

EFEITO TRANSPLACENTÁRIO DO ISOPROTERENOL (IPT) NO DESENVOLVIMENTO DO PALATO SECUNDÁRIO E DE ESTRUTURAS BUCO-DENTÁRIAS DE CAMUNDONGOS *Mus musculus**

Zuleice Viana da SILVEIRA**
Maria Tereza Giroto MATHEUS**
Mauro Airton RULLI**

- **RESUMO:** Estudou-se o efeito tóxico e teratogênico do IPT em uma linhagem não-isogênica de camundongos albinos *Mus musculus*, com especial referência ao desenvolvimento do palato secundário. O tratamento foi feito utilizando-se a dose final de 8 mg/animal, administrada em épocas diferentes do desenvolvimento fetal e de duas formas diferentes. Os resultados mostraram que o efeito da droga, tanto no desenvolvimento do palato secundário quanto nas demais estruturas embrionárias estudadas, está relacionado à idade fetal na época do tratamento bem como à frequência diária de administração da droga, e não com a dose final utilizada. Por outro lado, tal efeito é reversível com a supressão do tratamento. O efeito embriotóxico é diretamente proporcional à dose diária administrada. Embora ambos os efeitos possam se manifestar independentemente, há indicação de que dependem dos genótipos dos animais utilizados. As alterações observadas parecem ser consequência de perturbações na fisiologia materna e não de um efeito primário do fármaco utilizado.
- **UNITERMOS:** Isoproterenol; camundongos; palato.

Introdução

A fenda palatina é descrita na literatura como a principal malformação observada em camundongos, quer em decorrência da privação de água e de alimento,¹⁷ quer após a administração de derivados da fentiazina,¹⁸ do diazepam e da fenil hidantoína,¹² em doses bastante próximas da considerada tóxica. Por outro lado, essa malformação é, também, especialmente induzida por um número de agentes teratogênicos em doses que não são tóxicas para as fêmeas.⁹ Tais experimentos foram feitos levando-se em conta a época do desenvolvimento fetal, uma vez que foi demonstrada em

* Trabalho subvencionado pela FAPESP (Proc. Biol. Nº 82/861-6) e CPE – UNESP (Proc. 3829/18 – Projeto (15/2ª).

** Departamento de Morfologia – Faculdade de Odontologia – UNESP – 16015-050 – Araçatuba – SP.

camundongos a ocorrência de fenômenos moleculares implicados na horizontalização das cristas palatinas entre o 11º e 13º dia de vida fetal.^{3, 4, 7, 8, 10, 11, 19, 20}

As malformações fetais descritas em camundongos em decorrência de tratamentos com doses altas de determinadas drogas apresentam-se com um padrão característico. Há evidência de que a severidade e a incidência de tais malformações estão diretamente relacionadas ao grau de toxidez materna. Tais defeitos são raros ou ausentes em doses não-tóxicas para a ninhada. Acredita-se que as alterações resultantes da toxidez materna provavelmente não sejam um efeito primário da droga, mas sim decorrentes de mudanças fisiológicas.⁹

Os mecanismos bioquímicos que controlam a diferenciação do palato são bastante conhecidos. Foi demonstrado que a regulação hormonal dos níveis de AMP cíclico é importante para o desenvolvimento tanto normal quanto anormal do palato.⁶ Tais evidências sugerem que os níveis deste nucleotídeo cíclico, possivelmente regulados pela prostaglandina e/ou pela ocupação dos receptores de catecolaminas, podem ter um papel importante no desenvolvimento normal em geral e na diferenciação da região buco-facial, e podem servir como foco metabólico para perturbação teratogênica resultando em fenda palatina.

Considerando-se que o IPT, simpatomimético beta-adrenérgico, estimula a síntese de AMP cíclico em determinados tecidos e que também pode ser utilizado no tratamento de asma brônquica em humanos, o objetivo do presente trabalho é estudar os efeitos embriotóxico e teratogênico deste fármaco em uma linhagem não-endogâmica de camundongos, com especial referência ao desenvolvimento do palato secundário.

