

## DESENVOLVIMENTO DO GERME DENTAL DO HAMSTER SOB AÇÃO DO ÁCIDO ACETILSALICÍLICO

Daniela GARCIA\*

Lizeti Toledo de Oliveira RAMALHO\*\*

- **RESUMO:** A relação entre os efeitos do ácido acetilsalicílico (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 e 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. Dessa maneira, propusemo-nos analisar microscopicamente os germes de molares dos filhotes sacrificados com 1, 3, 5 e 10 dias após o nascimento e constatamos alterações estruturais desses germes.
- **PALAVRAS-CHAVE:** Mesocricetus; prenhez; 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: no rato, 21 dias; no camundongo, 19 dias; e no hamster, 16 dias.<sup>5</sup>

\* 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.

Pelo fato de o desenvolvimento embrionário do hamster ser extremamente curto (16 dias), a odontogênese processa-se em poucos dias, e por ser um órgão altamente diferenciado, as células do germe dental estão sujeitas a agressões diversas, tais como: da vimblastina<sup>7</sup> do actinomycin D<sup>8</sup> pelo fluoreto;<sup>1,2,4,9,13</sup> da colchicina;<sup>3</sup> do 1-p-bromotetramisole;<sup>12</sup> de metais pesados (chumbo, zinco, arsênio, cobre e índio;<sup>14</sup> do cádmio,<sup>15</sup> e da methotrexate<sup>21</sup>). Sabemos que o ácido acetilsalicílico (aspirina) é um fármaco analgésico, antipirético e antiinflamatório amplamente utilizado na nossa sociedade e sem o devido acompanhamento médico. O seu uso indiscriminado pode provocar um quadro de intoxicação chamado salicilismo, cujos sinais e sintomas 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.<sup>8, 19</sup> Também sabemos, por meio de estudos concluídos, que a ação analgésica do ácido acetilsalicílico ocorre em concentrações que variam de 50 mg/Kg a 300 mg/Kg e a ação antiinflamatória em pequenas concentrações de 10 mg/Kg.<sup>10</sup> 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 acetilsalicílico (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 (120 g 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 18 h de um dia até às 8 h da manhã seguinte. Às 8 h 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 a administrar aos hamsters fêmeas prenhes, via oral, o ácido acetilsalicílico (aspirina, comprimidos 500 mg – Bayer, Ind. Bras.) na dose de 65 mg/Kg, diluído em água.

Essa administração foi dividida em 2 doses diárias,<sup>22</sup> 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 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 de controle às 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 (Virbac do Brasil – Ind. Com. Ltda.) na dose de 0,08 mL/100g de peso corporal associado com Virbaxyl), 2%, relaxante muscular, analgésico e sedativo na dose de 0,04 mL/100g, via intramuscular. Esse procedimento foi realizado nos animais com 1, 3, 5 e 10 dias de vida, sendo usado um total de 35 filhotes, que foram decapitados; as cabeças foram imersas em formol neutro tamponado,<sup>11</sup> permanecendo no líquido fixador durante 3 dias. As reações 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 por meio da rotina histológica de desidratação em alcoóis crescentes, diafanização em xilol, embebição e inclusão em parafina, confecção dos blocos, identificação criteriosa e microtomia (micrótomo rotatório Microm, modelo HM 325, Espanha) com 6 µm de espessura em cortes frontais. As lâminas foram submetidas à coloração de rotina por hematoxilina e eosina para análise morfológica dos eventos ocorridos sobre os germes dentários em desenvolvimento e posterior documentação fotográfica.

Procedemos à 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 de 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 isso o fotomicroscópio óptico comum (Zeiss, modelo Jenaval).

