

# **EFEITOS DO AMINOACETONITRILA E DO BETA-AMINOPROPIONITRILA SOBRE O DESENVOLVIMENTO DO GERME DENTAL DE MOLAR *IN VITRO***

Sebastião HETEM\*

Carla de Jesus de Almeida SCAPINELLI\*\*

- **RESUMO:** Germes dentais de molares de fetos de camundongos com 14 ou com 17 dias foram cultivados na presença de 100 µg/ml ou 150 µg/ml tanto de aminoacetoneitrila quanto de beta-aminopropionitrila. Os resultados não mostraram efeito anormal aparente sobre o desenvolvimento do germe dental.
- **PALAVRAS-CHAVE:** Desenvolvimento do germe dental; drogas latirogênicas; cultura de tecido.

## **Introdução**

Depois da observação de que a colagenase, irreversivelmente, inibe a morfogênese das glândulas salivares *in vitro*,<sup>4</sup> muitos trabalhos apareceram mostrando o efeito supressivo determinado pela interrupção da síntese de colágeno sobre o desenvolvimento do germe dental.<sup>3,8,9</sup> A supressão do desenvolvimento do germe dental ocorre pela adição de beta-aminopropionitrila à cultura de órgãos de germes dentais embrionários do camundongo.<sup>10,12</sup>

---

\* Departamento de Morfologia – Faculdade de Odontologia – FEB – 14783-226 – Barretos – SP.

\*\* Monitora de Histologia e Embriologia – Departamento de Morfologia – Faculdade de Odontologia – FEB – 14783-226 – Barretos – SP.

Entretanto, quando as culturas inibidas são colocadas em meio controle, os germes dentais recuperam-se e são normais sob todos os aspectos.<sup>11</sup> Por sua vez, foi mostrado que o aminoacetonitrila determina um pequeno atraso, reversível, no desenvolvimento do germe dental *in vitro*.<sup>6</sup>

Neste trabalho são estudados os efeitos do aminoacetonitrila e do beta-aminopropionitrila em diferentes concentrações sobre o desenvolvimento do germe dental de fetos com 14 ou com 17 dias *in vitro*.

## Material e método

Germes dentais de fetos de camundongo albino com 14 ou com 17 dias foram usados.

Fêmeas grávidas foram sacrificadas pela inalação de clorofórmio, os fetos foram removidos assepticamente e preservados em solução balanceada de Hanks. Os germes dentais dos molares inferiores, tanto do lado direito quanto do lado esquerdo, foram dissecados com o auxílio de um estereomicroscópio. Os germes dentais foram mantidos na solução de Hanks até serem incubados a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar em uma atmosfera umidificada.

Os germes dentais foram cultivados durante 6 a 8 dias em gel de colágeno com a seguinte constituição: 1,0 ml de Eagle's Minimum Essential Medium\*, 0,5 ml de bicarbonato de sódio, 7,5%\* e 8,5 ml de solução de colágeno (tipo I). Foi colocado 1 ml do gel de colágeno em cada depressão de um suporte de plástico com várias depressões, e os germes dentais introduzidos em pequenos orifícios que foram feitos no gel. Sobre o gel de colágeno foi adicionado meio de Pratt (50% de DMEM + 50% de F 12 e Premix), juntamente com 1% de glutamina.

Além dos germes dentais cultivados por 6 a 8 dias, alguns germes dentais foram dissecados e fixados assim que foram obtidos.

O meio experimental era constituído de meio controle com a adição de 100 µg/ml ou 150 µg/ml de aminoacetonitrila ou de beta-aminopropionitrila. Também, alguns germes dentais foram cultivados por dois dias no meio experimental e depois transferidos para o meio controle onde ficaram por mais cinco dias.

Ambos os meios de cultura, controle e experimental, foram trocados a cada dois dias.

---

\* GIBCO BRL - Products, New York, NY, USA.

Depois do período experimental, os germes dentais foram fixados em paraformaldeído a 4% e em gluteraldeído a 0,25% e incluídos em parafina ou em historresina. Os blocos de parafina foram cortados com a espessura de 6  $\mu\text{m}$  e corados com hematoxilina e eosina, e aqueles da historresina foram cortados com a espessura de 2,5  $\mu\text{m}$  e corados com Azul II e Azul de Metileno (AM), para análises em microscopia de luz.

