

# EFEITOS DO METOTREXATO SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE GERMES DENTAIS TRANSPLANTADOS PARA A CÂMARA ANTERIOR DO OLHO

Sebastião HETEM\*

Eleny Balducci ROSLINDO\*

Lizeti Toledo de Oliveira RAMALHO\*

Nelson Caldeira ROSLINDO\*

Fabiana Simões ZUNFRILLI\*\*

- **RESUMO:** Camundongos fêmeas, prenhes, aos 14 ou aos 17 dias de gestação, foram sacrificadas e os germes dentais dos primeiros molares inferiores dos fetos dissecados e conservados em meio de cultura. Camundongos adultos, machos, foram anestesiados e receberam os germes dentais como transplantes na câmara anterior do olho. Os hospedeiros foram injetados com 5 mg/kg de metotrexato durante 3 dias e sacrificados 1, 2, 3, 4 e 5 dias após a última injeção. Animais controles foram injetados com água destilada. Os resultados mostraram-se compatíveis entre os animais do grupo controle e do grupo tratado. Diante dos resultados encontrados, pode-se concluir que, nas condições experimentais deste trabalho, o metotrexato mostrou-se biologicamente compatível com o desenvolvimento do órgão dental nos estágios analisados.
- **PALAVRAS-CHAVE:** Metotrexato; germe de dente, desenvolvimento; transplante intra-ocular.

## Introdução

O metotrexato (MTX) é encontrado também sob o nome comercial de Methotrexate e apresentado em forma de comprimidos com 2,5 mg-veículo qsp, 1 comprimido ou solução injetável sem preservativos, em duas versões: com 50 mg veículo qsp 2 ml ou 500 mg veículo qsp 20 ml, ou ainda, sob a forma de pó, 50 mg.

É um potente agente quimioterápico utilizado no tratamento de certas neoplasias do sistema reprodutor feminino;<sup>4</sup> entretanto, é letal ou teratogênico ao embrião de coelho<sup>3</sup> e, como tal, deve atuar sobre estruturas em desenvolvimento à semelhança da ciclofosfamida<sup>\*\*\* 8, 9,10,11,12, 21</sup> e da colchicina.<sup>16, 17</sup>

\* Departamento de Morfologia - Faculdade de Odontologia - UNESP - 14801-903 - Araraquara - SP.

\*\* Estagiária do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia - UNESP - 14801-903 - Araraquara - SP. Bolsista do CNPq - PIBIC 93/94.

\*\*\* HETEM, S., FERGUSON, M. W. J. Effects of cyclophosphamide on tooth germ development in vitro. Comunicação pessoal, 1994.

Considerando que os germes dentais e o palato em desenvolvimento são estruturas sujeitas a grande atividade celular e que são francamente influenciadas pelo metotrexato,<sup>19</sup> é o propósito deste trabalho verificar os efeitos do metotrexato administrado durante o período de experimentação sobre o desenvolvimento do germe dental implantado na câmara anterior do olho de camundongos hospedeiros.

## **Material e método**

Camundongos fêmeas, albinas, foram acasaladas com machos da mesma espécie, na proporção de 2 fêmeas para cada macho, em gaiolas individuais. O acasalamento foi feito apenas no período noturno e as fêmeas examinadas na manhã seguinte, para verificação da presença de *plug* vaginal. A identificação do *plug* marcou o dia zero da gestação. Os animais foram sacrificados aos 14 ou aos 17 dias de gestação, e o útero com os fetos assepticamente removidos. A seguir, os fetos, mantidos em meio de cultura, foram examinados, tiveram suas idades confirmadas pelos critérios morfológicos<sup>7</sup> e decapitados; as cabeças ficaram mantidas no meio de cultura, as mandíbulas removidas e os germes dentais dos primeiros molares inferiores de ambos os lados, dissecados. Os germes dentais foram implantados na câmara anterior do olho de camundongos hospedeiros, com auxílio de uma lupa esteroscópica. Os animais foram injetados por via intraperitoneal, durante 3 dias, com 5 mg/kg de peso corporal de metotrexato (Bristol) ou methotrexate (Lederle). Os animais controles foram injetados pela mesma via, com um volume equivalente de água destilada. Em todos os casos, parte dos germes dentais dos animais de uma mesma ninhada foi utilizada como controle do respectivo grupo tratado.

