

DROGAS ANTIMITÓTICAS E DESENVOLVIMENTO DE INCISIVOS INFERIORES DE RATOS: ESTUDOS COM O 5-FLUORURACIL

Wilma Pereira BASTOS-RAMOS*
Maria Julia Pereira COELHO**
Terezinha de Oliveira NOGUEIRA***
José Benedito Oliveira AMORIM*

- **RESUMO:** Objetivou-se estudar a influência do antimitótico 5-fluoruracil sobre o desenvolvimento de dentes incisivos inferiores de ratos adultos, presumindo-se, com base na literatura, que estes órgãos, como todo os tecidos ativamente proliferativos, seriam sensíveis à droga. Utilizou-se como parâmetro o crescimento dentário, medido aos 4º, 7º, 10º, 14º, 17º e 20º dias após o início da administração do antimitótico o que ocorreu nos 10 primeiros dias do início da experiência, usando-se doses de 12, 15, 18 e 25 mg/kg, em diferentes grupos. Fez-se a análise histológica dos tecidos dentários e para fins de comparação, observaram-se outros sinais de intoxicação, como depressão de medula óssea, alterações do sangue periférico, lesões orais, diarreia, alopecia, lesões oculares e morte. Os resultados demonstram que o 5-fluoruracil causou inibição do crescimento dentário somente em doses muito tóxicas, freqüentemente seguidas de morte dos animais. Contrariamente ao pressuposto, tal efeito inibitório não pôde ser atribuído à atividade antimitótica em si, porém, teria decorrido do fenômeno geral de intoxicação.
- **UNITERMOS:** Crescimento dentário e antimitóticos; toxicidade do 5-fluoruracil; 5-fluoruracil e crescimento dentário.

Introdução

As drogas antimitóticas, largamente utilizadas no controle de tumores malignos, atuam sabidamente sobre os tecidos normais, sendo estes tão mais sensíveis quanto mais proliferativos e menos diferenciados forem. Assim, ocasionam malformações fetais, causam depressão de medula óssea, inibem a proliferação normal dos tecidos

* Departamento de Ciências Fisiológicas – Faculdade de Odontologia – UNESP – 12245 – São José dos Campos – SP.

** Ex-aluna da Faculdade de Odontologia – UNESP – 12245 – São José dos Campos – SP.

*** Departamento de Patologia – Faculdade de Odontologia – UNESP – 12245 – São José dos Campos – SP.

epiteliais, germinativos e outros⁸. É de se esperar que inibam os tecidos dentários na sua fase de desenvolvimento. A influência de antimetabólicos sobre a formação dos dentes foi estudada experimentalmente com várias drogas como sejam: a vimblastina^{15,16,17}, a demecolcina¹, a ciclofosfamida^{10, 11, 14, 18}, a ametopterina²⁰, a colchicina^{7, 12, 19, 22}, a doxorubicina (Adriamicina)^{2,4,5,9}. Modificações de fibroblastos na polpa dental foram estudadas com o 5-fluoruracil⁶. Os achados dos diversos autores mostram que alguns antimetabólicos como a ciclofosfamida, a colchicina, a doxorubicina causaram alterações dos tecidos dentários ou inibição de erupção do dente em doses subtóxicas compatíveis com a sobrevivência dos animais; já com a ametopterina tais efeitos foram muito discretos, mesmo com doses tóxicas.

Com relação ao 5-fluoruracil, utilizado no presente trabalho, revisão abrangente foi realizada por Valeriote & Santeli²³, em 1984. O desenvolvimento de dentes de ratos foi o modelo experimental escolhido porque os incisivos inferiores apresentam crescimento contínuo durante toda a vida dos animais, refletindo a produção contínua de novas células na região basal do dente; por isso, em um único órgão, pode ser demonstrado o ciclo completo do desenvolvimento dentário desde seu início até sua maturidade. As características tissulares do evento foram estudadas e descritas por vários autores^{3,10,11,13,21}.

No presente trabalho propõe-se estudar a influência do 5-fluoruracil sobre o desenvolvimento de dentes incisivos inferiores de ratos, observando-se seu crescimento e características histológicas. Para fins de comparação, acompanham-se os sinais de toxicidade característicos dos antimetabólicos, tais como depressão de medula óssea, alterações celulares do sangue periférico, epitélio intestinal e alterações macroscópicas (lesões da mucosa oral, alterações do peso corpóreo, diarreia, alopecia e morte).

Material e método

Foram utilizados 84 ratos machos da raça Wistar, com 90-100 dias de idade ao início das experiências.

O 5-fluoruracil foi utilizado nas doses de 12, 15, 18 e 25 mg/kg, em diferentes grupos, administrado diariamente por via intraperitoneal, durante os 10 dias iniciais de experiência.

