63X.
 FIG. 3 – Germe dental de incisivo controle, 1 dia após o nascimento. H.E. 63X.
 FIG. 4 – Germe dental de incisivo controle, 1 dia após o nascimento. H.E. 63X.
 FIG. 5 – Germe dental de incisivo tratado, 1 dia após o nascimento. H.E. 63X.

Grupo controle – incisivo

Os germes dentais mostravam-se bem constituídos (Fig. 8).

Das camadas do órgão do esmalte, apenas a camada ameloblástica era nítida; mostrava-se como uma fileira única de células altas, embora não tanto quanto no tempo anteriormente descrito; os núcleos eram basais e o citoplasma menos abundante que nos dos animais mais jovens. A camada de esmalte depositada era espessa e limitava-se à face vestibular do germe

dental. As camadas de dentina e de pré-dentina eram mais espessas na face voltada para o esmalte.

Os odontoblastos circundavam toda a polpa, eram mais altos na superfície voltada para o esmalte e seus prolongamentos atravessavam a pré-dentina e a dentina.

A polpa era rica em células e em vasos sanguíneos. Os germes dentais eram circundados por tecido conjuntivo com células paralelas à sua superfície e, mais externamente, por tecido ósseo esponjoso.

Grupo tratado – incisivo

Os germes dentais mostravam-se bem constituídos, com todos os elementos estruturais presentes (Fig. 9).

Apenas a camada ameloblástica era nítida no órgão do esmalte e mostrava-se constituída por células altas com núcleo basal e citoplasma abundante.

As camadas de tecidos mineralizados estavam presentes notando-se entretanto que eram delgadas tanto a de esmalte quanto a de dentina.

Os odontoblastos estavam dispostos em uma camada única de células, sendo altas na superfície voltada para a face vestibular e mais baixas na superfície voltada para a face lingual.

O tecido pulpar mostrava-se rico em células e em vasos sanguíneos.

Circundando o órgão dental, identificava-se tecido conjuntivo com células dispostas paralelamente à sua superfície e, mais externamente, tecido ósseo esponjoso.

Animais sacrificados aos 8 e aos 10 dias após o nascimento.

Grupo controle – 1º molar

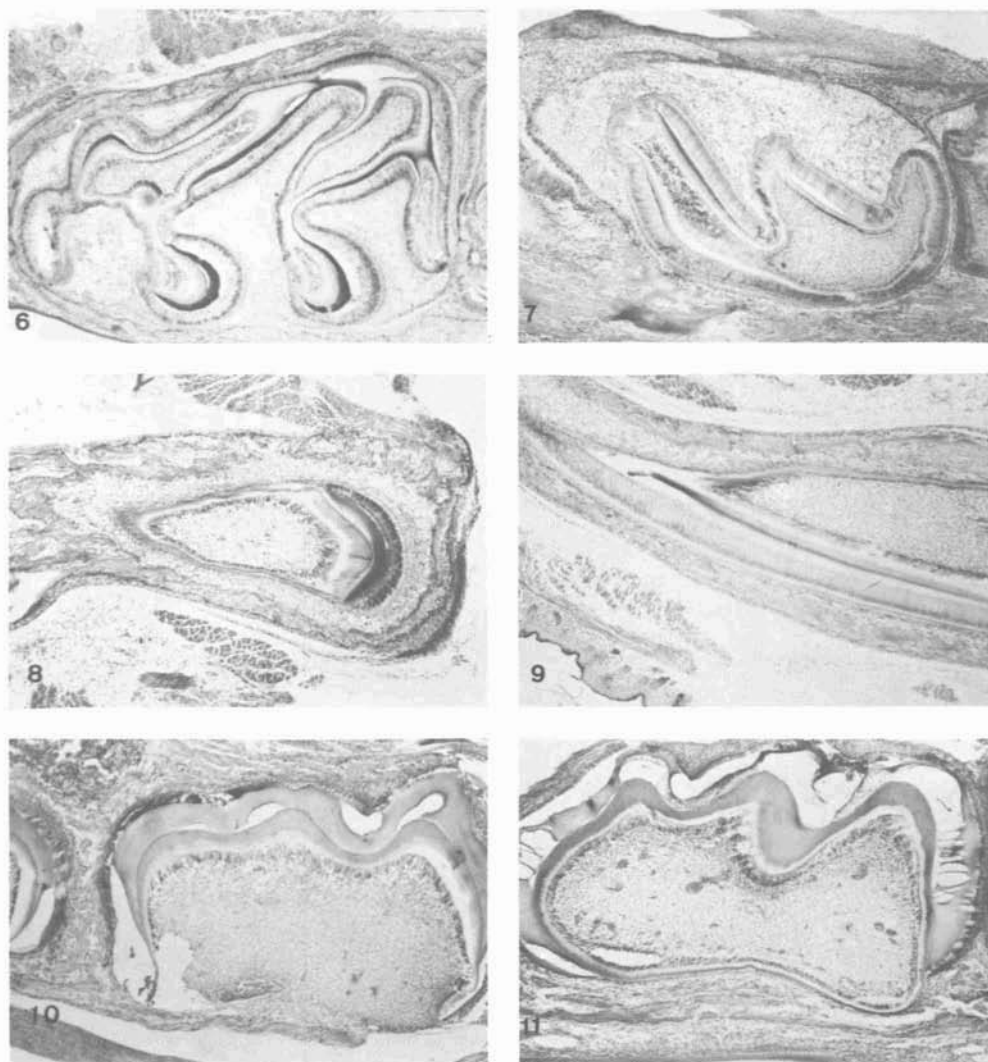
Os germes dentais apresentavam-se bem constituídos e bem desenvolvidos, tanto aos 8 (Fig. 10) quanto aos 10 dias (Fig. 11) após o nascimento. As camadas do órgão do esmalte estavam condensadas, exceto nas áreas intercuspídicadas, onde as células do retículo estrelado eram mais abundantes.