## **Resultado**

### **Animal com 14 dias**

Depois de 7 dias de cultivo em meio controle, o germe dental mostrou uma evolução evidente quando comparado com o germe dental recém-obtido (Figura 1); em seu desenvolvimento havia alcançado o estágio de campânula. No órgão do esmalte foi possível identificar todas as 4 camadas. Os ameloblastos apareciam como células colunares, com núcleos basais e citoplasma apical com vacúolos.

A papila dental mostrou os odontoblastos como uma camada com núcleos polarizados e as outras células com a forma estrelada e núcleos arredondados.

As estruturas do saco dental situavam-se perto da superfície do germe dental. Figuras mitóticas estavam presentes tanto nas estruturas epiteliais quanto nas mesenquimais.

Depois de 2 dias de cultivo tanto com 100  $\mu\text{g/ml}$  de aminoacetonitrila (Figura 2) ou de beta-aminopropionitrila (Figura 3) quanto com 150  $\mu\text{g/ml}$  de aminoacetonitrila (Figura 4) seguidos por 5 dias em meio controle, as características gerais dos germes dentais eram muito semelhantes àquelas encontradas nos germes dentais cultivados por 7 dias no meio controle.

Assim, tanto o epitélio interno quanto o externo, o retículo estrelado e o estrato intermediário foram facilmente identificados sem nenhuma característica diferente daquelas encontradas nos germes dentais cultivados por 7 dias no meio controle.

Resultados idênticos foram encontrados na papila dental e nas estruturas do saco dental. Figuras mitóticas foram encontradas em ambos os tecidos epitelial e conjuntivo.

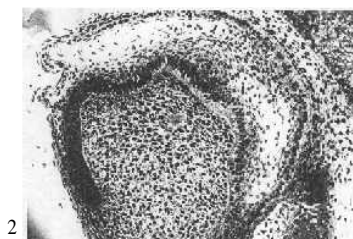
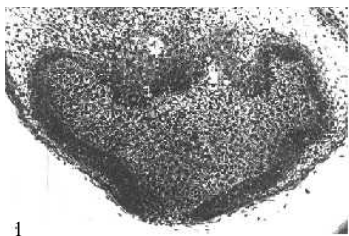


FIGURA 1 – Germe dental de animal com 14 dias cultivado por 7 dias em meio controle. AII + AM.157,5X.

FIGURA 2 – Germe dental de animal com 14 dias cultivado por 2 dias em meio com 100 µg/ml de aminoacetnitrila seguidos por 5 dias em meio controle. AII + AM. 162,5X.

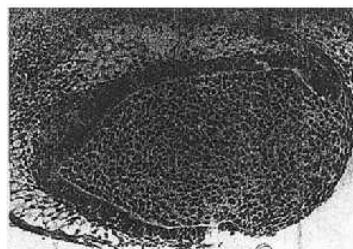
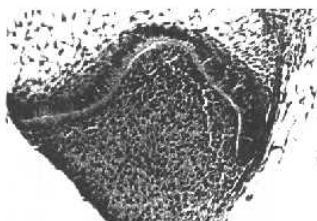


FIGURA 3 – Germe dental de animal com 14 dias cultivado por 2 dias em meio com 100 µg/ml de beta-aminopropionitrila seguidos por 5 dias em meio controle. HE. 275X.

FIGURA 4 – Germe dental de animal com 14 dias cultivado por 2 dias em meio com 150 µg/ml de aminoacetnitrila seguidos por 5 dias em meio controle. HE. 187,5X.

Da mesma forma, quando os germes dentais foram cultivados por 8 dias com 100 µg/ml de aminoacetnitrila (Figura 5) ou de beta-aminopropionitrila (Figura 6), ou por 7 dias com 150 µg/ml de aminoacetnitrila (Figura 7) ou por 6 dias com beta-aminopropionitrila (Figura 8), foram encontrados órgãos do esmalte com estruturas bem diferenciadas; a camada ameloblástica apresentava-se como células colunares, com núcleos basais e alongados e citoplasma abundante e com vacúolos.