Para medida do crescimento dentário, os incisivos foram marcados com pequeno sulco junto ao limite dento-gengival e a medida de crescimento, feita com auxílio de compasso de ponta seca e paquímetro, a cada 3 dias após a administração de 5-fluoruracil até o 20º dia de marcação.

Após o 20º dia os ratos foram sacrificados, as cabeças removidas e divididas por incisão sagital; para a análise histológica dos tecidos dentários, os incisivos inferiores

foram fixados em formol a 10% e desmineralizados durante 60 dias em solução a 1:1 de ácido fórmico a 45% e citrato de sódio a 25%. Foram feitos cortes semi-seriados com 5 mm de espessura. As lâminas foram coradas pelo método de H & E e observadas em microscopia óptica. Nas regiões mais apicais dos dentes foram observadas as células da porção germinativa e aquelas em fase de proliferação e diferenciação. Pesquisaram-se possíveis alterações dentinárias.

Para análise de sangue periférico, foram colhidas amostras da veia da cauda, aos 4º, 7º, 10º, 17º e 20º dias a partir da primeira dose de 5-fluoruracil. Os esfregaços corados pelo método de GIEMSA foram observados em microscópio ótico, em imersão, determinando-se a porcentagem específica de neutrófilos, linfócitos, monócitos e eosinófilos.

Para citologia da medula óssea, foram feitos cortes transversais do osso esterno de ratos sacrificados aos 4º, 7º, 10º, 14º, 17º e 20º dias após início de administração do 5-fluoruracil, fixados e descalcificados pelos métodos utilizados para os dentes. As lâminas foram obtidas a partir de cortes longitudinais de 6 µm de espessura e coradas pelo método de H & E, fazendo-se a leitura em microscopia ótica, em imersão.

Fez-se a citologia do epitélio intestinal, retirando-se para execução das lâminas fragmento proximal do íleo, ao 20º dia de experiência. A observação dos demais sinais externos de intoxicação foi feita ao longo de toda a experiência: examinaram-se com lupa de pequeno aumento, a ocorrência de lesões do epitélio da região oral, bem como a possível ocorrência de queda de pêlo, lesões oculares, perda de peso, diarreia, etc.

Análise estatística dos resultados

Foram utilizados o teste "t" de Student e o teste de Walsh²⁴.

Resultado

1 – Crescimento dentário, peso corpóreo e sinais de intoxicação

1.1 – Grupo controle (11 ratos)

Nos animais controle o crescimento dos incisivos inferiores foi contínuo e regular até o 20º dia de observação, não havendo diferença significativa entre o dente direito e o esquerdo.

O ganho de peso foi progressivo e regular após 10 dias da marcação dos dentes.

1.2 – Grupo tratado com 5 – fluoruracil (5-FU)

1.2.1 – 5-FU na dose de 12 mg/kg (11 ratos)

O crescimento dentário não foi significativamente inibido nesta dose, durante (10 dias iniciais) ou após a administração de 5-fluoruracil (10 dias finais). O ganho de peso foi comparável ao do grupo controle. Observou-se diarreia durante o tratamento com o antimitótico, findo o qual, desapareceu paulatinamente.

1.2.2 – 5-FU na dose de 15 mg/kg (24 ratos)

Ocorreu diminuição significante do crescimento dentário ao 10º dia de tratamento, correspondente à 10ª dose de 5-FU.

O crescimento dentário foi comparável aos controles nas medidas realizadas aos 4º, 7º, 14º, 17º e 20º dias. Os animais apresentaram significante perda de peso até o 10º dia, porém cessada a administração de 5-FU o peso se reestabeleceu paulatinamente permanecendo porém, ao 20º dia, ainda abaixo daquele dos controles.

Os sinais de intoxicação foram intensos durante a administração do 5-FU, observando-se diarreia sanguinolenta (88%), lesões da pele (65%), lesões orais, ulcerações e placas necróticas na língua, gengiva e bochecha (34%), lesões oculares (54%) e alopecia (12,5%). Entre o 10º e 17º dias, 7 óbitos ocorreram (29%).

1.2.3 – 5-FU na dose de 18 mg/kg (7 ratos)

Observou-se inibição significante do crescimento dentário aos 4º e 7º dias de tratamento, sendo que antes do 10º dia, todos os animais foram a óbito. Os sinais de intoxicação foram intensos, com a natureza daqueles relatados no item 1.2.2.

1.2.4 – 5-FU na dose de 25 mg/kg (7 ratos)

O crescimento dentário foi significativamente diminuído ao 4º dia de administração de 5-FU, apresentando os animais sinais intensos de intoxicação, até caquexia. Após o 4º dia, todos foram a óbito.