Os animais hospedeiros foram sacrificados 1, 2, 3, 4 e 5 dias após a administração da última injeção, por deslocamento cervical ou por inalação excessiva de éter sulfúrico.

Os globos oculares foram removidos, fixados em formol a 10%, descalcificados em solução de citrato de sódio e ácido fórmico em partes iguais<sup>15</sup> e incluídos em parafina. Os blocos foram cortados com 6 µm de espessura, corados com hematoxilina e eosina e analisados em microscopia de luz para verificação comparativa do estágio de desenvolvimento do germe dental, entre os animais dos grupos tratados e controles, nos diferentes períodos de observação.

## **Resultado**

### **14 dias**

#### **Controle**

Os germes dentais transplantados para a câmara anterior do olho dos animais controles apresentaram-se bem constituídos e evoluídos em relação às suas características no momento da sua obtenção.

Assim, pôde-se verificar que, apesar de haver ocorrido algumas variações individuais, os germes dentais apresentavam-se em fase de campânula avançada aos 2 dias após a interrupção da administração das injeções (Figura 1). Nestes casos, era evidente o órgão do esmalte com suas quatro camadas típicas. O retículo estrelado era bastante volumoso e os ameloblastos apresentavam-se como células altas e justapostas umas às outras. A papila dental era rica em células uniformemente distribuídas e revestida pela camada odontoblástica que se apresentava como células colunares baixas.

Aos 4 dias (Figura 2) e aos 5 dias (Figura 3), após a interrupção da administração das injeções, os germes dentais estavam mais evoluídos, alcançando uma fase de desenvolvimento em que se podia identificar o início da deposição de matriz de dentina. O retículo estrelado era a mais volumosa das quatro camadas do órgão do esmalte e os ameloblastos mostravam-se como células cilíndricas altas, polarizadas, e núcleos basais. Os odontoblastos, por outro lado, apresentavam-se também como células altas, polarizadas e com núcleos basais, tendo iniciado a deposição de dentina no nível das extremidades das cúspides.

### **Tratados**

Os germes dentais transplantados para a câmara anterior do olho dos animais tratados mostravam, 2 dias após a interrupção da administração do metotrexato, ter alcançado a fase de campânula avançada, na qual podia-se notar o órgão do esmalte com suas camadas características, sendo o retículo estrelado a mais volumosa delas. A camada ameloblástica mostrava-se distinta, composta por células cilíndricas altas. A papila dental era rica em células uniformemente distribuídas e mostrava na periferia os odontoblastos como células colunares baixas (Figura 4). Aos 5 dias após a interrupção da administração do metotrexato, os germes dentais mostravam-se bem desenvolvidos com a deposição de uma camada de dentina. O órgão do esmalte mostrava como estrutura mais desenvolvida o retículo estrelado e a camada ameloblástica era composta por células altas, polarizadas e com núcleo basal (Figura 5). A papila dental apresentava-se composta por células uniformemente distribuídas e revestida na sua periferia pelos odontoblastos que se apresentavam como células altas, polarizadas e com núcleos basais (Figuras 5 e 6).