Os odontoblastos estavam revestindo a papila dental como uma camada de células bem definidas com os núcleos basais arredondados e citoplasma basofílico.

As outras células da papila dental não estavam diferenciadas, apresentavam-se em grande número e separadas por uma pequena quantidade de substância intersticial.

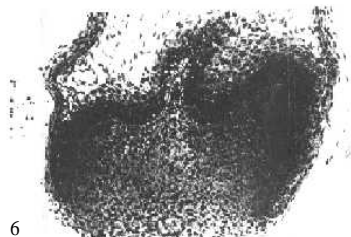
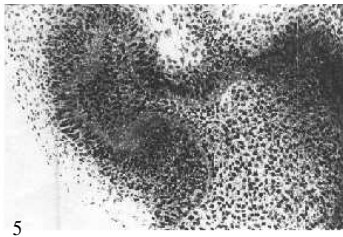


FIGURA 5 – Germe dental de animal com 14 dias cultivado por 8 dias em meio com 100 µg/ml de aminoacetnitrila. AII + AM. 187,5X.

FIGURA 6 – Germe dental de animal com 14 dias cultivado por 8 dias em meio com 100 µg/ml de beta-aminopropionitrila. AII + AM. 195X.

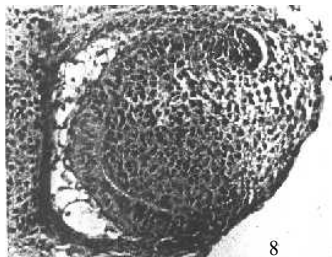
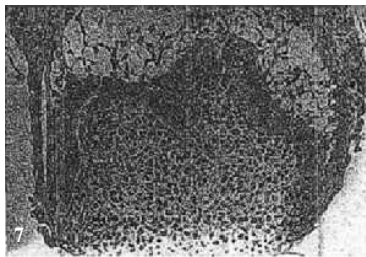


FIGURA 7 – Germe dental de animal com 14 dias cultivado por 7 dias em meio com 150 µg/ml de aminoacetnitrila. HE. 187,5X.

FIGURA 8 – Germe dental de animal com 14 dias cultivado por 6 dias em meio com 150 µg/ml de beta-aminopropionitrila. HE. 250X.

As estruturas do saco dental podiam ser vistas ao redor do germe dental que já tinha atingido o estágio de campânula em seu desenvolvimento. Figuras mitóticas foram vistas tanto no tecido epitelial quanto no tecido conjuntivo.

### **Animal com 17 dias**

Depois de 7 dias de cultivo em meio controle, os germes dentais mostraram uma clara evolução quando comparados com suas características quando foram obtidos (Figura 9).

O órgão do esmalte estava com suas camadas normais e a alça cervical, profundamente projetada dentro do tecido conjuntivo, em direção apical.



FIGURA 9 – Germe dental de animal com 17 dias cultivado por 7 dias em meio controle. HE.125X.

Os ameloblastos apresentavam-se como células colunares com núcleos basais e vacúolos no citoplasma.

Na papila dental, a camada odontoblástica estava bastante evidente e apresentava-se como células alongadas com núcleos basais e citoplasma abundante. As outras células da papila estavam mais concentradas perto do órgão do esmalte e da abertura cervical. Em alguns casos, uma fina camada de pré-dentina foi vista.

As estruturas do saco dental mostravam células achatadas e substância intersticial ao redor do germe dental.

Figuras mitóticas foram vistas tanto no tecido epitelial quanto no tecido conjuntivo.

Depois de 2 dias de cultivo em meio tanto com 100 µg/ml de aminoacetoneitrila (Figura 10) ou de beta-aminopropionitrila (Figura 11) quanto com 150 µg/ml de aminoacetoneitrila (Figura 12) ou de beta-aminopropionitrila (Figura 13) (seguidos por 5 dias em meio controle os germes dentais) estavam em um estágio avançado de desenvolvimento quando comparados com os aspectos encontrados quando eles foram obtidos.

