

EFEITO DA CICLOFOSFAMIDA SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE GERME DENTAL DO INCISIVO DO CAMUNDONGO

Maria Tereza Giroto MATHEUS*

Sebastião HETEM*

Oswaldo Marques GUIMARÃES NETO**

Zuleica Viana da SILVEIRA*

RESUMO: 36 camundongos fêmeas foram injetadas, no 12º dia de prenhez, com 0,2 ml de água destilada (grupo controle) ou de solução aquosa com 30 mg/kg ou 50 mg/kg de peso de ciclofosfamida (grupo tratado). Os animais foram sacrificados 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a injeção e 3 dias após o parto. Verificou-se que a ciclofosfamida interfere no desenvolvimento do germe dental de forma diretamente proporcional à dose empregada.

UNITERMOS: Ciclofosfamida; desenvolvimento de germe dental.

INTRODUÇÃO

A ciclofosfamida interfere na continuidade do crescimento dos incisivos de ratos adultos, porém os remanescentes do tecido odontogênico continuam a formação de estruturas dentais¹⁷. Sua administração no 20º dia de gestação provoca alterações histomorfológicas, tais como constrições dentais ou defeitos dentinários¹², e quando administrada a camundongos hospedeiros, que receberam implantes intra-oculares de germes dentais de molares de fetos de camundongos, determina alterações na morfogênese dental e a formação de órgãos dentais hipodesenvolvidos, na proporção direta da idade fetal e da dose empregada¹⁴. Diante do exposto é o propósito deste trabalho estudar o efeito da ciclofosfamida, injetada em duas diferentes concentrações durante o período de gestação, sobre o desenvolvimento do germe dental do incisivo do camundongo.

* Departamento de Morfologia – Faculdade de Odontologia – UNESP – 16015 – Araçatuba – SP.

** Estagiário do Departamento de Morfologia e Bolsista da FAPESP.

MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho foram utilizadas 36 camundongos fêmeas prenhes (*Mus musculus* – var. albino Swiss). Os animais, com aproximadamente 60 dias de idade, foram acasalados na proporção de duas fêmeas para um macho, durante 14 horas. No 12º dia de prenhez, a partir da verificação do “plug” vaginal, os animais foram separados e passaram a constituir os grupos-controle e tratado e receberam uma única injeção intraperitoneal, sendo que nos controle foi administrado 0,2 ml de água destilada enquanto os tratados receberam 0,2 ml de solução aquosa contendo 30 ou 50 mg/kg de peso corporal de ciclofosfamida.*

Durante todo o período experimental os animais receberam ração granulada e água à vontade. Transcorridos 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a injeção e 3 dias após o nascimento, as fêmeas, ou filhotes, foram sacrificados por deslocamento cervical, em número de seis para cada período, sendo dois controles e dois para cada dosagem.

Imediatamente após o sacrifício foi realizada uma incisão no abdome, no sentido látero-lateral, na altura da cintura pélvica. A pele foi rebatida, os músculos abdominais foram pinçados e seccionados e o útero removido.

O útero foi colocado em uma placa de Petri mergulhado em soro fisiológico, e efetuou-se a remoção dos fetos. Estes, um de cada vez, foram colocados em uma placa de Petri, examinados macroscopicamente e levados à platina de um microscópio estereoscópico** para a confirmação da idade cronológica com base nos critérios morfológicos descritos por GRUNEBERB¹⁰.

A seguir os fetos foram decapitados e suas cabeças fixadas em formol neutro. Após a fixação (decorridas 24 horas), foram lavadas em água corrente, por duas horas, para posterior descalcificação em solução de citrato de sódio a 20% e ácido fórmico a 50%, em partes iguais¹⁵. Após a descalcificação, as cabeças foram incluídas em parafina de modo a fornecerem cortes frontais com 6 micrômetros de espessura, que foram corados pela hematoxilina e eosina para análise em microscopia ótica.