### **17 dias**

#### **Controle**

Os germes de fetos com 17 dias transplantados para a câmara anterior do olho dos animais controles mostraram-se com todas as estruturas compatíveis com os germes dessa idade de desenvolvimento. O órgão do esmalte apresentava-se condensado em grande parte de sua estrutura, exceto nas áreas intercuspídeas, onde o retículo estrelado estava presente em maior volume. A quantidade de tecidos mineralizados era crescente a cada dia adicional de observação, e a camada de esmalte depositada era acompanhada da fileira de ameloblastos extremamente definida, como células cilíndricas altas e núcleo basal (Figuras 7, 8, 9 e 10). Os tecidos mineralizados apresentavam-se com suas estruturas, tais como canalículos dentinários, áreas carentes de esmalte, típicas do camundongo, além de áreas de esmalte acidorresistentes.

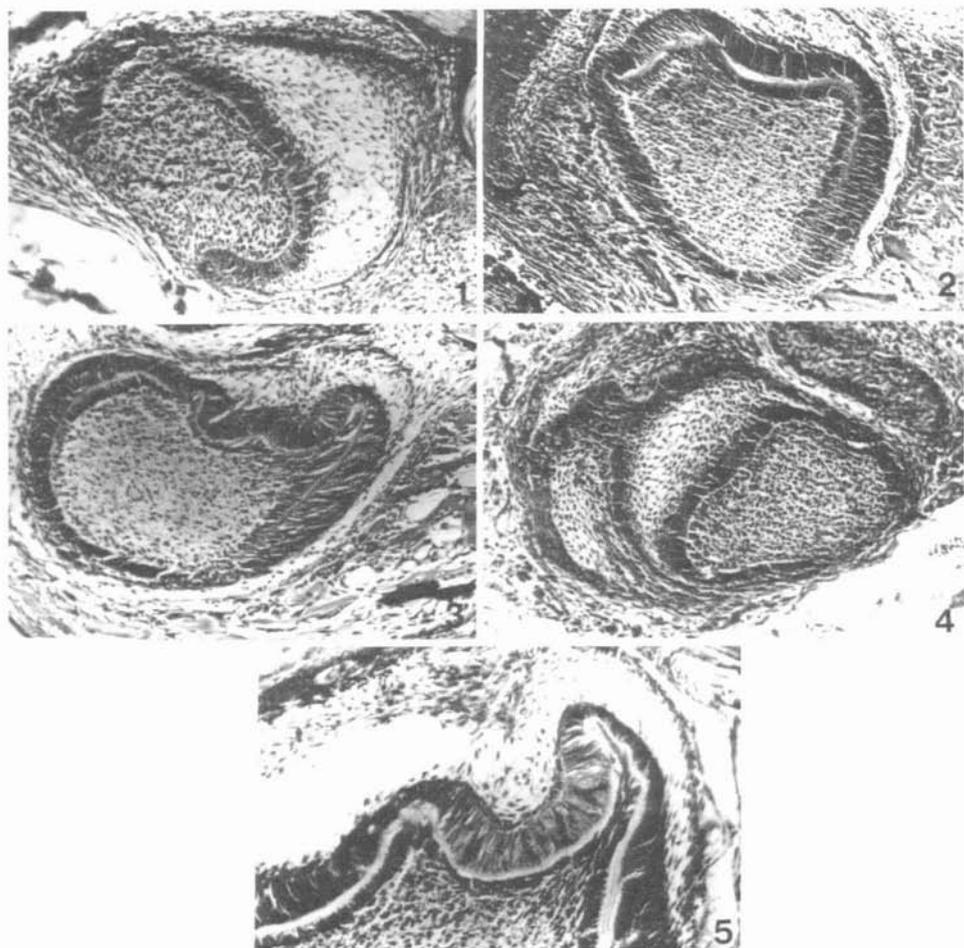


FIGURA 1 - Animal controle - Germe dental de feto com 14 dias, obtido 2 dias após a última injeção de água destilada. HE. 250X.

FIGURA 2 - Animal controle - Germe dental de feto com 14 dias, obtido 4 dias após a última injeção de água destilada. HE. 200X.

FIGURA 3 - Animal controle - Germe dental de feto com 14 dias, obtido 5 dias após a última injeção de água destilada. HE. 250X.