2 – Análise histológica de medula óssea e do sangue periférico

Nos cortes histológicos, tanto do grupo controle quanto do grupo experimental, pôde-se detectar medula óssea normocelular, tendo sido possível identificar as três populações celulares básicas, ou seja, série eritoblástica, granulocítica e megacariocítica. Não se detectaram depleções globais ou seletivas no tecido examinado. Já com relação ao sangue periférico, várias alterações foram constatadas nos animais tratados

com 5-fluoruracil, comparados com grupo controle, relativas aos percentuais de monócitos, eosinófilos, neutrófilos e linfócitos. As curvas de distribuição desses elementos podem ser observadas nas Figuras 3, 4, 5 e 6.

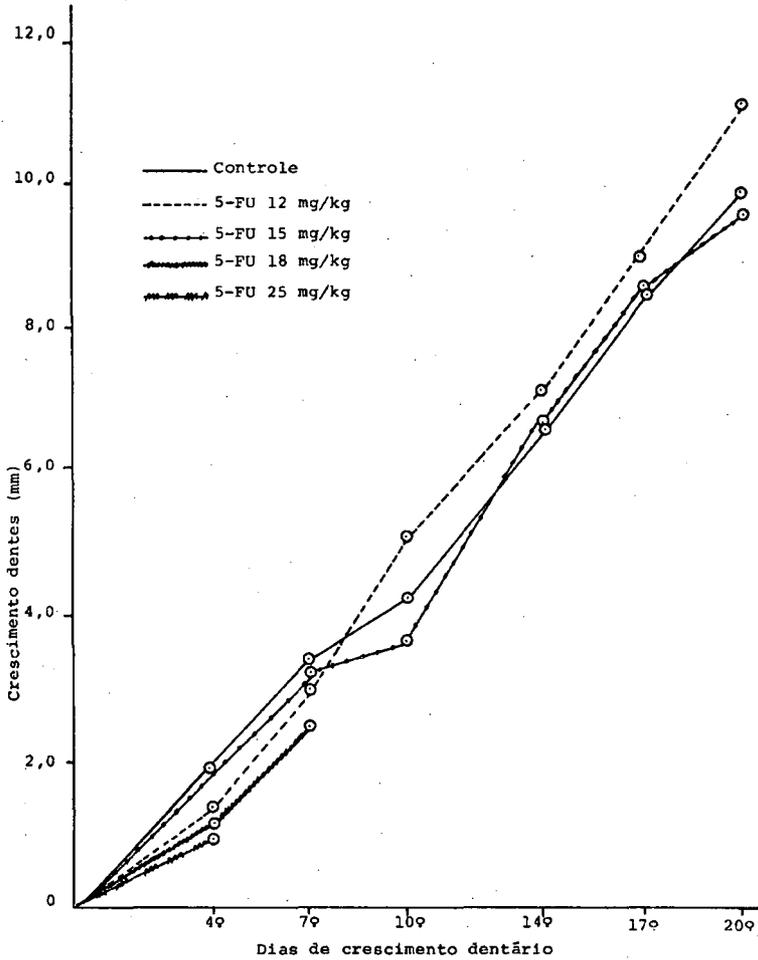


FIGURA 1 - Crescimento (em mm) de dentes incisivos inferiores de ratos controle e ratos tratados com 5-fluoruracil nas doses de 12, 15, 18 e 25 mg/kg, administrado diariamente durante 10 dias, em medidas realizadas aos 4º, 7º, 10º, 14º, 17º e 20º dias após a marcação dos dentes.