RESULTADOS

Animais sacrificados 24 horas após a injeção

Os germes dentais dos animais controle encontravam-se em fase avançada de botão, onde distinguia-se a invaginação epitelial com células mais altas na sua periferia e, na porção central, células indiferenciadas uniformemente distribuídas. Ao seu redor havia uma condensação maior de células mesenquimais. Notava-se a presença de mitoses tanto nas células epiteliais quanto mesenquimais. A lâmina vestibular apresentava-se como uma invaginação delgada e estendia-se até abaixo dos botões dentais.

* Enduxan – Laboratório Pravaz – Recordati.

** Carl Zeiss, West Germany.

Nos animais tratados com 30 mg de ciclofosfamida, os germes dentais apresentavam-se na fase de botão, iniciando alteração de sua extremidade para alcançar a fase de capuz. Notava-se maior concentração de células mesenquimais ao seu redor. A lâmina vestibular, particularmente na mandíbula, encontrava-se bem definida. Nos animais tratados com 50 mg de ciclofosfamida, os germes dentais dos incisivos apareciam na fase inicial de botão, com uma concentração maior de células mesenquimais ao seu redor.

Animais sacrificados 48 horas após a injeção

Os germes dentais dos animais controles apresentavam-se na fase inicial de capuz. A lâmina vestibular era extensa e projetava-se até abaixo dos germes dentais dos incisivos, particularmente na mandíbula.

Nos animais tratados com 30 mg de ciclofosfamida, os germes dentais estavam iniciando a fase de capuz, com diferenciação dos epitélios interno e externo do órgão do esmalte e do retículo estrelado. A papila dental aparecia como uma condensação maior de células mesenquimais uniformemente distribuídas e sem diferenciação. Perifericamente ao germe dental, as células e substância intercelular dispunham-se de modo a circunscrever o conjunto. Figuras de mitose e a presença, na maxila, de algumas trabéculas ósseas foram identificadas. Nos animais tratados com 50 mg de ciclofosfamida os germes dentais encontravam-se na fase de botão avançada; estavam unidos ao epitélio bucal e apresentavam figuras de mitose e uma lâmina vestibular nítida.

Animais sacrificados 72 horas após a injeção

Os germes dentais dos animais controle apresentavam desenvolvimento não padronizado, sendo que, em alguns casos, estava presente uma pequena camada de pré-dentina (Fig. 1).

Nos animais tratados com 30 mg de ciclofosfamida, os germes dentais apresentavam todas as suas camadas constituintes, porém pouco menos desenvolvidos que os controle. Os germes dentais dos animais tratados com 50 mg de ciclofosfamida estavam ainda na fase de capuz (Fig. 2), com início de diferenciação dos odontoblastos e identificou-se figuras de mitose.

Animais sacrificados 96 horas após a injeção

Os germes dentais dos animais-controle estavam bem constituídos, os ameloblastos eram altos, com núcleos alongados e os odontoblastos eram células cilíndricas, baixas, com núcleo irregular. Notava-se a deposição de pré-dentina. As demais células da papila dental distribuíam-se uniformemente e estavam associadas a vasos sanguíneos. O saco dental estava constituído de células achatadas e substância intercelular. A lâmina vestibular era nítida e figuras de mitose e algumas trabéculas ósseas foram identificadas.