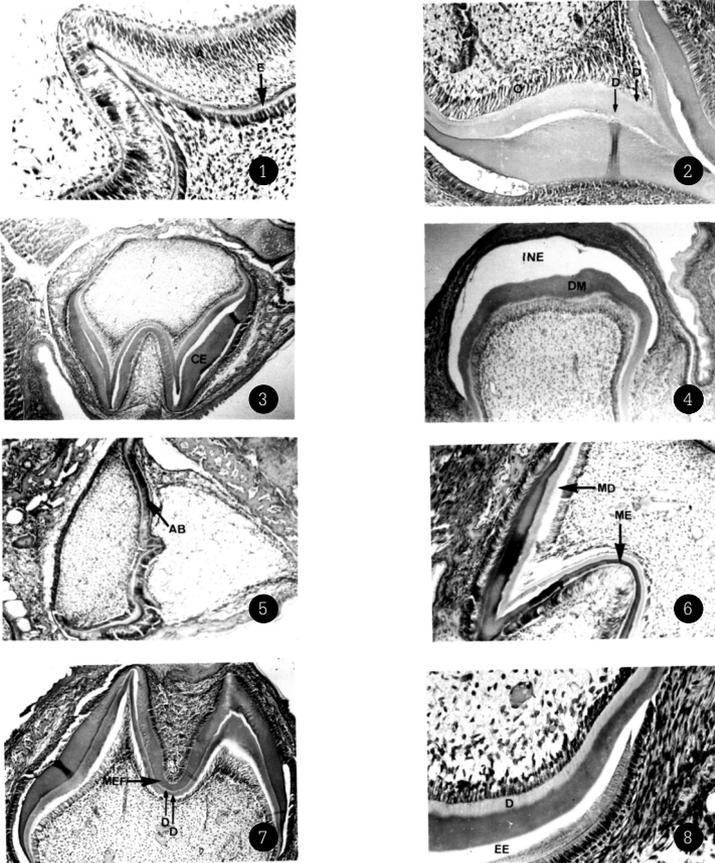


FIGURA 1 – Primeira camada de esmalte (E) e ameloblastos (A) em paliçada. H.E. 250x.

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.

## Resultado

### Grupo de 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 por isso com menor diferenciação em relação àqueles situados na altura das cúspides.

### Grupo de 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 de controle de 5 dias

Duas 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 de 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 res-

tringe 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

Duas 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 e a camada anteriormente formada já se encontra mineralizada oferecendo estreita faixa de imagem negativa. Os odontoblastos produzem estreita camada de dentina circumpulpar (Figura 8).

#### Discussão

Existem poucos estudos sobre como o germe dental dos golden hamster desenvolve-se (proliferação e diferenciação das células, mineralização, vascularização), bem como sobre a maneira que esse germe se comporta mediante o contato com algumas substâncias. A invasão de vasos sanguíneos em meio às células do retículo estrelado deve-se à penetração desses vasos por entre as dobras ou vilosidades formadas pelas células do epitélio externo; essas células se modificam para permi-

tir que os nutrientes necessários cheguem 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 e o retardo da mineralização de esmalte e de dentina, e, com isso, o atraso da amelogênese e da dentinogênese. Alguns pesquisadores chegaram a essas conclusões, porém utilizando substâncias diferentes do ácido acetilsalicílico.

Kiguel<sup>8</sup>, por exemplo, sugeriu que a fosfatase alcalina é necessária para a diferenciação celular e a proliferação durante os estágios de morfogênese dos germes dentais. Fleisch<sup>6</sup> contestou que a função da fosfatase alcalina seja 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 acetilsalicílico, a partir do grupo experimental de 3 dias até o grupo experimental de 10 dias.

De acordo com Roger et al.,<sup>18</sup> o desenvolvimento embrionário dos golden hamster é curto, de 16 dias, dos quais quase metade é gasta com a embriogênese para compensar a demora na implantação que se processa 6 dias após o coito. Estudaram a embriogênese desde 2 horas após o coito até o 16º dia da gestação e com isso toda a 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.

Esse fato pôde ser ainda mais profundamente comprovado por Ferm<sup>5</sup> 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 concluiu que esses metais causam síndromes específicas ou malformações de desenvolvimento. Isso ocorre porque muitos desses metais são componentes de algumas metaloenzimas e interferem com elas durante os estágios de desenvolvimento. Ferm chegou também a observar que a placenta é permeável aos metais pesados, permitindo-nos a comprovação do resultado quando observamos as alterações do ácido acetilsalicílico.

Wöltgens et al.<sup>20</sup> 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 a afirmar que ocorrem alterações dentárias importantes após diferentes agressões durante a odontogênese. Lyaruu et al.<sup>15</sup> 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<sup>6</sup> de flúor por 24 horas 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 acetilsalicílico na análise do grupo experimental de 5 dias. Dois anos depois, os mesmos autores<sup>16</sup> estudaram os efeitos da actinomycin D no desenvolvimento do germe dental do hamster, 1 dia pós-natal, e observaram que os ameloblastos se encontram normais no grupo de controle, mas no grupo experimental houve alteração celular de pré-ameloblastos e pré-odontoblastos afetando, dessa maneira, o processo de proliferação e diferenciação destes, semelhante aos achados com o hamster que recebeu o ácido acetilsalicílico. Um ano após a pesquisa anterior, Lyaruu et al.<sup>17</sup> administraram Daunorubicin à mãe durante a gestação e observaram 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 pesquisar acontecimentos gestacionais para que as descobertas venham a evitar as várias alterações deletérias e permanentes, sejam gerais, sejam locais.

