Revista de Odontologia da UNESP, v. 32, n. 2, 145-154, 2003. © 2003

Efeitos da Ciclofosfamida sobre o Desenvolvimento do Germe Dental "in vitro"

Sebastião HETEM[a], *Carla de Jesus Almeida SCAPINELLI*[b]

[a]*Departamento de Morfologia, Curso de Odontologia Unificadas, FEB 14783-226 Barretos - SP*
[b]*Monitora de Histologia e Embriologia, Departamento de Morfologia Curso de Odontologia Unificadas, FEB, 14783- 226 Barretos - SP*

HETEM, S. ; SCAPINELLI, C. J. A. Effects of cyclophosphamide on tooth germ development in vitro. **Rev. Odontol. UNESP**, v. 32, n. 2, p 145-154, jul. /dez. 2003.

Resumo: Germes dentais de molares inferiores de fetos de camundongos com 14 ou com 17 dias foram cultivados "in vitro", durante 7 dias, em meio controle ou na presença de 12,5 µg/ml, 25 µg/ml ou 50 µg/ml de ciclofosfamida ativada ou não por 3,0 µl /ml ou 5,3 µl /ml de fração S-9 do fígado. O meio de cultura foi trocado a cada dois dias. Após decorrer o período de observação, os germes dentais foram fixados, incluídos em parafina, cortados e corados pelo método da hematoxilina e eosina para análise em microscopia de luz. O desenvolvimento do germe dental não foi afetado sem a fração S-9 no meio de cultura. Os efeitos da ciclofosfamida foram diretamente proporcionais à sua concentração no meio de cultura ativado e à concentração da fração S-9 no meio, mas aos da idade fetal.

Palavras-chave: *Ciclofosfamida; desenvolvimento do germe dental; cultura de tecidos.*

Abstract: Mouse lower molar tooth germs either from 14 or 17 days foetuses were cultured in vitro for seven days in control medium or in the presence of 12. 5 µg/ml, 25 µg/ml or 50 µg/ml of cyclophosphamide activated or not with 3.0 µl/ml or 5.3 µl/ml of liver S-9 fraction. The culture medium was changed each two days. At the end of the observation periods the tooth germs were fixed, paraffin embedded, cut with microtome and stained by hematoxylin and eosin method for light microscopy analysis. Tooth germ development was not affected without the S-9 fraction in the medium. The effects of cyclophosphamide were in direct ratio of its concentration in activated culture medium and of the S-9 concentration in the medium but contrary to the fetal age.

Keywords: *Cyclophosphamide; tooth germ development; tissue culture.*

Introdução

A ciclofosfamida, uma substância citotóxica utilizada no tratamento de neoplasias, é um agente alquilante que age bloqueando a duplicação do DNA. Existe uma relação clara entre a dose do citotóxico empregada e a destruição de células dentro dos limites de tolerância do hospedeiro, isto é, uma determinada dose destrói uma proporção constante de células e não um número constante delas[19]. Sendo inativa na sua forma de administração, a ciclofosfamida necessita de uma conversão metabólica para exercer a sua ação terapêutica. A ciclofosfamida é, pois, uma droga citotóxica que atua por meio de seus metabólitos, com 95% do poder alquilante[7], agindo sobre células com alta fração proliferativa, bloqueando a duplicação do DNA de forma completa e resultando em morte celular ou de forma incompleta, possivelmente revertendo em mutações[25].

A ciclofosfamida atua produzindo molares defeituosos, mas não inibe a odontogênese[1,2,6]. Também interfere na continuidade do crescimento dos incisivos do camundongo,

porém os tecidos odontogênicos remanescentes continuam a formação do órgão dental; os tecidos formadores pós-experimentais ou cessam o desenvolvimento posterior ou, mais comumente, dão origem a uma parte que sobrepassa lateralmente a parte formada na fase pré-experimental, formando um dente distorcido que não irá irromper[20]. A ciclofosfamida afeta os preodontoblastos e seus precursores alterando a formação da dentina[14], no mínimo, interrompendo a odontogênese causando constrição dental ou defeitos tipo nicho na dentina, uma reação que está na dependência da dose empregada[12]. A odontogênese de molares de camundongos transplantados para a câmara anterior do olho é irreversivelmente afetada pela ciclofosfamida, que ocasiona ou a degeneração total do germe dental ou alteração da morfogênese produzindo germes dentais hipodesenvolvidos diretamente proporcionais à idade fetal e à dosagem[15-17].

Este trabalho mostra o efeito da ciclofosfamida, em diferentes concentrações com ou sem ativação, no desenvolvimento in vitro do primeiro molar inferior de embriões de camundongos com 14 e com 17 dias.

Material e método

Foram utilizados germes dentais de fetos de camundongos albinos obtidos com 14 ou com 17 dias de gestação.

Fêmeas prenhes foram sacrificadas pela inalação de clorofórmio, e os fetos removidos assepticamente e preservados em solução balanceada de Hanks. Os germes dentais dos molares inferiores, tanto o direito quanto o esquerdo, foram dissecados com o auxílio de um microscópio estereoscópico. Os germes dentais foram mantidos em solução de Hanks até serem incubados a 37 °C com 5% de CO_2 e 95% de ar em uma atmosfera umidificada.

Os germes dentais foram cultivados por 7 dias, em meio de cultura constituído por meio essencial mínimo de Eagle (MEM -Eagle), suplementado com bicarbonato de sódio, glutamina, glicina, ácido ascórbico, penicilina, estreptomicina e HEPES[11,21]. Os germes dentais foram colocados sobre uma peça de papel milipore que, por sua vez, foi colocada sobre uma tela metálica apoiada nas bordas do frasco de cultura que foi preenchido com meio até que este estivesse em contato com os germes dentais sem, entretanto, cobrí-los. Além dos germes dentais cultivados por 7 dias, alguns germes dentais foram dissecados e fixados imediatamente após a sua obtenção.