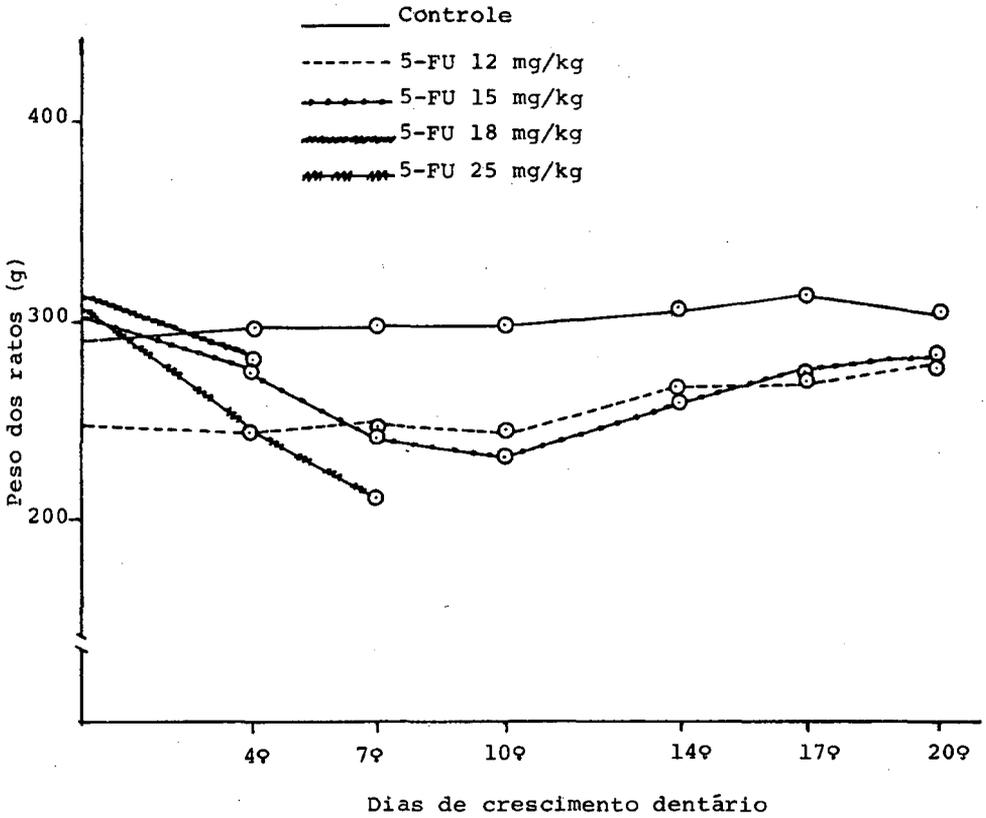


FIGURA 2 - Variação de peso de ratos (µg) controle e ratos tratados com 5-fluoruracil nas doses de 12, 15, 18 e 25 mg/kg, administrado diariamente durante 10 dias. Pesagens realizadas aos 4º, 7º, 10º, 14º, 17º e 20º dias após o início da administração.

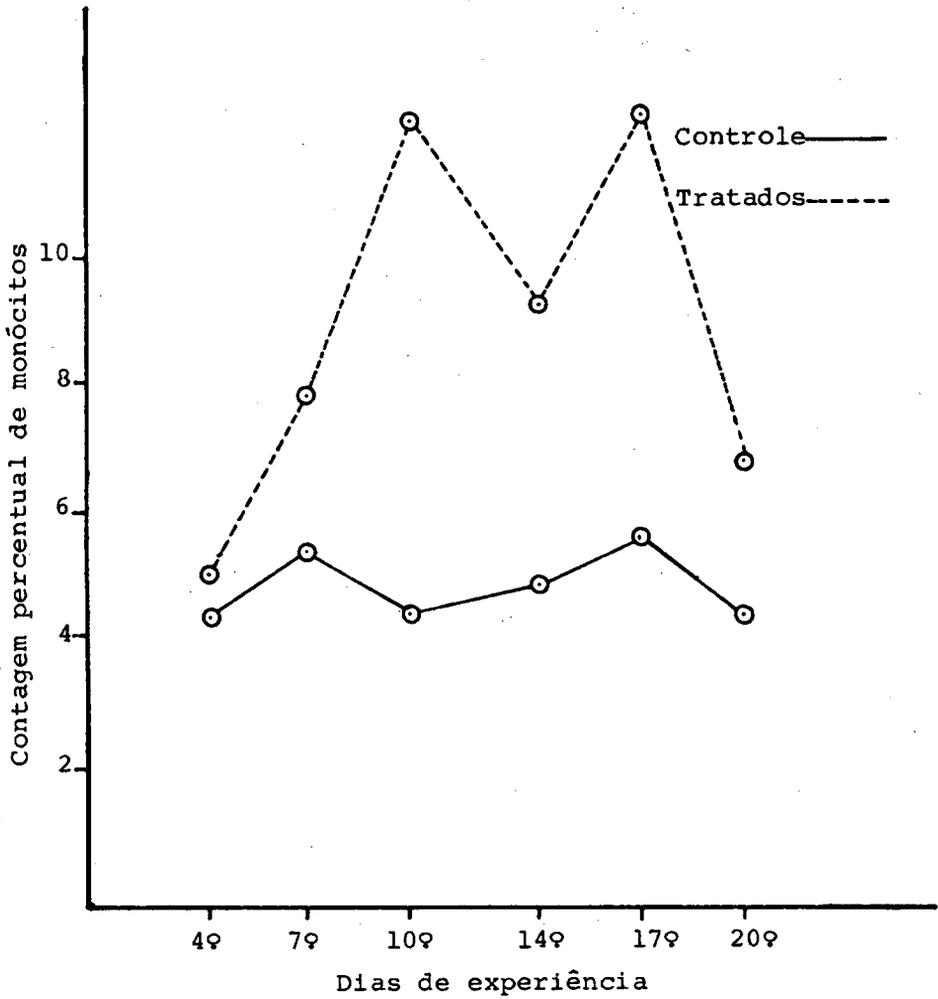


FIGURA 3 - Curvas de distribuição de monócitos de sangue de ratos controle e de ratos tratados com 5-fluoruracil na dose de 15 mg/kg, injetado diariamente até o 10º dia de experiência. Cada ponto resulta da leitura de 4 lâminas por amostra. Coloração pelo método de Giemsa.