FIGURA 4 - Animal tratado - Germe dental de feto com 14 dias, obtido 2 dias após a última injeção de metotrexato (Bristol). HE. 250X.

FIGURA 5 - Animal tratado - Germe dental de feto com 14 dias, obtido 5 dias após a última injeção de metotrexato (Lederle). HE. 400X.

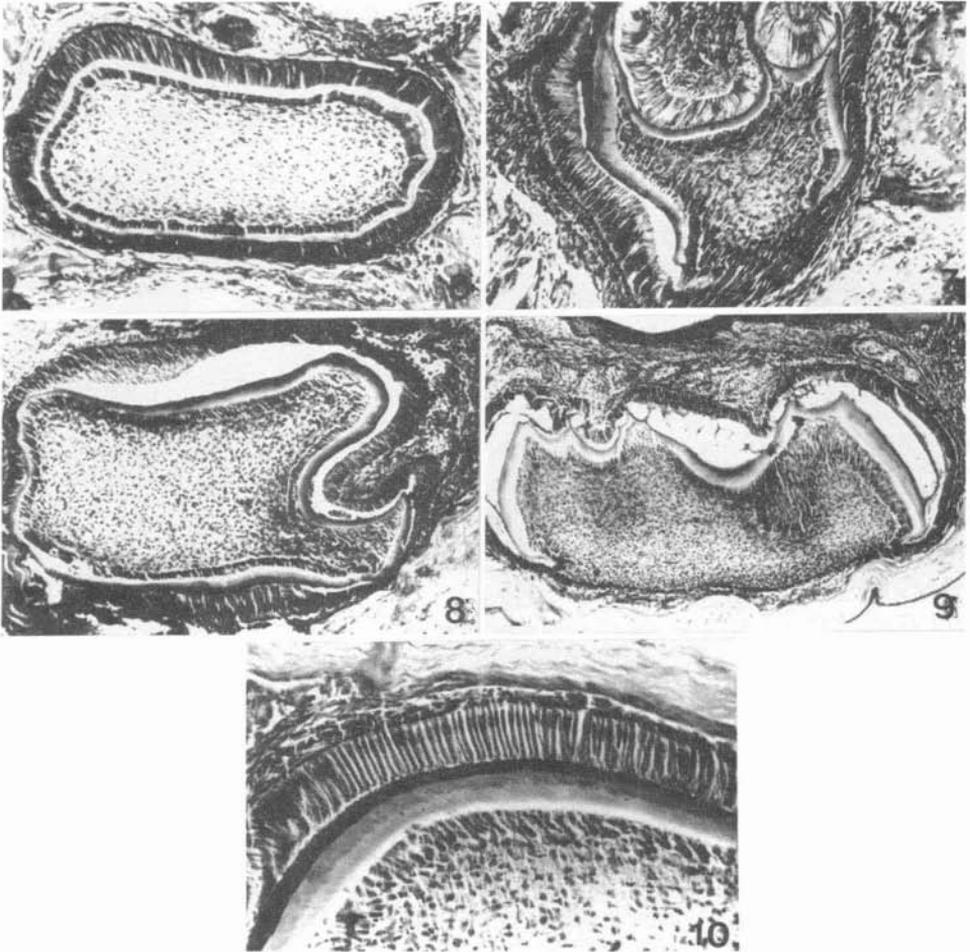


FIGURA 6 - Animal tratado - Germe dental de feto com 14 dias, obtido 5 dias após a última injeção de metotrexato (Lederle). HE. 250X.

FIGURA 7 - Animal controle - Germe dental de feto com 17 dias, obtido 4 dias após a última injeção de água destilada. HE. 250X.

FIGURA 8 - Animal controle - Germe dental de feto com 17 dias, obtido 4 dias após a última injeção de água destilada. HE. 156X.

FIGURA 9 - Animal controle - Germe dental de feto com 17 dias, obtido 5 dias após a última injeção de água destilada. HE. 156X.