O meio experimental foi constituído do meio controle acrescido de 12,5 μg/ml , 25 μg/ml ou 50 μg/ml de ciclofosfamida. Para ativação da ciclofosfamida, 3,0 μl ou 5,3 μl/ml de fração S-9 do fígado foram adicionados ao meio. A fração S-9 foi obtida do fígado de duas camundongos fêmeas adultas da mesma linhagem, injetada intraperitonealmente, com 80 mg/kg de peso de fenobarbital, por 3 dias consecutivos antes do sacrifício[10]. Vinte e quatro horas após a última injeção de fenobarbital, o fígado foi removido assepticamente e homogeneizado em 2 volumes de tampão de fosfato de sódio (peso do fígado/volume do tampão), pH 7,4, mergulhado em gelo e centrifugado por 10 min a 9000 rpm, sob refrigeração. O sobrenadante foi removido e congelado em porções individuais em nitrogênio líquido. As porções de frações S-9 foram rapidamente descongeladas imediatamente antes de serem utilizadas. Para cada 14 ml do meio de cultura, foram adicionados 0,5 ml de solução de NADPH (5×10^{-4} M , concentração final) como doador de elétrons e glicose 6-fosfato (5×10^{-3} M , concentração final) no tampão fosfato para assegurar a concentração saturada do NADPH[8]. Os meios de cultura, tanto experimental quanto controle, foram trocados a cada 2 dias. Após o período experimental, os germes dentais foram fixados em paraformaldeído a 4% e em glutaraldeído a 0.25% e incluídos em parafina ou em historresina. Os blocos de parafina foram cortados com 6 μm de espessura e corados com hematoxilina e eosina, e os blocos de historresina foram seccionados com 2,5 μm de espessura e corados pelo Azur II e Azul de metileno para análises em microscopia de luz.

Resultado

Animais com 14 dias

Sete dias de cultura em meio controle

Após sete dias de cultivo no meio de cultura controle, o germe dental mostrou uma evidente evolução quando comparado ao germe dental obtido imediatamente após o sacrifício dos animais (Figura 1); tendo atingido, no seu desenvolvimento, o estágio de campânula. No órgão do esmalte foi possível identificar todas as suas quatro camadas. Os ameloblastos apresentavam-se como células cilíndricas, com núcleo basal e citoplasma apical com vacúolos.

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

As estruturas do saco dental eram vistas perto da superfície do germe dental. Figuras mitóticas estavam presentes tanto nas estruturas epiteliais quanto mesenquimais.

Dois dias de cultura em meio com ciclofosfamida seguidos por cinco dias em meio controle

Depois de dois dias de cultivo com 25 μg/ml ciclofosfamida seguidos por cinco dias em meio controle, o germe dental estava bem constituído (Figura 2). O órgão do esmalte mostrava claramente suas quatro camadas, e os ameloblastos apareciam como células cilíndricas com núcleos basais alongados e citoplasma abundante com vacúolos.

Os odontoblastos estavam revestindo a superfície da papila dental e apareciam como células cilíndricas com núcleos basais arredondados e citoplasma basofílico abun-

dante. As outras células da papila dental não estavam diferenciadas e se apresentavam separadas por uma quantidade razoável de substância intersticial.

As estruturas do saco dental, pouco evidentes, apareciam ao redor da superfície do germe dental.

O germe dental havia alcançado a fase de campânula em seu desenvolvimento.

dois dias de cultura em meio com ciclofosfamida ativada seguidos por cinco dias em meio controle

Depois de dois dias de cultivo com 12,5 µg/ml de ciclofosfamida ativada por 3,0 µl/mg de fração S-9 seguidos por cinco dias em meio controle, foi encontrado um pequeno germe dental (Figura 3). Foram vistas as camadas do órgão do esmalte com os ameloblastos aparecendo como células cilíndricas com núcleos basais.

Os odontoblastos eram pouco evidentes e as outras células da papila dental estavam uniformemente distribuídas.

As estruturas do saco dental apresentavam-se com aspecto normal, entretanto não em grande quantidade.

Por outro lado, depois de dois dias de cultivo tanto com 25 µg/ml (Figura 4) quanto com 50 µg/ml (Figura 5) de ciclofosfamida ativada por 5,3 µl/ml de fração S-9, seguidos de 5 dias em meio controle, foi possível ver a queratina e o epitélio gengival juntamente com algumas áreas de tecido conjuntivo de aparência normal, tecido ósseo e tecido conjuntivo necrótico, mas absolutamente nada de estrutura dental.

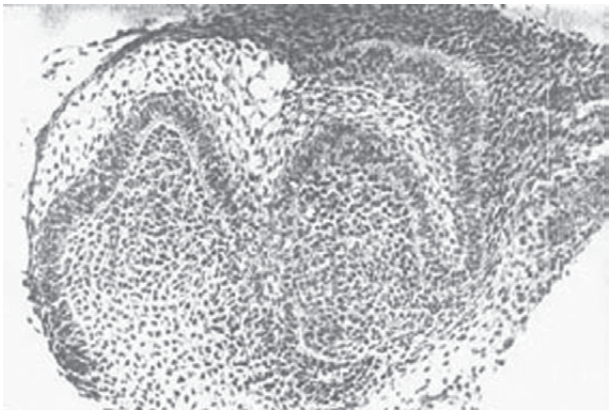

Figura 1. Germe dental de feto de 14 dias cultivado por 7 dias em meio controle. HE. 175×.

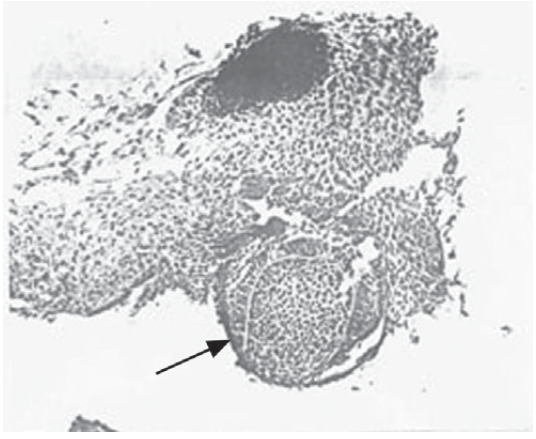

Figura 3. Germe dental (seta) de feto de 14dias cultivado por 2 dias com 12,5 µg/ml de ciclofosfamida e 3,0 µl/ml de fração S-9 seguidos de 5 dias em meio controle. HE. 125×.