Os ameloblastos formavam uma fileira de células baixas, bastante uniforme, com núcleos basais e citoplasma relativamente escasso. Nas áreas carentes de esmalte, a camada ameloblástica era bem menos evidente.

A quantidade de esmalte depositada era volumosa, embora variável em função da área considerada.

As camadas de dentina e de pré-dentina eram espessas, circundavam a polpa e eram atravessadas pelos prolongamentos odontoblásticos. Os odontoblastos formavam uma fileira de células não muito altas com núcleos basais. O tecido pulpar era rico em células e em vasos sanguíneos.

Circundavam o órgão dental uma faixa de tecido conjuntivo rico em células dispostas paralelamente à sua superfície e, mais externamente em relação às faces apical e proximais, identificava-se tecido ósseo.



- FIG. 6 - Germe dental de molar controle, 3 dias após o nascimento. H.E. 63X.
 FIG. 7 - Germe dental de molar tratado, 3 dias após o nascimento. H.E. 63X.
 FIG. 8 - Germe dental de incisivo controle, 3 dias após o nascimento. H.E. 63X.
 FIG. 9 - Germe dental de incisivo tratado, 3 dias após o nascimento. H.E. 63X.
 FIG. 10 - Germe dental de molar controle, 8 dias após o nascimento. H.E. 63X.
 FIG. 11 - Germe dental de molar controle, 10 dias após o nascimento. H.E. 63X.

Grupo tratado - 1º molar

Os germes dentais mostravam-se bem desenvolvidos (Figs. 12 e 13).

Notavam-se as estruturas epiteliais remanescentes do órgão do esmalte, inclusive os ameloblastos, constituídos por células baixas com núcleos basais.

As camadas de esmalte, de dentina e de pré-dentina estavam bem constituídas e eram espessas. Os odontoblastos mostravam-se como células não muito altas e de núcleo basal. O tecido pulpar era ricamente celularizado e vascularizado.

Circundando o órgão dentário identificava-se a presença de tecido conjuntivo com células dispostas paralelamente à sua superfície e, mais externamente, tecido ósseo.

Grupo controle – incisivo

Germes dentais típicos do grupo dos incisivos, bem constituídos e com todos os elementos estruturais presentes, foram identificados (Figs. 14 e 15).

Circundava a sua extremidade incisal uma estrutura de tecido epitelial, sem definição precisa, exceto a camada ameloblástica, constituída por células não muito altas com núcleos basais.

O esmalte era espesso, situava-se na superfície vestibular do órgão e adelgava-se em direção apical.

A dentina, espessa na superfície voltada para a face vestibular e delgada na volta para a face lingual, e a pré-dentina eram atravessadas pelos prolongamentos odontoblásticos. Os odontoblastos não eram muito altos e possuíam núcleos basais.