FIGURA 10 - Animal controle - Germe dental de feto com 17 dias, obtido 5 dias após a última injeção de água destilada. HE. 400X.

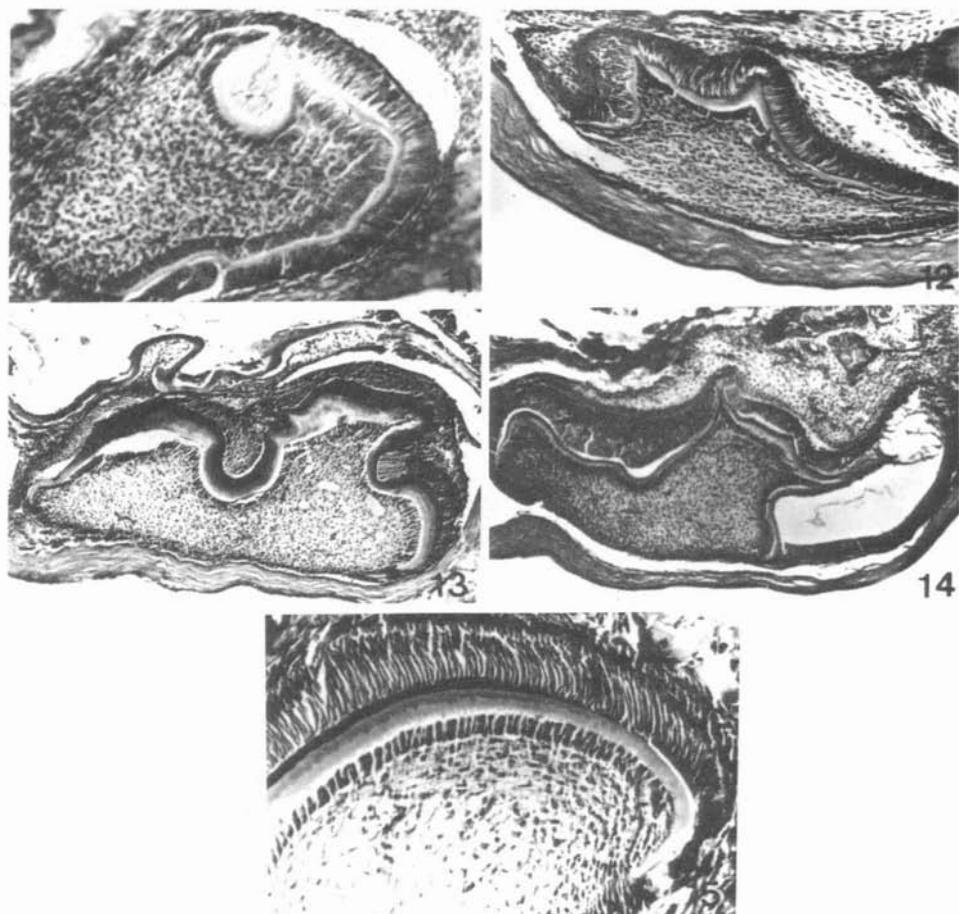


FIGURA 11 - Animal tratado - Germe dental de feto com 17 dias, obtido 2 dias após a última injeção de metotrexato (Bristol). HE. 312X.

FIGURA 12 - Animal tratado - Germe dental de feto com 17 dias, obtido 3 dias após a última injeção de metotrexato (Lederle). HE. 250X.

FIGURA 13 - Animal tratado - Germe dental de feto com 17 dias, obtido 5 dias após a última injeção de metotrexato (Bristol). HE. 125X.

FIGURA 14 - Animal tratado - Germe dental de feto com 17 dias, obtido 5 dias após a última injeção de metotrexato (Lederle). HE. 125X.

FIGURA 15 - Animal tratado - Germe dental de feto com 17 dias, obtido 5 dias após a última injeção de metotrexato (Bristol). HE. 400X.