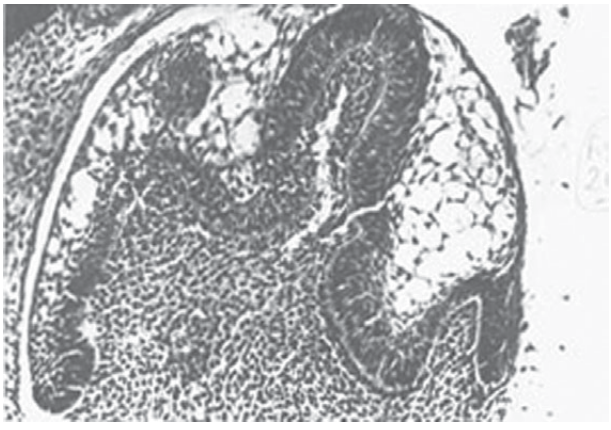

Figura 2. Germe dental de feto de 14 dias cultivado por 2 dias em meio com 25µg/ml de ciclofosfamida seguidos de 5 dias em meio controle. HE. 200×.

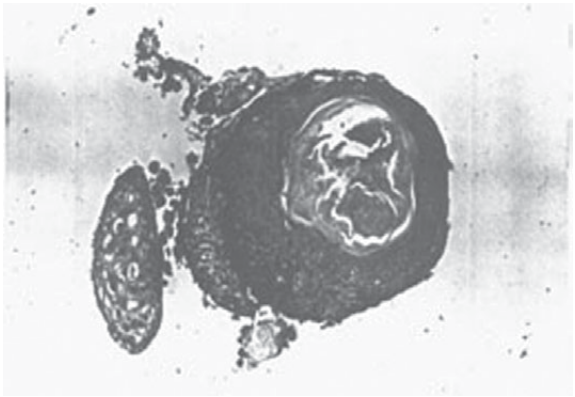

Figura 4. Germe dental de feto de 14 dias cultivado por 2 dias com 25 µg/ml de ciclofosfamida e 5,3 µl/ml de fração S-9 seguidos de 5 dias em meio controle. HE. 125×.

Sete dias de cultura em meio com 25 μg/ml de ciclofosfamida

Depois de sete dias de cultivo em meio com 25 μg/ml de ciclofosfamida, os germes dentais apresentavam uma boa morfologia (Figura 6). O órgão do esmalte apresentava-se com suas quatro camadas, os ameloblastos como células cilíndricas com núcleos alongados e na região basal e abundante citoplasma com vacúolos.

A papila dental mostrou os odontoblastos revestindo sua superfície como células não muito alongadas e com núcleos arredondados. As outras células da papila estavam uniformemente distribuídas e havia uma quantidade razoável de substância intersticial entre elas.

As estruturas do saco dental estavam formadas por células achatadas e substância intersticial distribuídas ao redor do germe dental.

O germe dental apresentava-se no estágio de campânula do desenvolvimento e figuras mitóticas foram vistas nos tecidos epitelial e conjuntivo.

Sete dias de cultura em meio com ciclofosfamida ativada

Depois de sete dias de cultivo em meio tanto com 12,5 μg/ml (Figura 7) quanto com 25 μg/ml (Figura 8) de ciclofosfamida ativada por 3,0 μl/ml da fração S-9, foi encontrado um pequeno germe dental. O órgão do esmalte estava reduzido em tamanho, mas apresentava-se com todas as suas camadas; os ameloblastos apresentavam-se

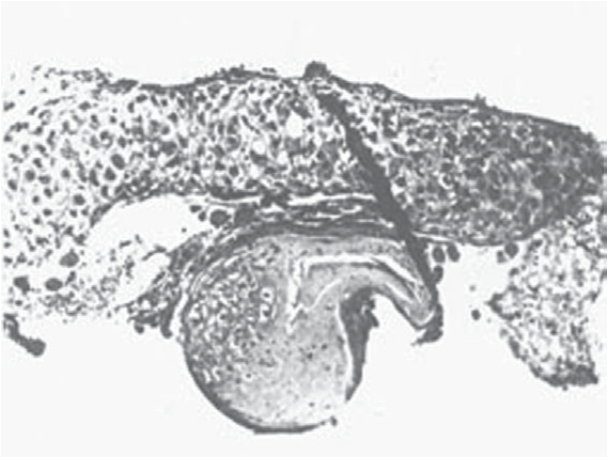

Figura 5. Germe dental de feto de 14 dias cultivado por 2 dias com 50 μg/ml de ciclofosfamida e 5,3 μl/ml de fração S-9 seguidos de 5 dias em meio controle. HE. 125×.

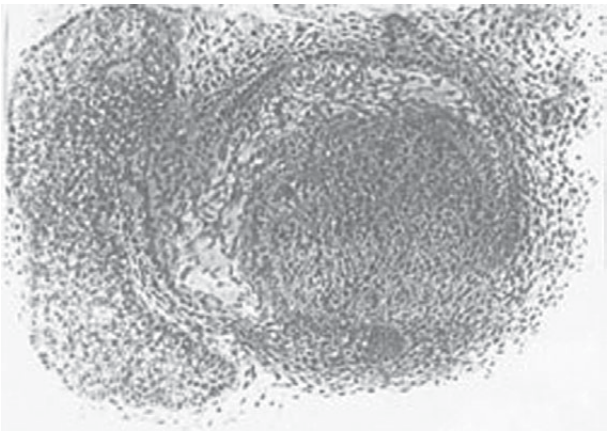

Figura 6. Germe dental de feto de 14 dias cultivado por 7 dias com 25 μg/ml de ciclofosfamida. AM+A II. 125×.

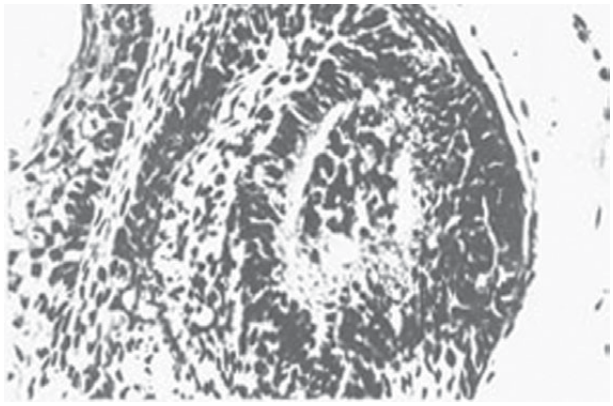

Figura 7. Germe dental de feto de 14 dias cultivado por 7 dias com12,5 μg/ml de ciclofosfamida e 3,0 μl/ml de fração S-9. HE. 312,5×.