Material e métodos

Animais utilizados

Foram utilizadas 84 fêmeas prenhes de uma linhagem não-isogênica de camundongos *Mus musculus*, var. albino Swiss, com aproximadamente 90 dias de idade e pesando em média 40 gramas, que foram cruzadas com 28 machos de aproximadamente 60 dias de idade e pesando em média 40 gramas. Os animais estudados eram provenientes do Biotério Central do Campus de Botucatu (UNESP), foram cruzados durante a noite e a manhã seguinte, quando se verificou o *plug* vaginal; foi então considerada como meio-dia de prenhez. As fêmeas foram colocadas em gaiolas individuais onde receberam ração* e água à vontade.

* Ração Produtor. Moinho Primor S/A.

O experimento foi feito em várias etapas de cruzamentos, no verão, com a temperatura ambiente oscilando entre 24° e 35° C.

Grupos experimentais e tratamento

As fêmeas prenhes foram distribuídas em quatro grupos, a saber: os grupos-controle constituíram-se de 32 fêmeas que receberam injeções intraperitoneais de 0,5 ml de salina da seguinte maneira: 16 no 11,5 e 12,5 dias de prenhez e foi denominado C₁; as 16 restantes formaram o grupo C₂ e receberam injeções diárias do 11,5º ao 14,5º dia.

As 52 fêmeas restantes constituíram os grupos tratados e foram distribuídas em dois grupos que receberam injeções intraperitoneais de DL-isoproterenol-HCl* da seguinte maneira: 32 no 11,5 e 12,5 dias de prenhez (4 mg/dia) e foi denominado T₁; as 20 restantes formaram o grupo T₂ e receberam injeções diárias do 11,5º ao 14,5º dia de prenhez (2 mg/dia). Dessa forma, cada animal recebeu uma dose total de 8 mg do fármaco no final dos tratamentos. Considerando-se que morreram 16 fêmeas do grupo T₁ e 4 do grupo T₂, foram então analisados os descendentes de 32 fêmeas sobreviventes, sendo 16 de cada grupo tratado.

Obtenção dos fetos e aspectos estudados

Os fetos utilizados tanto nos grupos-controle quanto nos tratados foram obtidos por cesariana em fêmeas sacrificadas por deslocamento cervical, quatro por dia, do 15,5º ao 18,5º dia de prenhez, após o que se fez a dissecação das placentas. Tanto nos grupos-controle quanto nos tratados foi contado o número de sítios de implantação, bem como determinadas as frequências de reabsorção e de morte fetal, cujos dados foram resumidos na Tabela 1.

Fetos vivos de todas as ninhadas, tanto dos grupos-controle quanto dos tratados, foram analisados quanto à presença de malformações externas, decapitados e fixados em formol neutro a 10% por 24 horas. Todos os fetos foram analisados ao microscópio estereoscópico quanto ao estágio de desenvolvimento do palato secundário. Para melhor observação da estrutura estudada, a língua e a mandíbula dos fetos foram removidas, com a utilização de tesoura oftalmológica e pinça de ponta fina. Algumas cabeças foram mantidas íntegras para obtenção de cortes histológicos.

* Sigma.

Tabela 1 - Resumo dos efeitos embriotóxico e teratogênico do IPT em fetos de camundongos *Mus musculus*

Idade fetal (dias)	Grupos de animais	Nº de fêmeas	Nº de fetos vivos	M + R	Estágios do palato			
					V	H	LF	F
15,5	C ₁	4	52	2	0+	0	0	52(100)++
	T ₁	4	39	11	3(7.7)	7(17.9)	29(74.4)	0
	C ₂	4	48	1	0	0	0	48(100)
	T ₂	4	45	4	12(26.7)	14(31.1)	19(42.2)	0
16,5	C ₁	4	46	1	0	0	0	46(100)
	T ₁	4	39	9	0	0	0	39(100)
	C ₂	4	46	2	0	0	0	46(100)
	T ₂	4	43	3	2(4.7)	8(18.6)	23(53.5)	10(23.3)
17,5	C ₁	4	47	2	0	0	0	47(100)
	T ₁	4	31	8	0	0	0	31(100)
	C ₂	4	50	2	0	0	0	50(100)
	T ₂	4	43	3	0	0	5(11.6)	38(88.4)
18,5	C ₁	4	48	1	0	0	0	48(100)
	T ₁	4	40	7	0	0	0	40(100)
	C ₂	4	47	1	0	0	0	47(100)
	T ₂	4	39	2	0	0	0	39(100) _p

+ = Número de fetos.