Células uniformemente distribuídas, revestidas na sua periferia por uma camada de odontoblastos bem definida, constituída por células cilíndricas altas, constituíam a papila dental.

### **Tratados**

Os germes dentais de fetos com 17 dias transplantados para a câmara anterior do olho de animais hospedeiros, da mesma maneira que ocorreu com os animais controles, mostraram uma quantidade crescente de tecidos mineralizados a cada dia adicional de observação, a partir de 2 dias após a administração da última injeção de metotrexato. Dessa forma, pôde-se verificar a presença de uma camada de dentina aos 2 dias após a última injeção (Figura 11), o início da deposição de esmalte aos 3 dias após a administração da droga (Figura 12) e o aumento progressivo da espessura desses tecidos nos períodos subseqüentes (Figuras 13 e 14).

O órgão do esmalte apresentava suas camadas comprimidas nas áreas sobre as cúspides com retículo estrelado mais volumoso nas áreas intercuspídeas (Figura 13). A camada de ameloblastos era composta por células cilíndricas altas, polarizadas, com núcleos basais (Figuras 12 e 15). Os tecidos mineralizados, da mesma maneira como ocorreu nos controles, apresentavam todas as características próprias desses tecidos, ou seja, canaliculos dentinários, áreas carentes de esmalte e áreas do esmalte acidorresistentes.

A papila dental constituía-se por uma quantidade grande de células distribuídas uniformemente e revestida perifericamente pelos odontoblastos, que se apresentavam como células cilíndricas altas, polarizadas e com núcleos basais.

### **Discussão**

O molar do camundongo é um excelente modelo para o estudo de todos os períodos de desenvolvimento do germe dental, uma vez que a seqüência evolutiva, a calcificação e a sua erupção são similares aos correspondentes humanos.<sup>2</sup>

O mecanismo de ação do MTX baseia-se na inibição competitiva da enzima ácido fólico redutase, responsável pela redução do ácido fólico a ácido tetraidrofólico, sem a qual há inibição do processo de síntese de DNA e interferência na capacidade reprodutiva das células<sup>3, 4,13,18</sup> e, à semelhança da ciclofosfamida, sua ação reflete-se também sobre tecidos normais, apesar de atingir em maior grau o tecido maligno de atividade proliferativa mais intensa.

A administração de MTX a pacientes portadores de câncer causa diminuição da secreção de albumina e de imunoglobulina A pelas glândulas salivares; por outro lado, causa alterações estruturais dessas glândulas, tais como vacuolização, redução secretora e de RNA;<sup>13</sup> a teratogenicidade do MTX, em altas concentrações, ficou caracterizada pela indução de atrofia dos membros associada a alterações do desen-

volvimento do germe dental e do palato durante a vida fetal, o que não aconteceu quando doses baixas foram empregadas.<sup>19</sup> Cabe destaque também a observação de que os efeitos danosos do MTX são minimizados pela administração de leucovorina, um análogo estrutural de ácido fólico.<sup>3</sup>

De acordo com os dados encontrados neste trabalho, ante a utilização do MTX de ambas as procedências, não foram identificadas alterações do desenvolvimento do germe dental transplantado para a câmara anterior do olho, independentemente da idade fetal.

Esses resultados confirmam os relatos de que baixas doses de MTX (terapêutica) levam a resultados compatíveis com os encontrados em animais do grupo controle,<sup>19</sup> o que confirma também uma relação direta entre a dosagem utilizada e os efeitos verificados. Alterações severas do desenvolvimento foram também relatadas em estudos realizados em coelhos, utilizando uma dose de 19,2 mg/kg de peso, cujos efeitos foram minimizados pela administração de trimetilimidazolidina.<sup>4</sup>