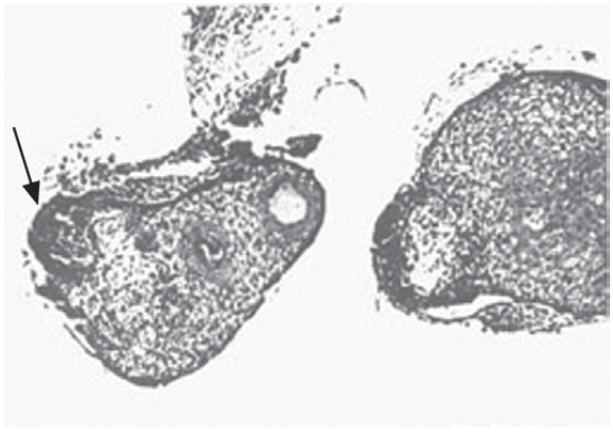

Figura 8. Germe dental (seta) de feto de 14 dias cultivado por 7 dias com 25 μg/ml de ciclofosfamida e 3,0 μl/ml de fração S-9. HE. 100×.

como células cilíndricas, com núcleo basal e com quantidade de citoplasma não muito grande e, ás vezes, apresentando vacúolos.

A papila dental mostrava células uniformemente distribuídas, e, no germe dental cultivado com 12,5 μg/ml de ciclofosfamida, os odontoblastos podiam ser vistos como células com núcleos basais e irregulares.

As estruturas do saco dental estavam pouco evidentes e dispostas ao redor do germe dental.

Por outro lado, depois de sete dias de cultivo com 25 μg/ml (Figura 9) ou com 50 μg/ml (Figura 10) de ciclofosfamida ativada por 5,3 μl/ml de fração S-9, foi possível apenas identificar a queratina, algumas células epiteliais e conjuntivas da mucosa gengival e alguns remanescentes do tecido cartilaginoso.

Animais com 17 dias

Sete dias de cultura em meio controle

Depois de sete dias de cultivo em meio controle, o germe dental apresentou uma clara evolução (Figura 11) quando comparado com as suas características por ocasião da sua obtenção.

O órgão do esmalte estava com suas camadas normais e a alça cervical estava profundamente projetada no tecido conjuntivo em direção apical.

Os ameloblastos apresentavam-se como células cilíndricas, com núcleo basal e com vacúolos no citoplasma.

Na papila dental, a camada de odontoblastos apresentava-se como uma camada de células bem evidente, alongadas, com núcleos basais e grande quantidade de citoplasma. 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 de mitose foram vistas nos tecidos epitelial e conjuntivo.

Dois dias de cultura em meio com ciclofosfamida seguidos por cinco dias em meio controle

Depois de dois dias de cultivo em meio com 25 μg/ml de ciclofosfamida seguidos por cinco dias em meio controle, o germe dental apresentou um aspecto normal com todos os seus componentes característicos. Dessa forma, as estruturas do órgão do esmalte, da papila dental e do saco dental mostraram os mesmos aspectos encontrados em um germe dental cultivado em meio controle (Figura 12).

Dois dias de cultura em meio com ciclofosfamida ativada seguidos por cinco dias em meio controle

Depois de dois dias de cultivo em meio com 12,5 μg/ml de ciclofosfamida e 3,0 μl/ml de fração S-9 seguidos por cinco dias em meio controle, o germe dental mostrou um aspecto normal (Figura 13).

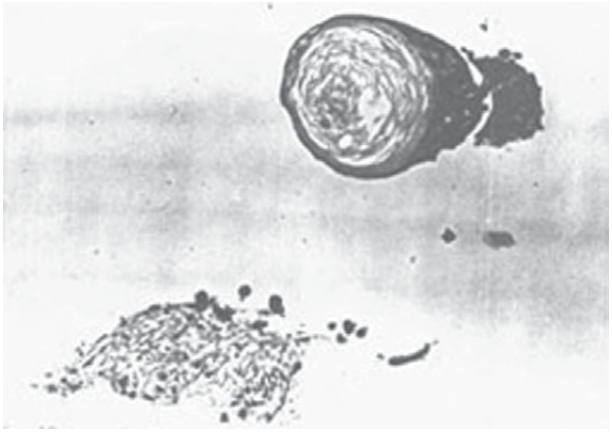

Figura 9. Germe dental de feto de 14 dias cultivado por 7 dias com 25 μg/ml de ciclofosfamida e 5,3 μl/ml de fração S-9. HE. 125×.

Figura 10. Germe dental de feto de 14 dias cultivado por 7 dias com 50 μg/ml de ciclofosfamida e 5,3 μl/ml de fração S-9. HE. 125×.

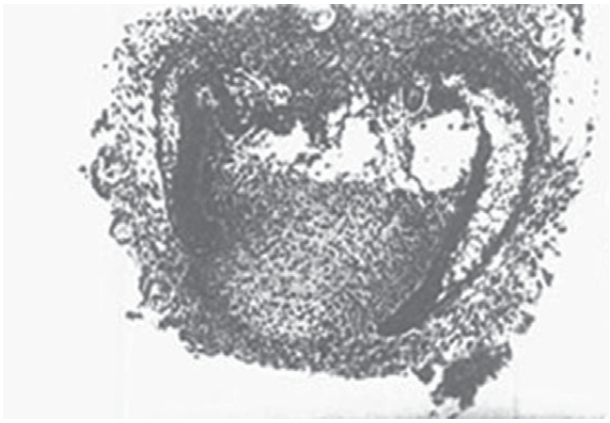

Figura 11. Germe dental de feto de 17 dias cultivado por 7 dias em meio controle. HE. 175×.

O órgão do esmalte mostrava a alça cervical profundamente situada no tecido conjuntivo, os ameloblastos apresentavam-se como células cilíndricas com núcleos basais alongados e com citoplasma em grande quantidade.

Os odontoblastos apresentavam-se com uma disposição regular e com núcleo basal e ovalado. As outras células da papila dental apareciam distribuídas regularmente mas aglomeradas perto do órgão do esmalte.

As estruturas do saco dental estavam organizadas ao redor do germe dental.