As alças cervicais estavam muito alongadas, e as camadas do órgão do esmalte eram de fácil identificação; os ameloblastos apresentavam-se como células colunares, com núcleos basais e alongados e grande quantidade de citoplasma com vacúolos.

Os odontoblastos estavam revestindo a papila dental como uma camada de células cilíndricas baixas com os núcleos basais e citoplasma não muito abundante.

As outras células da papila dental apresentavam-se separadas uma das outras por uma quantidade razoável de substância intersticial e estavam apinhadas perto do órgão do esmalte e da abertura cervical.



FIGURA 10 – Germe dental de animal com 17 dias cultivado por 2 dias em meio com 100 µg/ml de aminoacetnitrila seguidos por 5 dias em meio controle. AII + AM. 162,5X.

FIGURA 11 – Germe dental de animal com 17 dias cultivado por 2 dias em meio com 100 µg/ml de beta-aminopropionitrila seguidos por 5 dias em meio controle. HE. 207,5X.

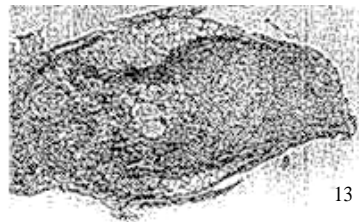


FIGURA 12 – Germe dental de animal com 17 dias cultivado por 2 dias em meio com 150 µg/ml de aminoacetnitrila seguidos por 5 dias em meio controle. AII + AM. 185X.

FIGURA 13 – Germe dental de animal com 17 dias cultivado por 2 dias em meio com 150 µg/ml de beta-aminopropionitrila seguidos por 5 dias em meio controle. HE.102X.

Algumas vezes, uma fina camada de pré-dentina foi encontrada. As estruturas do saco dental foram vistas como células e substância intersticial paralelas e ao redor da superfície do germe dental.

Figuras mitóticas foram vistas tanto no tecido epitelial quanto no conjuntivo.

Depois de 6 ou 7 dias de cultivo em meio com 100 µg/ml de aminoacetnitrila (Figura 14) ou de beta-aminopropionitrila (Figura 15), ou 150 µg/ml de aminoacetnitrila (Figura 16) ou de beta-aminopropionitrila (Figura 17), o germe dental se apresentou bem desenvolvido. Todas as camadas do órgão do esmalte estavam presentes; a camada ameloblástica apresentava-se como células colunares, com núcleos basais alongados, citoplasma abundante e com vacúolos.

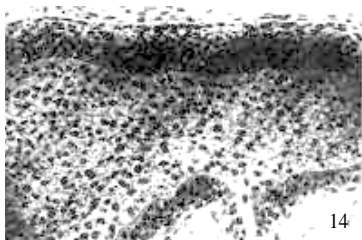


FIGURA 14 – Germe dental de animal com 17 dias cultivado por 6 dias em meio com 100 µg/ml de aminoacetnitrila. AII + AM. 287,5X.

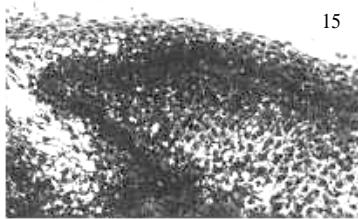


FIGURA 15 – Germe dental de animal com 17 dias cultivado por 7 dias em meio com 100 µg/ml de beta-aminopropionitrila. AII + AM. 230X.



FIGURA 16 – Germe dental de animal com 17 dias cultivado por 6 dias em meio com 150 µg/ml de aminoacetnitrila. HE. 250X.

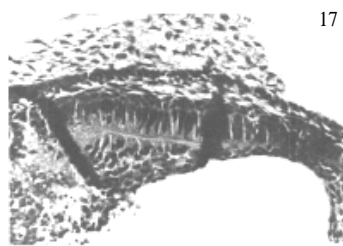


FIGURA 17 – Germe dental de animal com 17 dias cultivado por 7 dias em meio com 150 µg/ml de beta-aminopropionitrila. HE. 312,5X.

Os odontoblastos e as outras células da papila dental eram muito semelhantes àquelas encontradas nos germes dentais cultivados por 7 dias em meio controle, assim como as estruturas do saco dental.