++ = Entre os parênteses encontram-se as percentagens.

M+R = Fetos mortos e reabsorvidos.

V = Cristas palatinas no plano vertical.

H = Cristas palatinas no plano horizontal e com um espaço entre elas.

LF = Linha de fusão recente.

F = Cristas palatinas fusionadas e ausência da LF.

Análise histológica e estágios de desenvolvimento do palato

As cabeças dos fetos de camundongos, tanto dos grupos-controle quanto dos tratados, após a fixação, foram descalcificadas em EDTA e formol, incluídas em parafina de modo a fornecerem cortes frontais de 6 µm de espessura e corados, a maioria, pela reação de Feulgen e *fast-green*¹³ e, alguns, com Hematoxilina e Eosina

a 1% em solução aquosa ou pela reação do PAS.¹³ Os cortes foram analisados e fotografados ao fotomicroscópio Zeiss.

Procurou-se estabelecer, para a linhagem estudada no presente trabalho, a relação entre a idade fetal e o desenvolvimento do palato secundário e de outras estruturas relacionadas ao aparelho bucal, nos períodos correspondentes ao tratamento com a droga (11,5 a 14,5 dias) e pós-tratamento (15,5 a 18,5 dias), a saber: germes dentários, blastema ósseo e diferenciação da cartilagem de Meckel.

A partir da observação microscópica dos cortes dos fetos dos grupos-controle, os estágios de desenvolvimento do palato secundário foram caracterizados de acordo, principalmente, com a posição das cristas palatinas e designados por uma letra maiúscula, a saber: no plano vertical, (V); no plano horizontal e com um espaço entre elas, (H); fusionadas e com linha de fusão recente, (LF); e fusionadas e sem a linha de fusão evidente, (F).

Resultados

As Figuras 1, 3 e 5 são de fetos descendentes de fêmeas não tratadas e mostram que aos 15,5 dias de vida fetal os palatos secundários dos camundongos da linhagem estudada já estavam fechados. Entretanto, a comparação dos dados dos grupos-controle e tratados revela que, independentemente do período do tratamento bem como da dose diária administrada, o IPT não impediu a fusão das cristas palatinas, porém, interferiu no processo, atrasando-o (compare as Figuras 1, 3 e 5 com 2, 4, 6 e 8).

A frequência de fetos do grupo T₁ que apresentaram seus palatos totalmente fechados aos 16,5 dias foi de 100%; já no grupo T₂, foi de apenas 23,3%, e aos 17,5 dias, aproximadamente 88,4%. A fusão das cristas palatinas em 100% dos descendentes, neste grupo, somente foi verificada no 18,5º dia (Tabela 1).

Além dos efeitos já descritos, o IPT interferiu no desenvolvimento das patas dos descendentes apenas de fêmeas tratadas do grupo T₂. Esses fetos apresentaram no 17,5º dia um desenvolvimento de tais estruturas correspondente a estágios anteriores em fetos dos grupos-controle, ou seja, entre o 13,5º e o 14,5º dia. Nos descendentes de fêmeas do grupo T₁, nesta mesma idade, não se verificou tal efeito.

Fetos de ambos os grupos tratados com IPT, analisados aos 15,5 e 16,5 dias, apresentaram atraso no desenvolvimento do palato secundário bem como de outras estruturas bucais, como a língua e os germes dentários (compare a Figura 7 com a 2 e a 8). Entretanto, observou-se, na maioria dos fetos do grupo T₂ com palatos abertos no 16,5º dia, a horizontalização das cristas palatinas e intensa proliferação das células mesenquimais bem como estratificação do epitélio de revestimento da cavidade bucal e da língua (Figuras 4 e 6, respectivamente).