Por outro lado, depois de dois dias de cultivo em meio tanto com 25 µg/ml (Figura 14) quanto com 50 µg/ml (Figura 15) de ciclofosfamida ativada por 5,3 µl/ml de fração S-9 seguidos por cinco dias em meio controle, o germe dental não foi identificado. Foram encontradas apenas a queratina e outras estruturas da mucosa gengival.

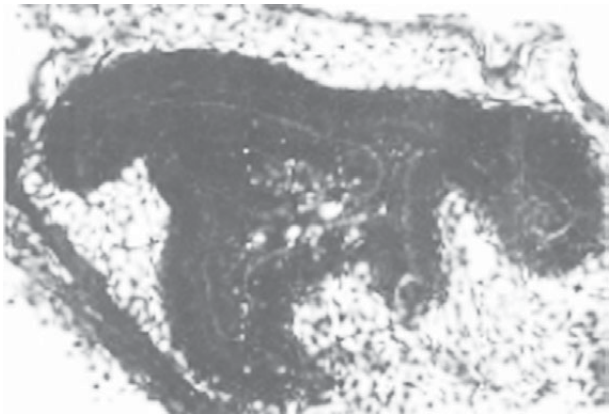

Figura 12. Germe dental de feto de 17 dias cultivado por 2 dias com 25 µg/ml de ciclofosfamida seguidos de 5 dias em meio controle. HE. 274×.

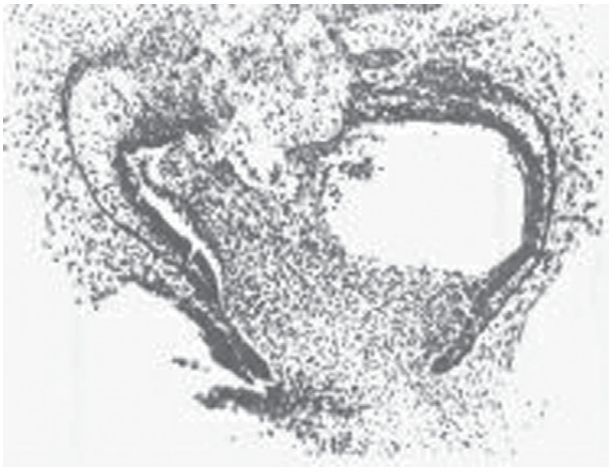

Figura 13. Germe dental de feto de 17 dias cultivado por 2 dias com 12,5 µg/ml de ciclofosfamida e 3,0 µl/ml de fração S-9 seguidos de 5 dias em meio controle. HE. 125×.

Sete dias de cultura em meio com 25 µg/ml de ciclofosfamida

Depois de sete dias de cultivo em meio com 25 µg/ml de ciclofosfamida, o germe dental estava bem constituído e havia experimentado uma evolução em seu desenvolvimento (Figura 16). Todas as estruturas do órgão do esmalte estavam bem claras, e os ameloblastos apresentavam-se como células cilíndricas com núcleos basais alongados, grande quantidade de citoplasma e vacúolos.

Os odontoblastos apresentavam-se alinhados na superfície da papila dental, com núcleos basais e ovalados. As outras células da papila dental estavam distribuídas regu-

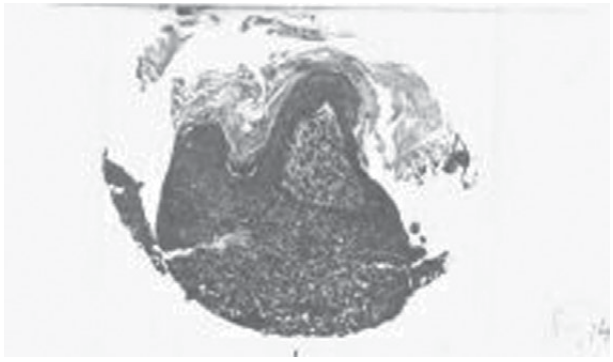

Figura 14. Germe dental de feto de 17 dias cultivado por 2 dias com 25 µg/ml de ciclofosfamida e 5,3 µl/ml de fração S-9 seguidos de 5 dias em meio controle. HE. 125×.

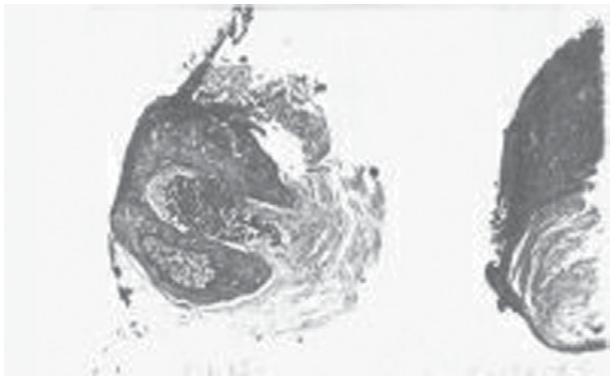

Figura 15. Germe dental de feto de 17 dias cultivado por 2 dias com 50 µg/ml de ciclofosfamida e 5,3 µl/ml de fração S-9 seguidos de 5 dias em meio controle. HE. 100×.

larmente com exceção das vizinhanças do órgão do esmalte, onde se apresentavam aglomeradas.

As estruturas do saco dental estavam organizadas ao redor do germe dental. Algumas vezes foi possível observar uma fina camada de pré-dentina.

Sete dias de cultura em meio com ciclofosfamida ativada

Depois de sete dias de cultivo em meio tanto com 12,5 µg/ml (Figura 17) quanto com 25µg/ml (Figura 18) de ciclofosfamida ativada por 3,0 µl/ml de fração S-9, as estruturas do germe dental estavam perfeitamente identificáveis. O órgão do esmalte estava bem constituído, os ameloblastos perfeitamente distintos como células cilíndricas com núcleos basais e grande quantidade de citoplasma.

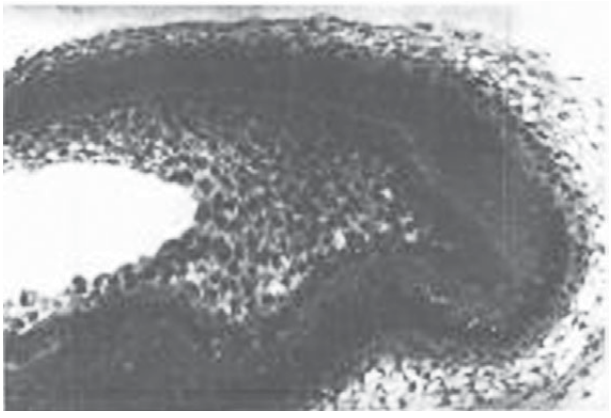

Figura 16. Germe dental de feto de 17 dias cultivado por 7 dias em meio com 25 µg/ml de ciclofosfamida. AM+A II. 200×.