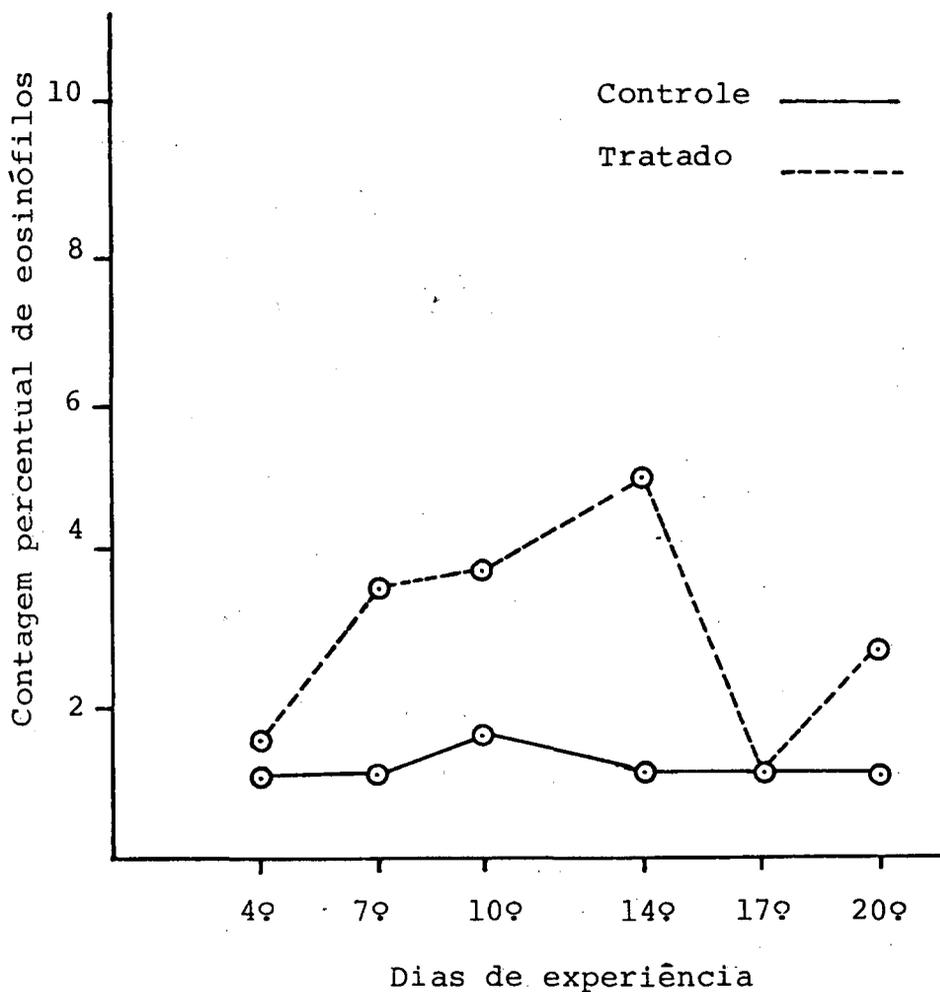


FIGURA 4 - Curvas de distribuição de eosinófilos de sangue de ratos controle e de ratos tratados com 5-fluoruracil na dose de 15 mg/kg, injetado diariamente até o 10º dia de experiência. Cada ponto resulta da leitura de 4 lâminas por amostra. Coloração pelo método de Giemsa.