## Discussão

Os resultados encontrados neste trabalho mostram que o desenvolvimento do germe dental do molar do camundongo *in vitro* é compatível com o descrito na literatura,<sup>2,5</sup> tanto para os espécimes controle quanto para os tratados.

Essas observações, entretanto, não estão de acordo com os efeitos das drogas latirogênicas observados anteriormente sobre o desenvolvimento do



germe dental quer *in vivo*,<sup>6</sup> quer *in vitro*.<sup>10,12</sup> Assim, os resultados descritos aqui sugerem que as alterações na deposição da matriz colagenosa, as quais determinam efeito supressivo na morfogênese das glândulas salivares,<sup>4</sup> bem como sobre o desenvolvimento do germe dental *in vitro*,<sup>3,8,9</sup> devem ter ocorrido sob condições mais severas do que as usadas neste trabalho. Essa observação é particularmente evidente quando comparada com a descrição das observações obtidas com o uso do beta-aminopropionitrila no desenvolvimento do germe dental *in vitro*;<sup>10,12</sup> nesse caso, os germes dentais dos incisivos e dos molares inferiores do embrião de camundongo foram tratados com 1-5 mM/ml de beta-aminopropionitrila adicionados ao meio de Eagle em ágar solidificado, resultando em uma concentração da droga no meio de cultura maior do que a usada neste trabalho. Certamente essa concentração conduziria às diferenças nos resultados descritos anteriormente. Assim, não se aceita que o colágeno não possua um importante papel como agente estabilizador durante a morfogênese,<sup>10</sup> mas existe, provavelmente, um nível de concentração mínimo de aminoacetona ou de beta-aminopropionitrila, no meio de cultura, suficiente para determinar efeitos deletérios sobre o desenvolvimento e sobre a morfogênese, o qual não foi alcançado nas condições usadas neste trabalho. Essa idéia é reforçada pelos efeitos mais conspícuos produzidos pelo aminoacetona sobre o desenvolvimento do germe dental quando doses maiores foram usadas.<sup>7</sup>

Por sua vez, nossos resultados corroboram as observações de ausência de anormalidade no esmalte dos dentes de ratos tratados com 0,2% de beta-aminopropionitrila na dieta sob exame macroscópico ou microscópico nos molares dos animais sacrificados depois de 3 e 6 dias com essa dieta, a despeito das evidentes mudanças nos ratos em experimentação no décimo terceiro dia do experimento.<sup>13</sup> De interesse, também, são as observações que, sob a ação do beta-aminopropionitrila, nas condições já apontadas, a estrutura da dentina e o número, a aparência e a organização dos odontoblastos e dos fibroblastos da polpa estavam normais tanto na coroa quanto nas partes cervicais da raiz do primeiro e do segundo molares, bem como a dentina, os odontoblastos, as fibras colágenas e os fibroblastos da membrana periodontal dos terceiros molares dos ratos experimentais,<sup>13</sup> com o que os nossos resultados poderiam ser entendidos como de acordo.

A administração tanto do beta-aminopropionitrila quanto do aminoacetona em chimpanzés, durante a época da formação do palato, resultou em reabsorções, abortos e defeitos esqueléticos; há uma grande discrepância nos resultados obtidos quando eles são comparados em razão da dose usada, e os autores não pretenderam propor uma relação casual entre a produção de fenda palatina e o tratamento com o aminoacetona.<sup>14</sup> Com esses resulta-

dos nossas observações não concordam, mas deve ser observado que muitos dos resultados relatados nos chimpanzés foram obtidos com o uso de diferentes dosagens das drogas, algumas vezes muito altas e por diferentes períodos de tempo, as quais podem ser responsáveis por tais resultados.

Nossos resultados também não concordam com as observações de que o latirismo materno produziu padrões maxilofaciais anômalos em fetos de ratos, porém, mais uma vez, deve ser salientado que as ratas foram alimentadas com uma mistura em partes iguais de ração granulada padrão e de sementes de *Lathyrus odoratus*.<sup>1</sup>

## Conclusão

Com base nos resultados alcançados nas condições experimentais deste trabalho, pode-se concluir que tanto o aminoacetnitrila quanto o beta-aminopropionitrila mostraram-se compatíveis com o desenvolvimento do germe dental *in vitro*, uma vez que não causaram nenhum efeito anormal aparente sobre ele.