Os odontoblastos alinhavam-se na superfície da papila dental com núcleos basais e ovalados. As outras células da papila dental estavam mais concentradas perto do órgão do esmalte.

As estruturas do saco dental apareciam como células achatadas e substância intersticial organizadas ao redor do germe dental.

Por outro lado, depois de sete dias de cultivo tanto com 25 µg/ml (Figura 19) quanto com 50 µg/ml(Figura 20) de ciclofosfamida ativada por 5,3 µl/ml de fração S-9, os germes dentais não foram identificados.

Foi possível identificar apenas a queratina e os tecidos epitelial e conjuntivo da mucosa gengival.

Sete dias de cultura em meio com fração S-9

Depois de sete dias de cultivo com 3,0 µl/ml de fração S-9 os germes dentais apresentaram-se bem constituídos (Figura 21). As estruturas do órgão do esmalte, papila dental e saco dental eram perfeitamente distintas e suas características não eram diferentes daquelas descritas em relação aos germes dentais cultivados em meio controle.

Discussão

A ciclofosfamida é uma droga antineoplásica que atua através dos seus metabólitos[7], bloqueando a duplicação do DNA e inibindo a divisão celular[24,25]. Entretanto, requer ativação metabólica para manifestar suas propriedades[23] ou desenvolver seu potencial alquilante e teratogênico[8,10,18], ou para induzir a quebra cromossômica e a troca entre cromátides irmãs[5]. In vivo, a ativação acontece principalmente no fígado, ao passo que in vitro ocorre somente na presença de homogeneizados de fígado[9].

Assim, testes realizados in vitro normalmente incluem

Figura 17. Germe dental de feto de 17 dias cultivado por 7 dias com 12,5 µg/ml de ciclofosfamida e 3,0 µl/ml de fração S-9. HE. 125×.

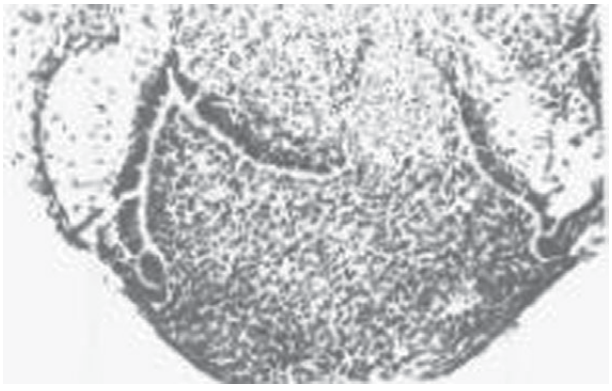

Figura 18. Germe dental e feto de 17 dias cultivado por 7 dias com 25 µg/ml de ciclofosfamida e 3,0 µl/ml de fração S-9. HE. 212,5×.

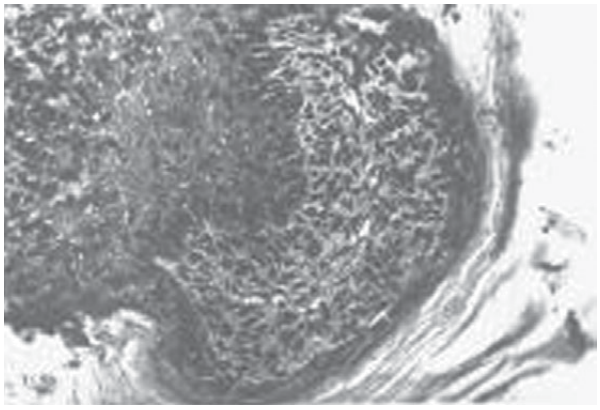

Figura 19. Germe dental de feto de 17 dias cultivado por 7 dias com 25 µg/ml de ciclofosfamida e 5,3 µl/ml de fração S-9. HE. 250×.

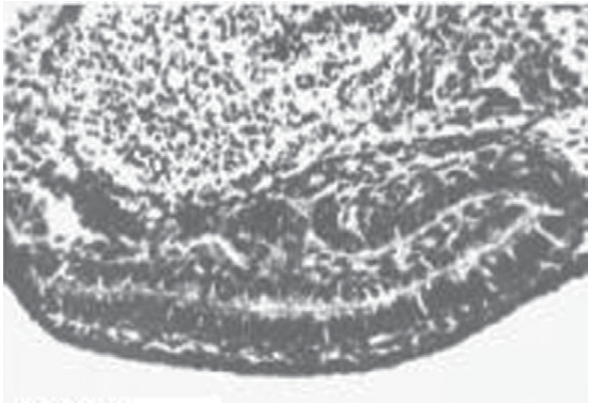

Figura 21. Germe dental de feto de 17 dias cultivado por 7 dias com 3,0 µl/ml de fração S-9. HE. 312,5.

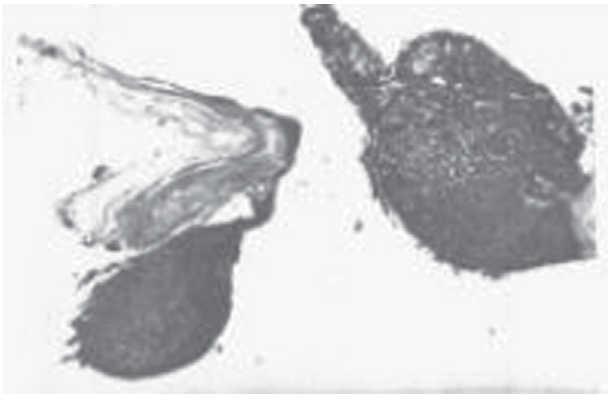

Figura 20. Germe dental e feto de 17 dias cultivado por 7 dias com 50 µg/ml de ciclofosfamida e 5,3 µl/ml de fração S-9. HE. 115×.

uma subfração hepática enriquecida de microssomas que é capaz de converter componentes adicionados ao meio de cultura para formas tóxicas "via" monoxigenação do componente sob sua ação[8].