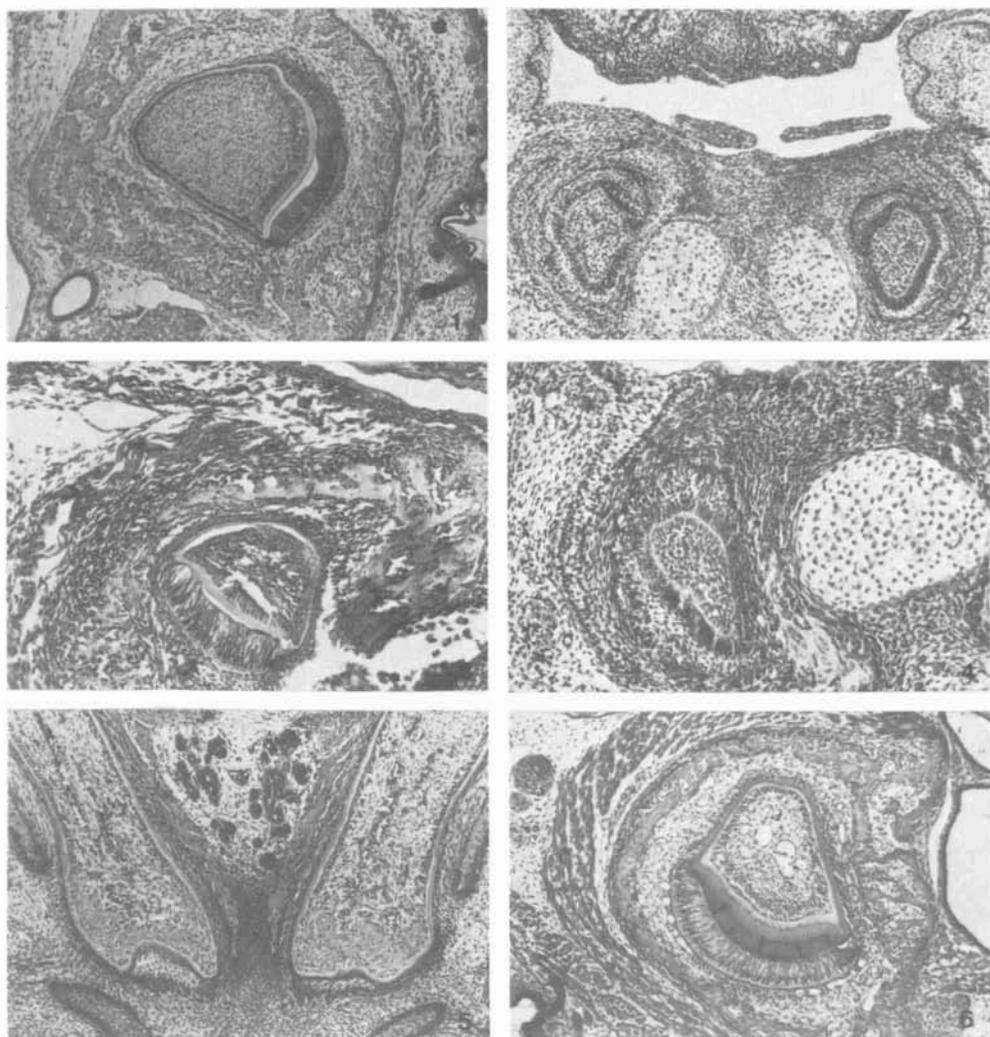


FIG. 1 - Germe dental de animal controle, 72 horas após a injeção. H.E. 80 X
 FIG. 2 - Germes dentais de animal tratado com 50 mg de ciclofosfamida, 72 horas após a injeção. H.E. 100 X
 FIG. 3 - Germe dental de animal tratado com 30 mg de ciclofosfamida, 96 horas após a injeção. H.E. 200 X
 FIG. 4 - Germe dental de animal tratado com 50 mg de ciclofosfamida, 96 horas após a injeção. H.E. 175 X
 FIG. 5 - Germes dentais de animal controle, 120 horas após a injeção. H.E. 63 X
 FIG. 6 - Germe dental de animal tratado com 30 mg de ciclofosfamida, 3 dias após o parto. H.E. 63 X

Nos animais tratados com 30 mg de ciclofosfamida, os germes dentais mostravam todas suas camadas constituintes (Fig. 3). Os ameloblastos eram células altas com o núcleo basal e citoplasma abundante e vacuolizado. Havia uma camada relativamente espessa de pré-dentina e os odontoblastos eram altos com núcleo basal. Células indiferenciadas preenchiam a câmara pulpar. Células achatadas dispunham-se acom-

panhando a superfície externa do órgão dental. Trabéculas ósseas podiam ser visualizadas a alguma distância do germe dental. Nos animais tratados com 50 mg de ciclofosfamida (Fig. 4), identificam-se as estruturas do órgão do esmalte e da papila dental, sem a deposição de tecidos mineralizados. Notava-se presença de lâmina vestibular.