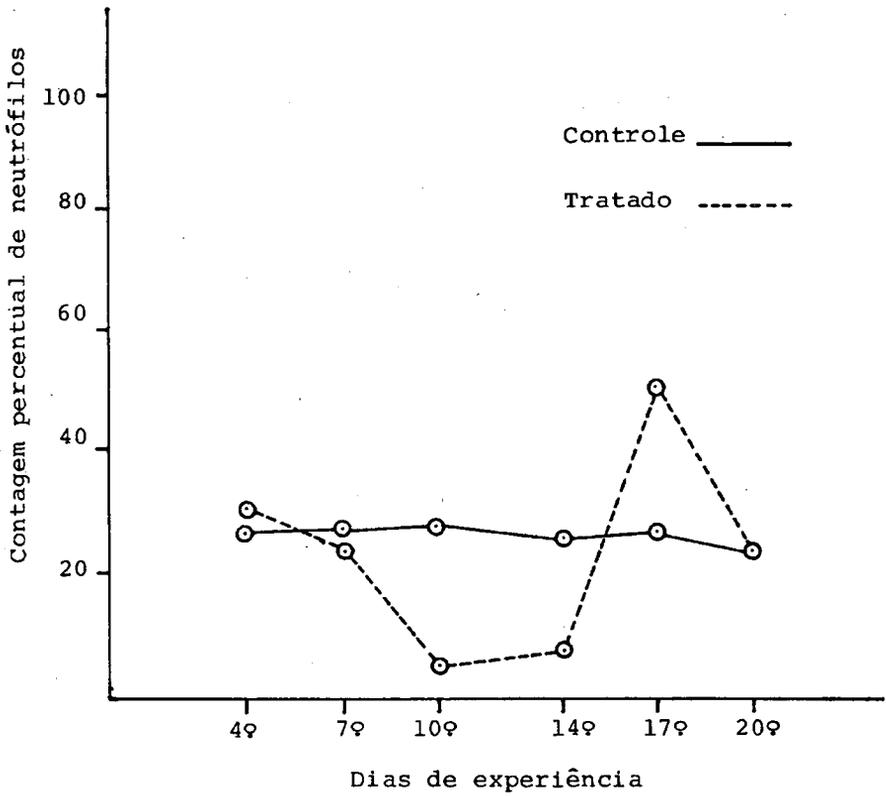


FIGURA 5 – Curvas de distribuição de neutrófilos de sangue de ratos controle e de ratos tratados com 5-fluoruracil na dose de 15 mg/kg, injetado diariamente até o 10º dia de experiência. Cada ponto resulta da leitura de 4 lâminas por amostra. Coloração pelo método de Giemsa.

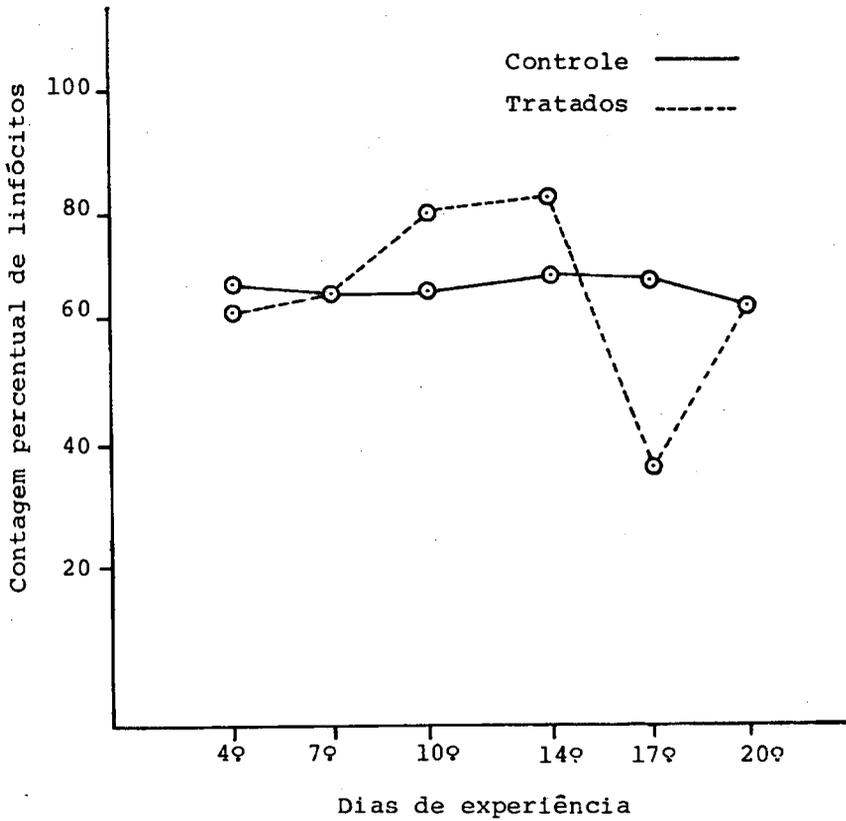


FIGURA 6 – Curvas de distribuição de linfócitos de sangue de ratos controle e de ratos tratados com 5-fluoruracil na dose de 15 mg/kg, injetado diariamente até o 10º dia de experiência. Cada ponto resulta da leitura de 4 lâminas por amostra. Coloração pelo método de Giemsa.

3 – Análise histológica de intestino delgado

Não foram constatadas diferenças histológicas em cortes de íleo de grupos tratados com 5-fluoruracil e grupo controle.