Esses dados explicam porque o germe dental não foi afetado em seu desenvolvimento no meio experimental sem a fração S-9, como mostrado neste trabalho. Da mesma forma, a ciclofosfamida em uma concentração de 250 µg/ml do meio de cultura foi inócua tanto quando a matéria microssomal quanto os cofatores eram omitidos do meio[8].

Foram interessantes as observações de que o número de embriões malformados aumentou e seu crescimento diminuiu dependendo da concentração da fração S-9 no meio quando um volume fixo de ciclofosfamida foi adicionado à cultura e de que os embriões expostos à ciclofosfamida (25 µg/kg) in vivo no 10º dia de gestação foram indistinguíveis dos embriões tratados in vitro e, também, que não houve diferenças histológicas entre os embriões tratados in vivo ou in vitro[10].

Os resultados alcançados neste trabalho corroboram as observações acima, uma vez que eles foram diferentes de acordo com a concentração da fração S-9 no meio. Como foi mostrado, quando foi usado 3,0 µl/ml de fração S-9 no meio, as células do germe dental mostraram citodiferenciação, mas os tamanhos dos germes dentais eram diferentes em função da idade fetal na ocasião em que eles foram obtidos. Esses dados são, certamente, devidos à fase de desenvolvimento dos germes dentais quando eles foram transferidos para o meio de cultura. Dessa maneira, a ciclofosfamida tanto na concentração de 12,5 µg/ml quanto de 25 µg/ml ativada por 3,0 µl/ml de fração S-9 interferiu sobre o desenvolvimento do germe dental, mas não ocasionou a morte das células.

Como mostrado em nossos resultados, os germes dentais de embriões de 14 dias foram mais afetados do que os de 17 dias, provavelmente, porque as células dos animais mais jovens eram indiferenciadas e estavam em um período de proliferação enquanto aquelas dos animais mais velhos estavam já diferenciadas quando transferidos para o sistema de cultura. Essa observação confirma que a severidade dos efeitos teratogênicos está positivamente correlacionada à idade fetal[16,22].

Os resultados foram diferentes quando do uso tanto de 25 µg/ml quanto de 50 µg/ml de ciclofosfamida ativada por 5,3 µl/ml de fração S-9, uma vez que a quase totalidade das células morreu sob essas condições, ou seja, essas condições foram incompatíveis com o crescimento das células e dos tecidos.

Assim, ficou claro que, quando foram usados 25 µg/ml

de ciclofosfamida, os resultados foram diferentes quando a concentração da fração S-9 no meio foi de 3,0 µl/ml ou de 5,3 µl/ml. Entretanto, acredita-se que essa seja a mais alta concentração de ciclofosfamida compatível com a viabilidade de embriões in vitro e que aqueles experimentos que empregaram 25 µg/ml de ciclofosfamida e concentrações de 0,25 µl/ml a 3,0 µl/ml de fração S-9 obtida de animais induzidos pelo fenobarbital resultaram em 100% de malformações[8,10]. Nossos resultados concordam com as observações acima, uma vez que eles mostraram um efeito deletério da ciclofosfamida sobre o desenvolvimento do germe dental in vitro tanto com o uso de 12,5 µg/ml quanto de 25 µg/ml, sendo, porém os efeitos mais severos observados quando a concentração de S-9 aumentou no meio. Esse resultado foi provavelmente determinado porque a quantidade de fração S-9 aumentada no meio agiu produzindo uma maior quantidade de metabólitos teratogênicos, particularmente porque a fração do fígado proveio de animais pré-tratados com fenobarbital[10].

Foi encontrada uma diferente sensibilidade à citotoxicidade entre os tecidos de maneira semelhante à que foi observada anteriormente[3,10,12], pois o mesênquima foi severamente afetado enquanto o epitélio gengival estava aparentemente normal.

Os resultados descritos aqui reforçam as observações anteriores de que a ciclofosfamida requer ativação metabólica para exercer seus efeitos teratogênicos[5,8,10]. Também, a despeito de que alguns germes dentais se desenvolveram, os efeitos teratogênicos da ciclofosfamida foram irreversíveis, os quais podem ser explicados pelo aspecto anormal dos espécimes que cresceram no meio controle depois de dois dias no meio experimental. Essas observações estão de acordo com os resultados apresentados em estudos nos quais embriões de ratos com dez dias foram expostos por cinco horas a 25 µg/ml de ciclofosfamida ativada in vitro e depois recolocados em um meio livre da droga[18].

Nossos resultados corroboram, também, com aqueles encontrados em estudos sobre o efeito da ciclofosfamida no desenvolvimento de germes dentais in vivo em duas diferentes circunstâncias que são: transplantados para a câmara anterior do olho ou in situ. Quando implantados no olho, foi verificado que a administração de 62,5 µg/kg ou de 125 µg/kg de ciclofosfamida interferiu irreversivelmente no desenvolvimento do germe dental, produzindo uma alteração ou na morfologia e no tamanho do germe dental ou sua destruição total. Esses efeitos foram diretamente proporcionais à idade fetal de quando os germes dentais foram obtidos e à dosagem utilizada[15-17]. Quando os estudos foram feitos "in situ", as camundongos fêmeas foram injetadas com 30 µg/kg ou 50 µg/kg de ciclofosfamida no 12º dia de gestação e sacrificadas em diferentes períodos depois da administração da droga[17]. Também foi mostrado que há uma relação direta entre a dosagem usada e a severidade dos efeitos resultantes: realmente, a dosagem mais alta foi incompatível com o desenvolvimento das estruturas ou dos embriões e não ocorreu o fechamento do palato.