## Agradecimento

Os autores desejam expressar seus agradecimentos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – Fapesp, que concedeu bolsa de estudo ao Prof. Sebastião Hetem (Proc. Odontologia nº 86/3049-1).

HETEM, S., SCAPINELLI, C. de J. A. Effects of aminoacetnitrile and beta-aminopropionitrile on molar tooth germ development *in vitro*. *Rev. Odontol. UNESP (São Paulo)*, v.31, n.2, p.179-190, 2002.

- **ABSTRACT:** Molar tooth germs of mouse foetuses of 14 and 17 days were cultured in the presence of 100 µg/ml or 150 µg/ml either of aminoacetnitrile or beta-aminopropionitrile. The results did not show any apparent abnormal effect on tooth germ development .
- **KEYWORDS:** Tooth germ/growth development; lathyrogen drugs; tissue culture.

## Referências bibliográficas

- 1 ABRAMOVICH, A., DEVOTO, F. C. H. Anomalous maxillo facial patterns produced by maternal lathyrisms in rat fetuses. *Arch. Oral Biol. (Oxford)*, v.13, n.7, p.823-6, July 1968.
- 2 COHN, S. A. Development of the molar teeth in the albino mouse. *Am. J. Anat. (New York)*, v.150, p.295-319, 1957.
- 3 GERBER, R., KARCHER-DJURICIC, V., RUCH, J. V. Collagenase et différenciation des adamantoblastes. *Comptes Rendus Société de Biologie (Paris)*, v.165, p.2173-6, 1971.
- 4 GROBSTEIN, C., COHEN, J. Collagenase: effect on the morphogenesis of salivary glands *in vitro*. *Science (Washington)*, v.150, p.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. (Oxford)*, v.3, n.2, p.86-109, Feb.1961.
- 6 HETEM, S., MATHEUS, M. T. G., DEKON, S. F. C. Estudo do desenvolvimento de germes dentais de camundongos submetidos à ação transplacentária de aminoacetnitrila. *Rev. Odontol. UNESP (São Paulo)*, v.17, n.1/2, p.63-72, 1988.
- 7 KENNEDY, G. D. C., KENNEDY, J. S. An autoradiographic study of the dental lesions of lathyrisms in the rat. *Arch. Oral Biol. (Oxford)*, v.8, n.2, p.207-17, Mar.-Apr. 1963.
- 8 KOCH, W. The effect of collagenase on embryonic mouse incisors growing *in vitro*. *Anat. Rec. (New York)*, v.160, p.377-8, 1968.
- 9 \_\_\_\_\_. Tissue interaction during *in vitro* odontogenesis. In: SLAVKIN, H. C., BAVETTA, L. A. (Ed.) *Developmental aspects of oral biology*. New York: Academic Press, 1972. p.151-64.
- 10 KOLLAR, E. J. The development of the integument: spacial, temporal and phylogenetic factors. *Am. Zool. (Thousand Oaks)*, v.12, p.125-35, 1972.
- 11 \_\_\_\_\_. The use of organ cultures of embryonic tooth germs for teratological studies. In: EBERT, J. D., MAROIS, M. (Ed.) *Tests of teratogenicity in vitro*. Amsterdam: North Holland, 1976. p.303-34.
- 12 KOLLAR, E. J., BAIRD, G. R. Inhibition of tooth germ development by beta-aminopropionitrile. *Anat. Rec. (New York)*, v.166, p.333, 1970.
- 13 KRIKOS, G. S. The effects of beta-aminopropionitrile upon the molar teeth of the rat. *J. Dent. Res., (Chicago)*, v.38, p.27-35, Jan.-Feb. 1959.
- 14 STEFFEK, A. J., HENDRICKX, A. G. Lathyrogen-induced malformations in baboons: a preliminary report. *Teratology (New York)*, v.5, n.2, p.171-3, Apr. 1972.