Animais sacrificados 120 horas após a injeção

Os germes dentais dos animais-controle apresentavam as camadas do órgão do esmalte pouco nítidas, exceto a camada de ameloblastos (Fig. 5). Havia uma faixa de esmalte mais espessa junto à borda incisal, seguida de uma faixa de dentina e de uma faixa de pré-dentina. Áreas de osteodentina puderam ser identificadas próximo à borda incisal. Os odontoblastos 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 e, externamente a esta, havia trabéculas ósseas.

Nos animais tratados com 30 mg de ciclofosfamida, os germes dentais mostravam-se com esmalte, dentina e pré-dentina. As estruturas do órgão do esmalte estavam parcialmente reduzidas; o órgão dental era circundado por células achatadas, dispostas juntamente à sua superfície e externamente a estas havia trabéculas ósseas. Nos animais tratados com 50 mg de ciclofosfamida, o órgão do esmalte apresentava todas as suas camadas constituintes bem definidas. Os ameloblastos eram altos com núcleo alongados e os odontoblastos eram distintos e mais altos nas regiões da borda incisal. As demais células da papila estavam uniformemente distribuídas e associadas a vasos sanguíneos. Os componentes do saco dental apareciam dispostos paralelamente, acompanhando a superfície do órgão dental.

Animais sacrificados 3 dias após o parto

Os germes dentais dos animais controle mostravam a camada ameloblástica nítida, com células altas, embora não tanto quanto as descritas nos incisivos dos animais controle com 120 horas pós-injeção. A camada de esmalte era espessa e as camadas de dentina e de pré-dentina eram mais desenvolvidas na face onde havia a presença de esmalte, sendo os odontoblastos mais altos nesta região. A polpa era rica em células e vasos sanguíneos e, mais externamente, notava-se a presença de trabéculas ósseas.

Nos animais tratados com 30 mg de ciclofosfamida, o desenvolvimento dos germes dentais era semelhante àquele dos animais-controle, porém menos maduros (Fig. 6). Nos animais tratados com 50 mg de ciclofosfamida, não foi possível analisar os germes dentais, uma vez que os animais nasceram mortos ou não se tornaram viáveis neste período.

DISCUSSÃO

Como existe correspondência quanto ao desenvolvimento embriológico, inclusive no que diz respeito a odontogênese, tanto no rato²⁰ quanto no camundongo^{6,11}, admitimos que a utilização do camundongo em trabalhos que objetivem, de alguma forma, o estudo do desenvolvimento dental deva ser mais ampla. Uma outra constatação é a de que, de maneira geral, as pesquisas recaem, predominantemente, sobre os incisivos quando da escolha de órgãos dentais como modelos de estudo.

No presente trabalho foi estudado o desenvolvimento do germe dental sob os efeitos da ciclofosfamida, um agente alquilante que age bloqueando a duplicação do DNA. Admite-se, em geral, que a reação conduz à morte celular e à alquilação do DNA na posição N-7 da guanina, durante a divisão celular. Esta reação pode produzir uma perda de purina com conseqüente ruptura da cadeia de DNA e o entrecruzamento de ambas as cadeias, o que impede a síntese normal do DNA. Estes agentes, entretanto, produzem seus efeitos biológicos pela transferência de grupos alquilados centros nucleófilos importantes das células, como é o caso do DNA, do RNA e das proteínas¹⁶.