O tecido pulpar era de tecido conjuntivo rico em células e em vasos sanguíneos. Circundando o órgão dental havia tecido conjuntivo, rico em células dispostas paralela ou obliquamente em relação a ele; mais externamente havia tecido ósseo.

Grupo tratado – incisivo

Nada havia nestes casos que diferisse da descrição feita para o grupo controle (Fig. 16). Todas as estruturas descritas para os órgãos dentais dos animais do grupo controle repetiam-se nas peças examinadas dos animais do grupo tratado.

DISCUSSÃO

Os resultados encontrados neste trabalho mostram que o desenvolvimento dos germes dentais dos animais controle é compatível com os dados encontrados na literatura, nas diferentes etapas de observação, tanto para os molares^{1,5} quanto para os incisivos⁵.

Entretanto, quando comparados os resultados obtidos entre os animais controle com os tratados pôde-se notar algumas diferenças; particularmente, nas observações feitas com 1 e com 3 dias após o nascimento, foi evidente a diminuição da espessura das camadas de tecidos mineralizados nas peças obtidas dos animais do grupo tratado em relação àquelas obtidas dos animais do grupo controle.

Essas observações corroboram os relatos de que a alteração na deposição extracelular do colágeno determina um efeito supressivo quer em relação à morfogênese das glândulas salivares "in vitro"⁴ quer com relação ao desenvolvimento dos germes dentais^{3,8,9}. Da mesma forma, reforçam os relatos de que supressão do desenvolvimento é imposta aos germes dentais de camundongos, "in vitro", pela adição de beta-aminopropionitrila ao meio de cultura^{10,11,12}, através da alteração da deposição extracelular de fibras colágenas. Essas observações vão ao encontro das afirmações de que outras substâncias que, diferentemente das latirogênicas, alteram a biossíntese intracelular ou a secreção dos precursores do colágeno inibem a morfogênese dental "in vitro"^{2,6}.