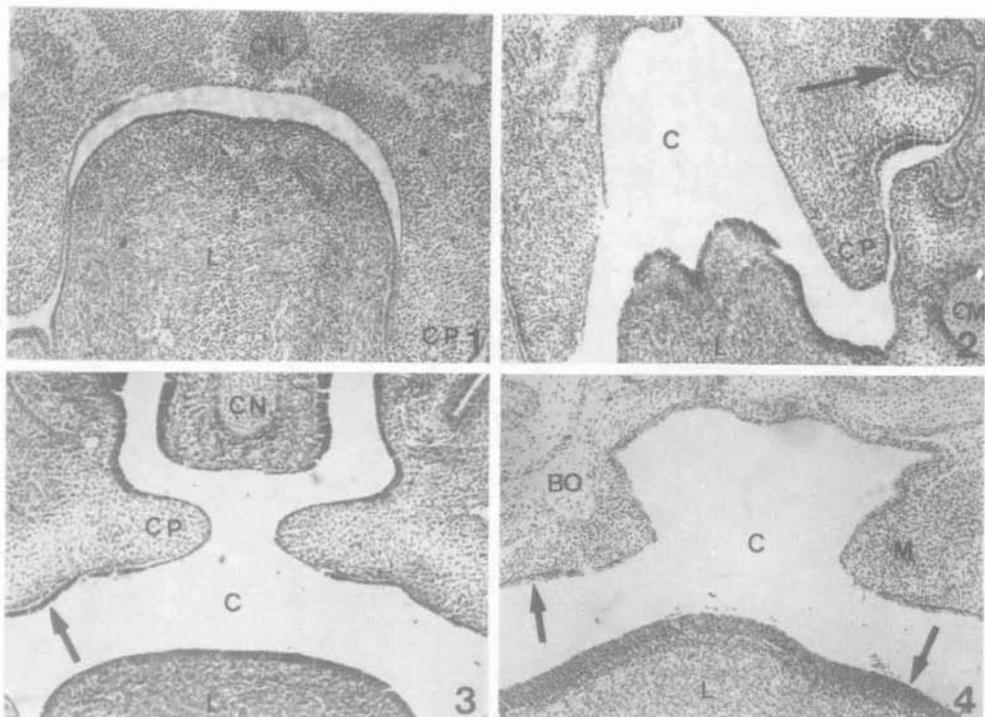


FIGURA 1 - Corte frontal da cabeça de camundongo *Mus musculus* do grupo-controle. 13,5 dias. Feulgen. 7,9X.

FIGURA 2 - Corte frontal da cabeça de camundongo *Mus musculus* do grupo tratado com IPT. 15,5 dias. Feulgen. 7,9X.

FIGURA 3 - Corte frontal da cabeça de camundongo *Mus musculus* do grupo-controle. 14,5 dias. Feulgen. 7,9X.

FIGURA 4 - Corte frontal da cabeça de camundongo *Mus musculus* do grupo tratado com IPT. 15,5 dias. Feulgen. 7,9X.

Ao contrário do que se observou em fetos com os palatos fechados dos grupos-controle, onde a coloração do blastema ósseo pela reação do PAS era fracamente positiva, nos animais tratados do grupo T₂ a mesma coloração apresentou-se bastante forte. Por outro lado, as cartilagens dos processos nasais e de Meckel apresentaram fraca intensidade de coloração, semelhante nos grupos-controle e tratados em idades correspondentes.

A análise da Tabela 1 mostra que dos 396 fetos das 32 ninhadas dos grupos-controle (C₁ = 199 e C₂ = 197), aproximadamente 3% foram reabsorvidos ou mortos, enquanto nos grupos tratados T₁ (184 fetos) e T₂ (182 fetos), a percentagem média foi de, aproximadamente, 19,0% e 6,6%, respectivamente, mostrando aumento acentuado nos grupos tratados com IPT e um maior efeito letal no grupo T₁.

Discussão

A avaliação do efeito do IPT nos dois grupos tratados, ou seja, a sua influência isolada no fusão do palato secundário em fetos de fêmeas do grupo T₁ e o

atraso induzido no desenvolvimento das patas em fetos do grupo T₂ cujos palatos estavam fechados, sugere influência da época do tratamento e da forma de administração do fármaco. Entre o 13,5 e o 14,5 dia de vida intra-uterina devem estar ocorrendo, além de outros eventos, aqueles relacionados a diferenciação e desenvolvimento das estruturas mencionadas e, desta forma, os animais do grupo T₁ teriam menor chance de serem afetados, apesar da dose diária ter sido maior, uma vez que o tratamento com o IPT foi feito no 11,5 e no 12,5 dia de prenhez.