Os achados deste trabalho não corroboram os que relatam defeitos em crianças cujas mães ingeriram 2,5 mg<sup>14</sup> ou 5,0 mg de metotrexato nos dois primeiros meses de gravidez, mesmo porque, além de existir um período crítico que vai da sexta à oitava semana de vida intra-uterina, são necessárias doses semanais superiores a 10 mg para produzir malformações – síndrome da aminopterina<sup>5</sup> –, ou dos que admitem que o MTX administrado no início da gravidez é teratogênico ao ser humano, causando disostose craniofacial associada a outras anomalias,<sup>22, 23</sup> mas falam a favor dos que relatam ausência de malformações em coelhos fêmeas que receberam 6,5 mg/kg de peso nas fases iniciais da gravidez ou em camundongos fêmeas que receberam 10 mg/kg ou ainda em macacos pela administração intravenosa de 30 mg/kg do 29<sup>o</sup> ao 32<sup>o</sup> dias de gestação.<sup>20</sup>

Nossos resultados não corroboram também o relato de que o metotrexato, através da inibição da síntese de DNA, levou à redução do tamanho dental e aumento na frequência de falta de dentes.<sup>1</sup>

Apesar do número insuficiente e dos dados epidemiológicos inadequados presentemente existentes para estabelecer claramente as variações e a severidade dos efeitos atribuíveis a esse tipo de composto, certas anormalidades estão sendo caracterizadas como de efeitos desses agentes, tais como: defeitos do esqueleto, ausência ou hipoplasia de dígitos, sindactilia; nos casos de redução de membros e/ou sindactilia, alterações do complexo bucomandibular podem também ser sugeridas.<sup>6</sup>

Assim, em face das discrepâncias de resultados encontrados neste trabalho e em relato anterior,<sup>19</sup> novas observações fazem-se necessárias, quer para maior segurança na prescrição desse tipo de droga, quer para que se conheça com mais propriedade seus possíveis efeitos indesejáveis.

## Conclusão

Nas condições experimentais em que este trabalho foi realizado, pode-se concluir que não há razões para se atribuir ao metotrexato efeitos deletérios sobre o

desenvolvimento do germe dental transplantado para a câmara anterior do olho de camundongos hospedeiros.

## Agradecimentos

Os autores manifestam seus agradecimentos ao CNPq, patrocinador da Bolsa de Iniciação Científica (PIBIC 93/94) a Fabiana Simões Zunfrilli; à FAPESP (Processo n.92/3102-0); e à FUNDUNESP (Processo n.594/92), pelo auxílio concedido para aquisição de equipamentos.

HETEM, S. et al. Effects of methotrexate on intraocular tooth germ development. *Rev. Odontol. UNESP (São Paulo)*, v.24, n.2, p.211-220, 1995.

- **ABSTRACT:** *Pregnant female mice were killed at the 14th or 17th day of the gestational period and the first mandibular molar tooth germ of the fetuses were dissected and kept in MEM-Eagle until be transplanted to the anterior chamber of the eye of host animals. The host animals were injected with 5 mg/kg of body weight of methotrexate during the following three days and killed 1, 2, 3, 4 or 5 days after the last drug injection. The results showed compatible aspects when the control and the treated groups were compared. Thus, was concluded that, in the conditions used here, there is no hazardous effects of the methotrexato on tooth germ development.*
- **KEYWORDS:** *Methotrexate; tooth germ, development; intra-ocular graft.*

## Referências bibliográficas

- 1 BERRY, C. L., GERMAIN, J. Absence of the third molar tooth in the mouse: its relevance to human malformation. *J. Pathol.*, v.108, p.35-45, 1972.
- 2 COHN, S. A. Development of the molar teeth in the albino mouse. *Am. J. Anat.*, v.101, p.295-319, 1957.
- 3 DESESSO, J. M., GOERINGER, G. C. Amelioration by leucovorin of methotrexate developmental toxicity in rabbits. *Teratology*, v.43, p.201-15, 1991.
- 4 \_\_\_\_\_. Methotrexate-induced developmental toxicity in rabbits is ameliorated by 1-(p-tosyl) - 3,4,4-trimethylimidazolidine, a functional analog for tetrahydrofolate-mediated one-carbon transfer. *Teratology*, v.45, p.271-83, 1992.
- 5 FELDKAMP, M., CAREY, J. C. Clinical teratology counseling and consultation case report: low dose methotrexate exposure in the early weeks of pregnancy. *Teratology*, v.47, p.533-9, 1993.
- 6 GORLIN, R. J., COHEN, M. M., LEVIN, S. S. *Syndromes of the head and neck*. 3.ed. New York: Oxford University Press, 1990. 997p.
- 7 GRUNEBERG, H. The development of some external features in mouse embryos. *J. Hered.*, v.34, p.89-93, 1943.