Os resultados encontrados em cultura de tecidos ajudaram a explicar os relatos dos efeitos da ciclofosfamida, em função da dose utilizada, sobre a odontogênese[3], sobre a dentinogênese[12-14] ou sobre a erupção do incisivo de crescimento do rato[4]. A ciclofosfamida atua nos pré-odontoblastos ou em suas células precursoras conduzindo à interrupção da odontogênese ou da dentinogênese[12,14] e interfere na continuidade do crescimento dos incisivos[20]. Fica claro, a partir dos nossos resultados, que as células do germe dental foram destruídas ou inibidas em sua capacidade reprodutora, mas que, com as menores dosagens, as células remanescentes do germe dental mantiveram seu potencial de diferenciação, uma vez que pequenos órgãos dentais foram encontrados; por outro lado, as células remanescentes do germe dental podem ser relacionadas e comparadas tanto à parte pós-experimental in vivo que continuou a erupcionar[20], a despeito de o processo de odontogênese ser temporariamente interrompido[25], quanto ao tecido odontogênico dos animais injetados com 40 µg/kg o qual, depois de oito dias, recomeça o processo de odontogênese[3] mostrando sua capacidade de desenvolver ou até de recuperar suas características normais.

Conclusão

Nas condições experimentais deste trabalho e diante dos resultados encontrados foi possível concluir que a ciclofosfamida é um agente teratogênico capaz de interferir, irreversivelmente, sobre o desenvolvimento de estruturas embrionárias e que para que seus efeitos sejam detectáveis in vitro, é necessário que ela seja ativada pela fração S-9 do fígado, condição em que age na razão direta da sua concentração e do volume da fração S-9 no meio de cultura e na razão inversa da idade da estrutura fetal.

Agradecimento

Os autores são gratos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP - que através de concessão auxílio à pesquisa possibilitou a realização deste trabalho(Proc. Odontologia nº 86/3049-1).

Referências

1. ADATIA, A. K. Burkitt's tumour in the jaws. **Br. Dent. J.** , London, v. 120, p. 315-326, 1966.
2. ADATIA, A. K. Response of the dental elements to chemotheraphy of Burkitt's tumor. **Int. Dent. J.** , London, v. 18, p. 646-654, 1968.
3. ADATIA, A. K. The effects of cyclophosphamide on odontogenesis in the rat. **Arch. Oral Biol.** , Oxford, v. 20,

p. 141-144, 1975.

4. ADATIA, A. K.; BERKOVITZ, B. K. The effects of cyclophosphamide on eruption of the continuously growing mandibular incisor of the rat. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 26, p. 607-613, 1981.
5. AU, W. et al. Cytogenetic toxicity of cyclophosphamide and its metabolites in vitro. **Cytogenet. Cell Genet.**, Basel, v. 26, p. 108-116, 1980.
6. BARTO, D. E.; FITZGERALD, L. R.; McKNIGHT, J. P. Effects of immunosuppressive agent on tooth development. **J. Tenn. Dent. Assoc.**, Nashville, v. 51, p. 129-133, 1971.
7. BROCK, N. Pharmacologic characterization of cyclophosphamide and cyclophosphamide metabolites. **Cancer Chemoter. Rep.**, Bethesda, v. 51, p. 315-325, 1967.
8. FANTEL, A. G. et al. Teratogenic bioactivation of cyclophosphamide in vitro. **Life Sci.**, Oxford, v. 25, p. 67-72, 1979.
9. FOLEY, G. E.; FRIEDMAN, O. M.; DROLET, B. P. Studies on the mechanism of action of cytoxan. Evidence of activation "in vivo" and "in vitro". **Cancer Res.**, Chicago, v. 1, p. 57-63, 1961.
10. GREENAWAY, J. C. et al. The "in vitro" teratogenicity of cyclophosphamide in rat embryo. **Teratotology**, New York, v. 25, p. 335-342, 1982.
11. HETEM, S.; JOWETT, A. K.; FERGUSON, M. W. J. Biocompatibility testing of a posterior composite and dental cements using a new organ culture model. **J. Dent.**, Bristol, v. 17, p. 155-161, 1989.
12. KOPPANG, H. S. Histomorphologic investigation on the effect of cyclophosphamide on dentinogenesis of the rat incisor. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v. 81, p. 383-396, 1973.
13. KOPPANG, H. S. Histomorphologic investigations of dentinogenesis in incisors of offspring of cyclophosphamide-treated pregnant rats. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v. 86, p. 444-458, 1978.
14. KOPPANG, H. S. Effect of cyclophosphamide on dentinogenesis in the rat incisor: fluorescence microscopic and microradiographic investigations. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v. 89, p. 59-70, 1981.
15. 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)**. 1985. Tese (Livre-Docência) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, 1985.
16. 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.
17. MATHEUS, M. T. G. et al. Efeitos da ação da ciclofosfamida administrada durante a prenhez no desenvolvimento de molares de fetos de camundongos. **Rev. Odontol. UNESP**, São Paulo, v. 23, n. 1, p. 9-20, 1994.
18. MIRKES, P. E.; GREENAWAY, J. C.; SHEPARD, T. H. A kinetic analysis of rat embryo response to cyclophosphamide exposure "in vitro". **Teratology**, New York, v. 28, p. 249-56, 1983.
19. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. **Quimioterapia de los tumores sólidos**. Genebra, 1977. (Série de informes técnicos, 605).
20. READE, P. C.; ROBERTS, M. L. Some long-term effects of cyclophosphamide on the growth of rat incisor teeth. **Arch. Oral Biol.** , Oxford, v. 23, p. 1001-1005, 1978.
21. ROSLINDO, N. C. et al. Efeitos da ação da ciclofosfamida administrada durante a prenhez no desenvolvimento de molares de fetos de camundongos. **Rev. Odontol. UNESP**, São Paulo , v. 23, n. 1, p. 9-20, 1994.
22. SCHMITZ, R.; BUSCH, W.; von KREYBIG, T. Chemisch erzeugte Missbildungen des Kauschädels bei Versuchstieren. 1. Die Wirkung von Cyclophosphamid und 6-Mercaptopurin auf die Embryonal-und Fetalentwicklung der Ratte. **Dtsch. Zahn. Mund. Kieferheilkd. Zentralbl. Gesamte**, Leipzig, v. 59, n. 11, p. 385-398, 1972.
23. SYRKIN, A. B.; ZAITZEVA, L. A. The rate of cyclophosphamide activation. **Neoplasma**, Bratislava, v. 17, p. 377-381, 1970.
24. VAHLSING, H. L.; KIM, S. K.; FERINGA, E. R. Cyclophosphamide-induced abnormalities in the incisors of the rat. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 56, p. 809-816, 1977.
25. VAHLSING, H. L. et al. Dental abnormalities in rats after a single large dose of cyclophosphamide. **Cancer Res.**, Chicago, v. 35, p. 2199-2202, 1975.