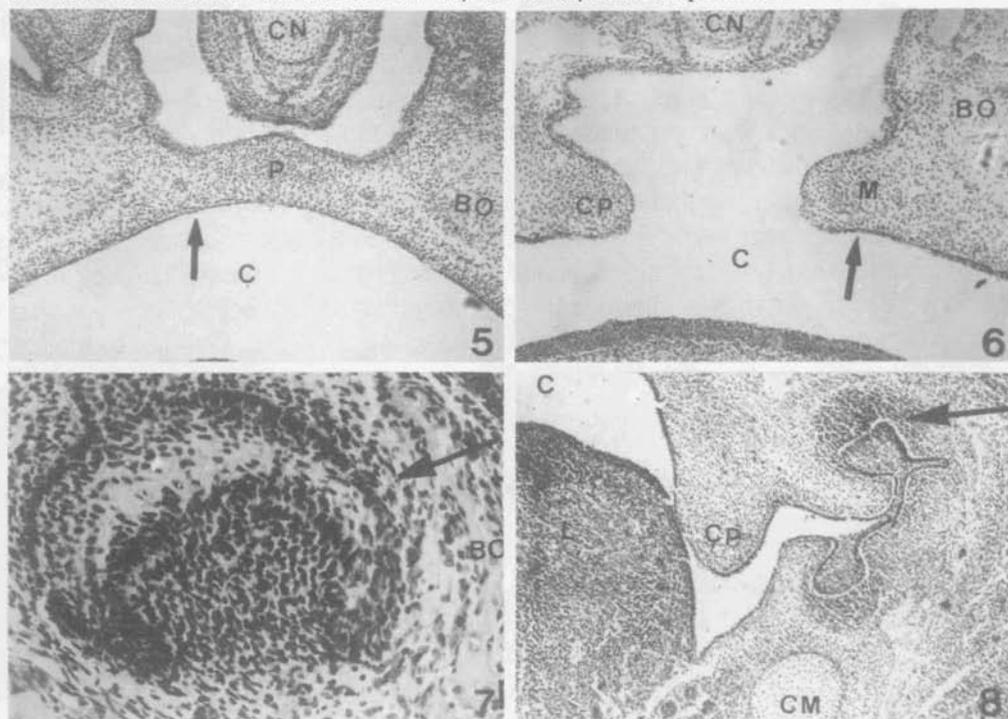


FIGURA 5 - Corte frontal da cabeça de camundongo *Mus musculus* do grupo-controle. 15,5 dias. Feulgen. 7,9X
 FIGURA 6 - Corte frontal da cabeça de camundongo *Mus musculus* do grupo tratado com IPT. 15,5 dias. Feulgen. 7,9X
 FIGURA 7 - Corte frontal da cabeça de camundongo *Mus musculus* do grupo-controle. 16,5 dias. Feulgen. 20X.
 FIGURA 8 - Corte frontal da cabeça de camundongo *Mus musculus* do grupo tratado com IPT. 16,5 dias. Feulgen. 7,9X.

Somando-se a essas observações o fato de a frequência de fetos com palatos abertos aos 15,5 dias ter sido maior no grupo T₂ que no grupo T₁, e que apenas no primeiro foram observados descendentes com as mesmas características aos 16,5 dias, o efeito do IPT nesses animais deve estar relacionado à idade fetal na época do tratamento bem como à frequência de administração da droga, e não com a dose final administrada. Embora mais prolongado no grupo T₂, o efeito mostrou-se reversível nos dois tipos de tratamento como era de se prever, devido à metabolização do IPT com a supressão do tratamento.

Considerando-se que o AMP cíclico é um modulador da diferenciação celular numa grande variedade de tecidos em desenvolvimento,^{1, 2, 14, 21} inclusive do palato,^{3, 4, 5}

era de se esperar que o IPT, devido à sua propriedade de aumentar a concentração intracelular deste nucleotídeo cíclico em vários tecidos, acelerasse o desenvolvimento do palato nos camundongos estudados, principalmente se considerarmos que Pratt & Martin¹⁵ induziram *in vitro* a diferenciação precoce dos tecidos do palato utilizando AMP cíclico exógeno. Entretanto, nas condições em que o experimento foi feito, ocorreu o contrário do que se esperava, uma vez que o tratamento com o IPT atrasou o desenvolvimento do palato e de outras estruturas embrionárias.