- 8 KOPPANG, H. S. Histomorphological investigation on the effect of cyclophosphamide on dentinogenesis of the rat incisor. *Scand. J. Dent. Res.*, v.81, p.383-96, 1973.
- 9 \_\_\_\_\_ . Effect of cyclophosphamide on dentinogenesis in the rat incisor: fluorescence microscopic and microradiologic investigations. *Scand. J. Dent. Res.*, v.89, p.59-70, 1981.
- 10 MASSINI, N. *Estudo do crescimento dentário de ratos tratados com ciclofosfamida (EnduxanR)*. Piracicaba, 1976. 35p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual de Campinas.
- 11 MATHEUS, M. T. G. , HETEM, S. Efeito da ciclofosfamida sobre o desenvolvimento de germes dentais de molares transplantados para a câmara anterior do olho de camundongos. *Rev. Odontol. UNESP (São Paulo)*, v.19, p.51-61, 1990.
- 12 MATHEUS, M. T. G. et al. Efeito da ciclofosfamida sobre o desenvolvimento de germe dental do incisivo do camundongo. *Rev. Odontol. UNESP (São Paulo)*, v.19, p.41-9, 1990.
- 13 McBRIDE, R. A. et al. MTX induced changes in rat parotid and submandibular gland function. *J. Dent. Res.*, v.66, p.1445-8, 1987.
- 14 MILUNSKY, A., GRAEF, J. W., GAYNOR, M. F. Methotrexate-induced congenital malformations. *J. Pediatr.*, v.22, p.790-5, 1968.
- 15 MORSE, A. Formic acid-sodium citrate decalcification and butyl alcohol dehydration of teeth and bone for sectioning in paraffin. *J. Dent. Res.*, v.24, p.143-53, 1945.
- 16 NOGUEIRA, T. O., STENE, T., KOPPANG, H. S. Long term effects of colchicine on dentinogenesis in rat incisors. *Scand. J. Dent. Res.*, v.88, p.15-21, 1980.
- 17 \_\_\_\_\_ . Colchicine effects on rat incisor odontoblast and dentinogenesis. *Scand. J. Dent. Res.*, v.89, p.48-58, 1981.
- 18 PAJARI, V. Effect of the antineoplastic agents dexorubicin and methotrexate on rat caries and secondary dentin formation. *Scand. J. Dent. Res.*, v.97, p.14-9, 1989.
- 19 PEREIRA, S. L. S., HETEM, S. Ação do methotrexate sobre o desenvolvimento do germe dental e do palato. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNESP, 4, 1992, Araçatuba, p.119.
- 20 SHEPARD, T. H. *Catalog of teratogenic agents*. 6.ed. Baltimore: Johns Hopkins, 1989. 793p.
- 21 VAHLSING, H. L. et al. Dental abnormalities in rats after a single large dose of cyclophosphamide. *Cancer Res.*, v.35, p.2199-202, 1975.
- 22 WARKANY, J. Aminopterin and methotrexate: folic acid deficiency. *Teratology*, v.17, p.353-8, 1978.
- 23 \_\_\_\_\_ . Teratogenicity of folic acid antagonists. *Cancer Bull.*, v.33, p.76-7, 1981.

Recebido em 22.2.1995.