Na maioria dos medicamentos citotóxicos existe uma clara relação entre a dose empregada e a capacidade de destruição das células, dentro dos limites de toxicidade para o hospedeiro. Uma dose determinada de um medicamento citotóxico destrói uma proporção constante de células e não um número constante delas, independentemente da quantidade de células que exista quando se administra a droga. Isto significa que a destruição das células por estes agentes segue uma progressão cinética de primeiro grau: isto é, um tratamento que reduz um milhão de células a dez mil deve reduzir uma população de cem células a uma¹⁶.

É sabido que a ciclofosfamida é portadora inativa de um grupo alquilante potencial, suscetível de ativação no tumor por uma fosforamidase que se supunha ser mais abundante em células tumorais, porém não existe esta diferença em relação à quantidade desta enzima entre células tumorais e as análogas normais. Desta forma, ter-se-ia que admitir que a droga agiria respeitando as células normais e que na realidade as células tumorais seriam consideradas estranhas ao hospedeiro, fato que não acontece¹³. A única diferença que ocorre, no geral, é da fração proliferativa que nas células normais é muito menor na maioria dos tecidos. Desta forma, a ciclofosfamida age em todo o organismo hospedeiro fazendo sentir mais sua ação nas células que normalmente se dividem mais vezes, num mesmo espaço de tempo. O mecanismo de ação não se baseia na hidrólise pela fosfatase e fosforamidase, mas sim na oxidação que ocorre nos microsomas do fígado. Apenas 10% da ciclofosfamida, administrada *in vivo*, é ativada no fígado e após 30 minutos de sua administração, no rato, dois metabólitos contendo fósforo representam 95%, aproximadamente, da atividade alquilante de soro³.

Sendo a ciclofosfamida inativa na sua forma de administração, necessita de uma conversão metabólica para sua ação terapêutica^{4,25}, que ocorre nos hepatócitos ao

nível das enzimas do retículo endoplasmático rugoso e aí são liberados os metabólitos que vão exercer sua ação alquilante²². Ainda, a ativação desta droga ocorre numa curva constante no soro sanguíneo, tanto no homem quanto no rato, razão pela qual o rato é um ótimo animal para se pesquisar os efeitos da ciclofosfamida³.

Esses resultados, quanto à ação da droga, vêm ao encontro do observado em camundongos, que determina um retardo na proliferação epitelial⁷, e no homem, pelas alterações que produz na mucosa bucal¹⁹. Desta forma, a menor proliferação do epitélio da mucosa gengival ocorre pela interferência da droga durante o ciclo celular, diminuindo o número de células epiteliais⁹.

Além das células epiteliais, as células mesenquimais também mostram sensibilidade à ciclofosfamida¹ e, especificamente sobre a camada odontoblástica e demais células pulpares, a sua ação se faz sentir a ponto de aparecerem zonas de necrose¹⁸. Desta forma podemos admitir que, sendo uma droga que age principalmente sobre células de grande atividade proliferativa^{2,27}, exerça sua ação sobre os germes dentais de incisivos de camundongos.

Na fase gestacional em que foi administrada a droga os germes dentais de incisivos estavam em pleno desenvolvimento embrionário e a fração proliferativa nessa época era, presumivelmente, bastante alta. Desta forma, como as doses foram administradas no 12º dia de vida intra-uterina, dada a intensa vascularização da área, supõe-se que sua ação tenha sido exercida imediatamente. Esta droga, após sua injeção, leva 15 minutos para se transferir para os tecidos⁵ e aproximadamente 16 minutos para atingir o feto²¹. Desta forma, considerando as características metabólicas da ciclofosfamida^{3,5,21} e, ainda, que atua durante todo o tempo em que é administrada²⁴, agindo sobre células com alta fração proliferativa⁸ bloqueando a duplicação do DNA de forma completa (resultando na morte celular) ou incompleta (possivelmente resultando em mutações²⁶), deve ter agido de imediato sobre os tecidos fetais. Tais observações justificam plenamente as porcentagens encontradas, por MATHEUS¹⁴, dos germes dentais que não se desenvolveram, tanto para animais tratados com 62,5 mg/kg quanto para os tratados com 125 mg/kg de peso corporal de ciclofosfamida. A diferença nas porcentagens de germes dentais que se desenvolveram, em função e em ordem inversamente proporcionais às da dose de ciclofosfamida administrada¹⁴, pode estar ligada ao fato de que, mesmo em uma única administração, esta droga tem ação diretamente proporcional à dose¹³ e causa um efeito danoso sobre os dentes em desenvolvimento, de forma temporária²³.