Os eventos bioquímicos responsáveis pela diferenciação celular e o desenvolvimento tanto do palato quanto das demais estruturas embrionárias são programados dentro de uma determinada seqüência harmônica e em "momentos", de tal modo que é de se esperar que qualquer mudança brusca devido a um fator ambiental, por exemplo, a administração de uma droga que afete a síntese e/ou degradação de substâncias envolvidas no processo possa alterá-lo ou mesmo impedi-lo.

Portanto, levando-se em conta esse princípio, e considerando-se que a dose de IPT utilizada foi alta e tóxica para 50% das fêmeas do grupo T₁ e para 20% do grupo T₂, bem como o aumento das freqüências de mortalidade e reabsorção fetal nos dois grupos tratados, quando comparados aos grupos-controle, é provável que os efeitos morfológicos observados sejam devidos a perturbações na fisiologia materna, e não a um efeito primário da droga.

O fato de freqüências de fetos reabsorvidos e mortos serem semelhantes nos dois grupos-controle indica que os efeitos observados nos animais dos grupos tratados são decorrentes apenas do fármaco administrado, e não do estresse provocado pela manipulação e tratamento das fêmeas prenhes.

Como era de se esperar, as variações observadas na manifestação dos efeitos morfológicos nos fetos, bem como na sensibilidade tanto materna quanto fetal em resposta à droga utilizada, ocorreram devido à variabilidade genética dos animais, já que a linhagem utilizada era não-isogênica.

Conclusões

O efeito do IPT tanto no desenvolvimento do palato secundário quanto no das demais estruturas embrionárias na linhagem estudada está relacionado à idade fetal na época do tratamento, bem como à concentração diária do IPT administrado, e não com a dose final utilizada.

O efeito embriotóxico é diretamente proporcional à dose diária administrada.

O efeito teratogênico é reversível com a suspensão do tratamento.

Os efeitos teratogênico e embriotóxico podem se manifestar independentemente, embora pareçam depender dos genótipos dos fetos.

Há indicação de que as alterações observadas nos fetos sejam devidas à toxidez materna e não a um efeito primário da droga.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Sebastião Hetem (Disciplina de Histologia e Embriologia), pela leitura do manuscrito, críticas e sugestões.

Aos funcionários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (UNESP): Sandra Aparecida dos Santos, Marilde Nascimento Matos Bento, Washington de Brito Martins e Maria Dirce Colli Boatto, pelo auxílio na parte técnica; Araci Alves dos Santos, pelo trabalho fotográfico; e Shirleni Cantieri Cavazana, pelo trabalho datilográfico.

SILVEIRA, Z. V. da et al. Transplacental effects of isoproterenol (IPT) on the development of the secondary palate and buco-dental structures of the mice *Mus musculus*. *Rev. Odontol. UNESP*, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 9-18, 1993.

- **ABSTRACT:** *The toxic and teratological effects of IPT on a non isogenic breeding of albinus mice Mus musculus were studied, with special reference to the secondary palate development. The treatment was done using a final dose of 8 mg/animal administered at different times of fetal development and in two different ways. The results showed that the secondary palate development as well as the other embryonic structures studied are related to the fetal age at the treatment period as well as the daily frequency of the drug administration but not with the final dose used. On the other hand, such effects are reversible with the treatment suppression. The embryotoxic effect is in direct ratio to the daily administered dose. In spite of that both effects could appear independently each other, there is an indication that they are dependent of the genotype of the animals. The changes observed seem to be derived from disturbs of maternal physiology and not as a primary effect of the drug used.*
- **KEYWORDS:** *Isoproterenol; mice; palate.*