Discussão

O 5-fluoruracil foi a droga escolhida para o presente trabalho em vista de ser considerado antimitótico muito potente e de ser praticamente desconhecida sua influência sobre tecidos dentários em desenvolvimento. Por outro lado, pressupôs-se que exercesse marcada influência sobre o crescimento dentário e sobre estruturas celulares durante a erupção do dente, ao molde do observado por vários autores com outros antimitóticos^{1,2,4,7,9,10,11,12,14,15,16,17,19,22}.

O primeiro evento a ser avaliado foi o crescimento dentário, o qual é o mais simples e mais sugestivo parâmetro que estaria alterado, traduzindo efetivamente alteração da proliferação celular pelo 5-fluoruracil. Analisou-se a histomorfologia do dente, na busca de possíveis alterações estruturais detectáveis em microscopia ótica. Estudaram-se para fim de comparação as possíveis modificações de tecidos quimiossensíveis. Realizaram-se a histologia da medula óssea e sangue periférico e, ainda, possíveis alterações do epitélio intestinal.

Os resultados obtidos não confirmaram, porém, o pressuposto do trabalho. O crescimento dentário foi inibido somente em doses que apresentaram intensa toxicidade (15, 18 e 25 mg/kg), sendo as de 18 e 25 mg/kg letais aos animais, respectivamente após o 7º e 4º dias de administração. Com a dose de 15 mg/kg, somente ao 10º dia de administração do antimitótico ocorreu diminuição do crescimento dentário, porém tal não mais se observou após cessadas as injeções, com simultânea diminuição dos sinais de toxicidade. A análise histológica dos tecidos dentários não revelou, ao microscópio ótico, quaisquer alterações, em todas as doses utilizadas. Tais resultados permitem supor que a diminuição do crescimento dentário não decorreu da sensibilidade do dente à atividade antimitótica, mas ocorreu como parte do fenômeno geral de intoxicação, que foi intenso e freqüentemente levou os animais a óbito. As alterações de peso corpóreo foram proporcionais ao estado de intoxicação (Figura 2), traduzindo o estado geral dos animais e correspondendo à diminuição do crescimento dentário (Figura 1).

O não aparecimento de depressão do tecido epitelial intestinal pode ser decorrente do fato de que, ao tempo de realização dos cortes, feitos 10 dias após cessada a administração do 5-fluoruracil, tenha havido restauração tissular.

Embora não se detectassem à microscopia ótica, alterações tissulares em cortes de medula óssea, realizados durante o experimento (4º, 7º, 10º, 14º, 17º e 20º dias),

ocorreram alterações significativas e curiosas no sangue periférico, modificando-se acentuadamente a contagem percentual de monócitos, eosinófilos, neutrófilos e linfócitos, não explicáveis no presente estágio, mas sugerindo estudo específico (em andamento).

Conclusão

1. O 5-fluoruracil causou em ratos, inibição do crescimento dentário apenas em doses que causaram considerável efeito tóxico e/ou letal: 15, 18 e 25 mg/kg.

2. Na dose de 15 mg/kg o crescimento dentário mostrou-se inibido somente ao 10^o dia de tratamento com o 5-fluoruracil, porém não se detectaram alterações de medula óssea e epitélio intestinal.

3. A dose de 15 mg/kg causou consideráveis alterações na contagem percentual de monócitos, eosinófilos, neutrófilos e linfócitos ao 4^o, 7^o, 10^o e 20^o dias de experiência.

BASTOS-RAMOS, W. P. et al. Antimitotic drugs and the development of rats inferior incisors teeth: studies with 5-fluorouracyl. Rev. Odontol. UNESP, São Paulo, v. 21, n.1, p. 11-24, 1992.

- *ABSTRACT: It was studied the influence of antimetabolic drug 5-fluorouracyl on the growing of inferior incisors teeth of adult rats, supposing, according to the literature, that these organs would be affected, like other actively proliferating tissues. The teeth growth was measured at the 4th, 7th, 10th, 14th, 17th and 20th days and 5-fluorouracyl administered during the first 10 days, in doses of 12, 15, 18 and 25 mg/kg. Hystological analysis of dental tissues were performed as well as observed toxic signs such as bone marrow depression, peripheral blood changes, oral and ocular lesions, diarrhea, alopecia, and death. The results show that 5-fluorouracyl inhibited dental growth only in very toxic doses, often followed by death. On the contrary of the initial supposition one couldn't attribute such an inhibition to the antimetabolic effect of the drug, but rather, as a part of the general intoxication.*
- *KEYWORDS: Dental growth and antimetabolic drugs; 5-fluorouracyl toxicity; 5-fluorouracyl and dental growth.*

Referências bibliográficas

1. CHIBA, M., NARRAWAY, J.M., NESS, A.R. Impeded and unimpeded eruption of mandibular incisor of the adult rat and its stoppage by demecolcine. *J. Dent. Res.*, v. 47, p. 986, 1986.