Nossos resultados corroboram o descrito acima pois, ao analisar o desenvolvimento dos germes dentais dos incisivos, ficou evidente que houve um retrato na maturação dessas estruturas quando se confrontam os resultados dos animais que receberam dosagens de 50 mg/kg com os que receberam 30 mg/kg de ciclofosfamida e estes com os controles. Além do que, sendo uma droga antimitótica e acíclica, inibe as células em qualquer estágio de diferenciação e tal fato deve estar relacionado com a própria dosagem, uma vez que há diferenças quando comparados os resultados obtidos entre animais que receberam doses maiores e menores: desta forma, a ação da droga é diretamente proporcional à dosagem aplicada. Quanto maior a dosagem,

maior a quantidade de células afetadas e maior a extensão da injúria. Contudo, esperava-se que os efeitos da ciclofosfamida, ao ser administrada em dose única, fossem ocorrer de forma menos danosa, pois as células que foram lesadas à época da sua administração, em virtude de ser um dente de crescimento contínuo e, como tal, apresentar multiplicação celular persistente, deveriam apresentar maior poder de “recuperação” pelos fenômenos posteriores de divisão celular.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP –, pelos auxílios concedidos para a realização deste trabalho (Processo 84/1681-7 e 85/2972-8).

MATEUS, M. T. G. *et alii* – Effect of cyclophosphamide on mouse incisor tooth germ development. *Rev. Odont. UNESP, São Paulo, 19: 41-49, 1990.*

ABSTRACT: Thirty six female mice were injected on the 12th day of the gestational period with 0.2 ml of distilled water (control group) or of an aqueous solution containing either 30 mg/Kg or 50 mg/Kg of body weight of cyclophosphamide (treated group). The animal were killed at 24, 48, 72, 96 and 120 hours after the injection and 3 days after birth. It was verified that cyclophosphamide interferes on the tooth germ development and that this effect is in directly ratio of the doses used.

KEY-WORDS: Cyclophosphamide; tooth germ development.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADATIA, A. K. – Effect of cyclophosphamide on odontogenesis in the rat. *J. Dent. Res.*, 52: 981, 1973. (abst.)
2. BACH, J. F.; DAEDENNE, M.; FOURNIER, C. & DORMOUNT, J. – Pharmacologie des immunosupresseurs. *G. M. France*, 78: 27-44, 1971.
3. BROCK, N. – Pharmacologic characterization of cyclophosphamide and cyclophosphamide metabolites. *Cancer Chemother. Rep.*, 51: 315-25, 1967.
4. BROCK, N.; GROSS, R.; HOHORST, H. J.; KLEIN, H. O. & SCHNEIDER, B. – Activation of cyclophosphamide in man and animal. *Cancer*, 27: 1512-29, 1971.
5. BROCK, N. & HOHORST, H. J. – Metabolism of cyclophosphamide. *Cancer*, 20: 900-4, 1967.
6. COHN, S. A. – Development of the molar teeth in the albino mouse. *Am. J. Anat.*, 101: 295-319, 1957.
7. DESPREZ, J. D. & KIELRN, C. L. – The effects of cytoxan (cyclophosphamide) on wound healing. *Plast. reconstr. Surg.*, 26: 301-8, 1960.
8. ESTEVEZ, R. A.; CHACON, R. D. & ESTEVEZ, O. T. – *Quimioterapia antineoplásica sobre bases citocinéticas*. Quimioterapia Dinâmica, 1-30, Buenos Aires, 1969.