## Conclusão

Com base nos achados histológicos analisados, obtivemos como conclusões:

- O ácido acetilsalicílico promove alteração celular, principalmente dos ameloblastos e dos odontoblastos, atrasando o processo de diferenciação dessas 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 esmalte e dentina finos e, por isso, hipomineralizados.

## Agradecimentos

Aos senhores Luís Antônio Potenza e Pedro Sérgio Simões, técnicos do laboratório de Histologia, pelo processamento histológico e pelo cuidado com os animais.

GARCIA, D., RAMALHO, L. T. O. Hamster tooth germ development under acetylsalicylic acid action. *Rev. Odontol. UNESP (São Paulo)*, v.30, n.1, p.31-41, jan./jun. 2001.

- **ABSTRACT:** The relationship among the effects of the acid acetylsalicylic (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, 3, 5 and 10 days after the birth and we verified structural alterations of those germ.
- **KEYWORDS:** Mesocricetus; pregnancy, animal; 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 tooth germs in organ culture in vitro. *Arch. Oral Biol. (Oxford)*, v.29, n.10, p.803-10, 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.181-91, 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 concentrations of fluoride on enamel formation in hamster tooth-germs in organ culture in vitro. *Arch. Oral Biol. (Oxford)*, v.29, n.10, p.811-9, Oct. 1984.
- 5 FERM, V.H. Teratogenic effects and placental permeability of heavy metals. *Curr. Top. Pathol. (Berlin)*, v.61, p.145-51, 1976.
- 6 FLEISCH, H. Role of nucleation and inhibition of calcification. *Clin. Orthop.*, v.32, p.170-80, 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.71-7, Jan./Feb. 1964.
- 9 KOCH, W. E. In vitro development of tooth rudments of embryonic mice. *Anat. Rec. (New York)*, v.152, p.513-24, 1965.
- 10 LAOUI, K. et al. Analgesic and anti-inflammatory activity of Saponins of spinoza. *Ann. Pharm. Fr. (Paris)*, v.56, p.220-8, 1998.
- 11 LILLIE, R. D. Histopathologic technic and pratical histochemistry. New York: McGraw-Hill, 1954.
- 12 LYARUU, D. M., WÖLTGENS, J. H. M., BERVOETS, T. J. M. Effect of alkalinephosphatase inhibition by 1-p-bromotetramisole on the formation of trichloroacetic acid [32 P]-insoluble phosphate from inorganic [32 P]-phosphate and [32 P]pyrophosfatase in non-mineralizing and mineralizing hamster molar tooth-germs in vitro. *Arch. Oral Biol. (Oxford)*, v.32, n.6, p.429-32, June 1987.
- 13 LYARUU, D. M. et al. Ultrastrutural study of fluoride-induced in vitro hypermineralization of enamel in hamster tooth-germ explanted during yhe secretory phase of amelogenesis. *Arch. Oral Biol. (Oxford)*, v.31, n.2, p.109-17, Feb. 1986.
- 14 \_\_\_\_\_. 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.107-15, Feb. 1987.
- 15 \_\_\_\_\_. Effects of vincristing on the developing hamster toothgerm in vitro. *Connect. Tissue Res. (London)*, v.32, n.1/4, p.281-9, 1995.
- 16 \_\_\_\_\_. Effects of vitro Actinomycin D on developing hamster molar tooth-germ in. *Eur. J. Oral. Sci. (Cambridge)*, v.105, n.1, p.52-8, 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.343-50, 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.1402-11, 1999.
- 20 WÖLTGENS, J. H. M., BERVOETS, J. M., LYARUU, D. M. The effects of cadmium on the p-nitrophenil phosphatase and inorganic pyrofosfatase activities of alkaline phosphatase in developing hamster tooth-germ. *Arch. Oral. Biol. (Oxford)*, v.34, n.7, p.591-2, 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.156-9, 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.