2. DAHL, J.E. Immediate and delayed effects of repeated doxorubicin injections on rat incisor mesenchymal cells. *Acta Odont. Scand.*, v. 43, p. 155-162, 1985a.
3. DAHL, J.E. Proliferation and migration of rat incisor mesenchymal cells. *Scand. J. Dent. Res.*, v. 91, p. 335-340, 1983.
4. DAHL, J.E. Response of rat incisor mesenchymal cells to doxorubicin after bleomycin pretreatment. *Acta Odont. Scand.*, v. 43, p. 279-284, 1985a.
5. DAHL, J.E., KOPPANG, H.S. Renewal and migration of rat incisor mesenchymal cells after doxorubicin administration. *Acta Odont. Scand.*, v. 43, p. 97-102, 1985.
6. DE DEUS, O.D., HAN, S.S. Modificações ultra-estruturais de fibroblastos de polpa dental após administração de 5-fluoruracil. *Arq. Cent. Est. Cur. Odont.*, v. 13, p. 149-175, 1976.
7. DIAS COSTA, A.M. *Estudos com a colchicina no crescimento de dentes de ratos*. Piracicaba, 1978. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.
8. GOODMAN, L.S., GILMAN, A. *The Pharmacological basis of therapeutics*. 8. ed. New York: Pergamon, 1990. p. 1202-1263.
9. KARIN, A. The initiation of osteodentin formation in the rat incisor after adriamycin administration. *Anat. Rec.*, v. 213, p. 377-384, 1985.
10. KOPPANG, H.S. Histomorphologic investigation on the effect of cyclophosphamide on dentinogenesis of the rat incisor. *Scand. J. Dent. Res.*, v. 81, p. 383-396, 1973a.
11. KOPPANG, H.S. *The sensivity of dentinogenesis in the rat incisor to roentgen rays and to cyclophosphamide*. Oslo: Universite Tsforlaget, 1973b. (Tese)
12. KUDO, N. Effects of colchicine on the secretion of matrices of dentine and enamel in the rat incisor: an autoradiographic study using (³H)-proline. *Calcif. Tiss. Res.*, v. 18, p. 987-998, 1975.
13. MAIN, J.H.P., ADAMS, D. Experiments on the rat incisor into cellular proliferation and blood pressure theories of tooth eruption. *Archs. Oral. Biol.*, v. 11, p. 163-168, 1966.
14. MASSINI, N. *Estudo do crescimento dentário de ratos tratados com Ciclofosfamida (Enduxan[®])*. Piracicaba, 1976. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.
15. MIKKELSEN, H.B. Acute and protracted effects of vinblastine on odontoblast and dentinogenesis in rat incisors. *Scand. J. Dent. Res.*, v. 86, p. 313-324, 1978.
16. MOE, H. On the effect of vinblastine on ameloblasts of rat incisors *in vivo*. 3. Acute and protracted effect on differentiating ameloblasts, a light microscopical study. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, v. 85, p. 330-334, 1977.
17. MOE, H., MIKKELSEN, H. Light microscopical and ultra structural observations on the effect of vinblastine on ameloblasts of rat incisors *in vivo*. 1. Short term effect on secretory ameloblasts. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, v. 85, p. 73-88, 1977.
18. NORDLIRER, H. Malformations in newborn rats treated with a single dose of cyclophosphamide. *Acta Soc. Med. Upsal.*, p. 87-90, 1971.
19. OGURA, H. Studies on inhibitory action of drugs on development of dentine. *Hard. Tissue Research.*, v. 1, p. 561-591, 1969.

20. RANALI, J. *Influência da ametopterina (Methotrexato^R) sobre o crescimento dentário dos incisivos inferiores de ratos*. Piracicaba, 1976. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.
21. ROBINS, M.W. The proliferation of pulp cells in rat incisors. *Arch. Oral Biol.*, v. 12, p. 487-501, 1967.
22. RUCH, J.V., KARCHER-DJURICIC, V., STAUBLI, A., FABRE, M. Effects de la cytochatalasine B et de la colchicine sur cytodifférentiations dentaire *in vitro*. *Arch. d'Anatomie Microscopique*, v. 64, p. 113-134, 1975.
23. VALERIOTE, F., SANTELLI, G. 5-fluouracyl (FUra). *Pharmacol. Ther.*, v. 24, p. 107-132, 1984.
24. WALSH, J.E. A prova de Walsh. In: SIEGEL, S. *Estatística não-paramétrica*. Trad. Alfredo Álvés de Farias. Rio de Janeiro: Mc Graw-Hill do Brasil, 1975. p. 93-98.

Recebido em 9.9.1991.