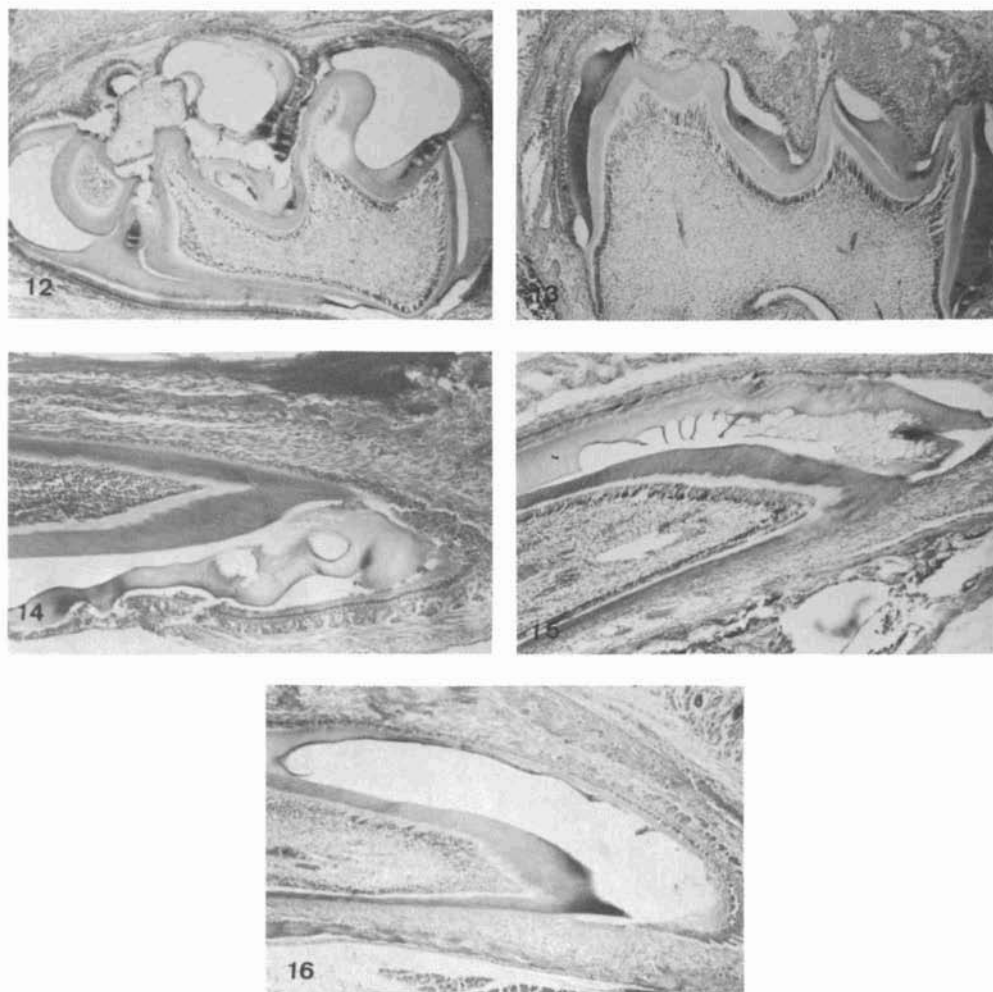


FIG. 12 - Germe dental de molar tratado, 8 dias após o nascimento. H.E. 63X.
 FIG. 13 - Germe dental de molar tratado, 10 dias após o nascimento. H.E. 63X.
 FIG. 14 - Germe dental de incisivo controle, 8 dias após o nascimento. H.E. 63X.
 FIG. 15 - Germe dental de incisivo controle, 10 dias após o nascimento. H.E. 63X.
 FIG. 16 - Germe dental de incisivo tratado, 8 dias após o nascimento. H.E. 63X.

Por outro lado, os resultados por nós obtidos aos 8 e aos 10 dias após o nascimento foram perfeitamente comparáveis entre as peças obtidas dos animais dos grupos controle e tratado. Em outras palavras, as diferenças detectadas nos tempos iniciais de observação não foram identificadas nos períodos mais longos, o que significa que houve uma recuperação da defasagem inicialmente verificada. Essa observação mostra a recuperação dos efeitos produzidos pelo aminoacetnitrila sobre o desenvolvimento do germe dental, à semelhança do que foi des-

critico sobre a reversibilidade dos efeitos produzidos "in vitro" pela colagenase sobre a morfogênese das glândulas salivares⁴ e sobre o desenvolvimento do germe dental⁸.

A recuperação, sob todos os aspectos, da supressão do desenvolvimento "in vitro" dos germes dentais determinada pela adição de beta-aminopropionitrila ao meio de cultura¹⁰ também encontra apoio nos resultados obtidos neste trabalho, aos 8 e aos 10 dias após o nascimento.

Ainda, os efeitos produzidos pela azetidina^{2,14}, ou pelo dipiridil⁶ que alteram a biossíntese intracelular ou a secreção dos precursores do colágeno "in vitro" inibindo a morfogênese dos germes dentais os quais, entretanto, se recuperam quando os germes são recolocados em meio controle, proporcionam idêntica interpretação a respeito da reversibilidade dos efeitos determinados pelo aminoacetonitrila, neste trabalho.

Embora seja difícil correlacionar os presentes dados com os referentes aos efeitos de latirogênicos quando administrados em altas doses ou por períodos prolongados em babuínos, durante o período de gestação, nos quais são relatadas malformações do desenvolvimento como fenda palatina¹⁷, ou ainda, quando administrados por longo tempo, durante o período de amamentação, em ratos, determinam alterações do desenvolvimento dos órgãos dentais^{7,13}, é possível inferir-se a ocorrência de tais alterações.

Por sua vez, a presença de áreas de dentina, descritas como de osteodentina em nossos resultados, que ocorreram nos órgãos dentais de incisivos, inclusive de animais controle, deve corresponder à "dentina irregular" descrita por HAY⁵ a qual é depositada formando uma camada sob a forma de casquete na extremidade anterior da papila dental e que além de, aparentemente, não possuir túbulos dentinários contém no seu interior odontoblastos e algumas células da polpa; esta dentina continua-se com a dentina tubular normal. O aparecimento precoce da dentina irregular sugere que ela é parte do processo normal do desenvolvimento e não o resultado de injúria, como implica o termo "dentina secundária"⁵.

CONCLUSÕES

O aminoacetonitrila determina, nas condições experimentais deste trabalho, um retardo no desenvolvimento do germe dental, caracterizado pela presença de camadas menos espessas de tecido mineralizado a 1 e aos 3 dias de idade; posteriormente, há uma recuperação da fase de desenvolvimento não se identificando diferenças entre os germes dentais aos 8 e aos 10 dias após o nascimento.

AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP –, Processo nº 84/1681-7 e Processo nº 85/2971-1 e ao Conselho Nacional de Tecnologia e Desenvolvimento – CNPq, Processo nº 408511/85-BM, pelos Auxílios concedidos.

DEKON, S. F. de C. *et alii* – Study of transplacentally acquired aminoacetonitrile on mice tooth germs development. **Rev. Odont. UNESP**, São Paulo, 17(1/2):63-72, 1988.

ABSTRACT: *It was studied the effect of transplacentally acquired aminoacetonitrile during 3 days on mice tooth germs development. The offsprings were sacrificed at 1, 3, 8 and 10 days after birth. The results showed that aminoacetonitrile reversibly delays the tooth germs development, once that at 8 and 10 days after birth the morphologic aspects of tooth germs are quite similar.*

KEY-WORDS: *Odontogenesis; aminoacetonitrile.*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. COHN, S. A. – Development of the molar teeth in the albino mouse. *Am. J. Anat.*, 101: 295-317, 1957.
2. GALBRAITH, D. B. & KOLLAR, E. J. – Effects of L-azetidine-2-carboxylic acid, a proline analogue, on the "in vitro" development of mouse tooth germs. *Arch. oral Biol.*, 19: 1171-6, 1974.
3. GERBER, R.; KARCHER-DJURICIC, V. & RUCH, J. V. – Collagenase et différenciation des adamantoblastes. *C.R.S. Soc. Biol.*, 165: 2173-6, 1971.
4. GROBSTEIN, G. & COHEN, T. – Collagenase: effect on the morphogenesis of embryonic salivary epithelium "in vitro". *Science*, 150: 626-8, 1965.
5. HAY, M. F. – The development "in vivo" and "in vitro" of the lower incisor and molars of the mouse. *Arch. oral Biol.*, 3: 86-109, 1961.
6. HETEM, S.; KOLLAR, E. J.; CUTLER, L. S. & YAEGER, J. A. – Effect of α , α' – dipirydil on the basement membrane of tooth germes "in vitro". *J. dent. Res.*, 54: 783-7, 1975.
7. KENNEDY, G. D. C. & KENNEDY, J. S. – An autoradiographic study of the dental lesions of lathyrism in the rat. *Arch. oral Biol.*, 8: 207-17, 1963.
8. KOCH, W. – The effect of collagenase on embryonic mouse incisors growing "in vitro". *Anat. Rec.*, 160: 377-8, 1968.
9. KOCH, W. E. – Tissue interaction during "in vitro" odontogenesis. In: SLAVKIN, H. C. & BAVETTA, L. A., eds – *Developmental aspects of oral biology*. New York, Academic Press, 1972.
10. KOLLAR, E. J. – Histogenetic aspects of dermal-epidermal interactions. In: SLAVKIN, H. C. & BAVETTA, L. A., eds. – *Developmental aspects of oral biology*. New York, Academic Press, 1972.
11. KOLLAR, E. J. – The development of the integument: spatial, temporal and phylogenetic factors. *Amer. Zool.*, 12: 125-35, 1972.
12. KOLLAR, E. J. & BAIRD, G. – Inhibition of tooth germ development by beta amino-propionitrile. *Anat. Rec.*, 166: 33, 1970.
13. KRIKOS, G. A. – The effects of beta-aminopropionitrile upon the molar teeth of the rat. *J. dent. Res.*, 38: 27-35, 1959.
14. RUCH, J. V.; FABRE, M.; KARCHER-DJURICIC, V. & STÄVBLI, A. – The effects of the L-azetidine-2-carboxylic acid (analogue of proline) on dental cytodifferentiations "in vitro". *Differentiation*, 2: 211-20, 1974.
15. SLAVKIN, H. C. – Intercellular communication during odontogenesis. In: SLAVKIN, H. C. & BAVETTA, L. A., eds. – *Developmental aspects of oral biology*. New York, Academic Press, 1972.
16. SLAVKIN, H. C. – Embryonic tooth formation. A tool for developmental biology. In: MELCHER, A. H. & ZARB, G. A., ed. – *Oral sciences reviews*. Copenhagen, Munksgaard, 1974. v.4.
17. STEFFEK, A. J. & HENDRICKX, A. G. – Lathrogen-induced malformations in baboons: a preliminary report. *Teratology*, 5: 171-80, 1972.

Recebido para publicação em 02.02.87