9. FURUSE, T. A. – *Processo de reparo de extração dental após administração de ciclofosfamida. Estudo histológico em ratos.* Araçatuba, Fac. Odont. Araçatuba, UNESP, 1973. (Tese – Doutorado)
10. GRUNEBERG, H. – The development of some external features in mouse embryos. *J. Hered.*, 34: 89-92, 1943.
11. 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.
12. KOPPANG, H. S. – Histomorphologic investigations of dentinogenesis in incisors of offspring of cyclophosphamide-treated pregnant rats. *Scand. J. dent. Res.*, 86: 444-58, 1978.
13. KOROKOLVAS, A. – Mecanismo de ação dos agentes antineoplásicos. *Rev. Farm. Bioquim. Univ. S. Paulo*, 9: 5-60, 1971.
14. MATHEUS, M. T. G. – *Efeito da ciclofosfamida sobre o desenvolvimento de germes dentais de molares transplantados para a câmara anterior do olho. Estudo histológico em camundongos (Mus musculus).* Araçatuba, Fac. Odont. Araçatuba, UNESP, 1985. (Tese – Livre-Docência)
15. MORSE, A. – Formic acid-sodium citrate decalcification and butyl alcohol dehydration of teeth and bone for sectioning in paraffin. *J. dent. Res.*, 24: 143-53, 1945.
16. OMS – Organización Mundial de la Salud. *Quimioterapia de los tumores sólidos.* Série de informes técnicos – 605, Genebra, 1977.
17. READE, P. C. & ROBERTS, M. L. – Some long-term effects of cyclophosphamide on the growth of rat incisor teeth. *Arch. oral Biol.*, 23: 1001-5, 1978.
18. SANTOS-PINTO, M. C. – *Reimplante de incisivos após a administração de ciclofosfamida. Estudo clínico, radiográfico e histológico em ratos.* Araçatuba, Fac. Odont. Araçatuba, UNESP, 1973. (Tese – Doutorado)
19. SCEVOLA, A. – La alterazioni citomorfologiche della mucosa orale in corso ditrattamento con sostanze citostatiche. *Arch. Ital. Otol.*, 78: 873-84, 1968.
20. SCHOUR, I. & MASSLER, M. – The teeth. In: GRIFFITH, J. Q. & FARRIS, E. J. – *The rat in laboratory investigation.* 2ª ed. Philadelphia, J. B. Lippincott Co., 1949.
21. SHORT, R. D.; RAO, K. S. & GIBSON, J. E. – The *in vivo* biosynthesis of DNA, RNA and proteins by mouse embryos after a teratogenic dose of cyclophosphamide. *Teratology*, 6: 129-38, 1972.
22. SLADEK, N. E. – Cyclophosphamide metabolism and therapeutic efficacy. *Fed. Proc.*, 30: 1090, 1971.
23. SMITH, C. E. & WARSHAWSKY, H. – Cellular renewal in the enamel organ and the odontoblast layer of the rat incisor as followed by radioautography using ³H-thymidine. *Anat. Rec.*, 183: 523-61, 1975.
24. STENRAN, U. & NORDLINDER, H. – Helayed death in rats treated with cyclophosphamide. *Nature*, 219: 1154-9, 1968.
25. SYRKING, A. B. & ZAITZEVA, L. A. – The rate of cyclophosphamide activation. *Neoplasma*, 17: 377-81, 1970.
26. VAHLSING, H. L.; FERINGA, E. R.; BRITTEN, A. G. & KINNING, W. K. – Dental abnormalities in rats after a single large dose of cyclophosphamide. *Cancer Res.*, 35: 2199-202, 1975.
27. VAN PUTTEN, L. M. & LELIEVELD, P. – Factors determining cell killing by chemotherapeutic agents *in vivo*. I. Cyclophosphamide. *Europ. J. Cancer*, 6: 313-21, 1970.

Recebido para publicação em 27.9.1989