Referências bibliográficas

1. AHRENS, P. B., SOLURSH, M., REITER, R. S. (1977). *Dev. Biol.*, v. 60, p. 69-82. Apud GREENE, R. M., GAMBARINO, M. P. Role of cyclic AMP, prostaglandins, and catecholamines during normal palate development. *Curr. Top. Dev. Biol.*, v. 19, p. 65-79, 1984.
2. CHAPMAN, L. P. (1981). *Exp. Cell Res.*, v. 135, p. 415-8. Apud GREENE, R. M., GAMBARINO, M. P. Role of cyclic AMP, prostaglandins, and catecholamines during normal palate development. *Curr. Top. Dev. Biol.*, v. 19, p. 65-79, 1984.
3. GREENE, R. M., PRATT, R. M. Correlation between localization of adenylate cyclase during development of the second palate. *J. Histochem. Cytochem.*, v. 27, p. 924-31, 1979.
4. GREENE, R. M. et al. Immunohistochemical localization of cyclic AMP in the developing rodent secondary palate. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, v. 60, p. 271-81, 1980.
5. GREENE, R. M. et al. Glucocorticoid inhibition of cyclic AMP in the developing secondary palate. *J. Craniofac. Genet. Dev. Biol.*, v. 1, p. 31-44, 1981.

6. GREENE, R. M., GAMBARINO, M. P. Role of cyclic AMP, prostaglandins, and cotecholamines during normal palate development. *Curr. Top. Dev. Biol.*, v. 19, p. 65-79, 1984.
7. HARPER, K., BURNS, R., ERICKSON, R. P. Genetics aspects of the effects of methylmercury in mice: the incidence of cleft palate and concentrations of adenosine 3': 5' Cyclic Monophosphate in tongue and palatal shelf. *Teratology*, v. 23, p. 387-401, 1981.
8. JACOBS, R. M. Histochemical study of morphogenesis and teratogenesis of the palate in mouse embryos. *Anat. Rec.*, v. 149, p. 691-8, 1964.
9. KHERA, K. S. Maternal toxicity – possible factor in fetal malformations in mice. *Teratology*, v. 29, p. 411-6, 1984.
10. LARSSON, K. S. Studies in the closure of the secondary palate. *Exp. Cell Res.*, v. 21, p. 498-503, 1960.
11. LARSSON, K. S. Studies on the closure of the secondary palate. IV. Autorradiographic and histochemical studies of the mouse embryos from cortisone – treated mothers. *Acta Morphol. Nerrtl. Scand.*, v. 4, p. 369-86, 1962.
12. MILLER, R. P., BECKER, B. A. Teratogenicity of oral diazepam and diphenylhydantoin in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v. 32, p. 53-61, 1975.
13. PEASE, A. G. E. Histochemistry: teoretical and applied. Boston: Little Brown, 1968. p. 759.
14. PERRY, J. W., OKA, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 77, p. 2093-7. Apud GREENE, R. M., GAMBARINO, M. P. Role of cyclic AMP, prostaglandins, and cotecholamines during normal palate development. *Curr. Top. Dev. Biol.*, v. 19, p. 65-79, 1984.
15. PRATT, R. M., MARTIN, G. R. Epithelial cell death and cyclic AMP increase during palatal development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 72, p. 874-7, 1975.
16. PRATT, R. M. et al. Cortisone induced cleft palate in the brachymorphic mouse. *Teratogenesis Carcinog. Mutagen*, v. 1, p. 15-23, 1980.
17. SZABO, K. T., BRENT, R. L. Species differences in experimental teratogenesis by tranquillising agents. *Lancet*, v. 1, p. 565, 1974.
18. SZABO, K. T., BRENT, R. L. Reduction of drug-induced cleft palate in mice. *Lancet*, v. 1, p. 1296-7, 1975.
19. WALKER, B. E. Effects of hypervitaminosis A on palate development in two strains of mice. *Am. J. Anat.*, v. 197, p. 49-58, 1960.
20. WALKER, B. E. The association of mucopolysaccharides with morphogenesis of the palate and other structures in mouse embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, v. 9, p. 22-31, 1961.
21. ZALIN, R. J., LEAVER, R. *FEBS Lett.*, v. 53, p. 33-6. Apud GREENE & GAMBARINO, M. P. Role of cyclic AMP, prostaglandins, and cotecholamines during normal palate development. *Curr. Top. Dev. Biol.*, v. 19, p. 65-79, 1984.

Recebido em 1.4.1992.