

Efeito do metotrexato sobre o reparo ósseo após condilectomia unilateral em camundongos (*Mus musculus*)

Luciano Alves da SILVA^a, Sebastião HETEM^a, Odilon Vitor Porto DENARDIN^b

^a*Departamento de Morfologia, Curso de Odontologia Unificadas, FEB, 14783-226 Barretos - SP*

^b*Departamento de Pós-Graduação, Hospital Heliópolis, 04231-030 São Paulo - SP*

Silva LA, Hetem S, Denardin OVP. Effect of the methotrexate on bone repair after unilateral condylectomy in mice (*Mus musculus*). Rev Odontol UNESP. 2006; 35(1): 89-96.

Resumo: O metotrexato é uma droga antineoplásica que age alterando a síntese do DNA e interferindo, portanto, na proliferação celular. O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito do metotrexato sobre o reparo ósseo após condilectomia unilateral em camundongos. Foram utilizados 31 camundongos (*Mus musculus*), albinos, de ambos os gêneros, com 30 dias de idade. Esses animais foram anestesiados com 0,5 mL/100 g de peso com hidrato de cloral a 10% por via intraperitoneal e submetidos à condilectomia unilateral, sendo distribuídos em dois grupos. Os animais do Grupo I receberam uma injeção de 15 mg/kg de peso por via intraperitoneal de metotrexato logo após a cirurgia. Os animais do Grupo II receberam uma injeção de soro fisiológico, em volume correspondente ao administrado aos animais do Grupo I, por via intraperitoneal. Sacrificados 5, 10, 15, 30 e 45 dias após as cirurgias, tiveram suas cabeças fixadas, descalcificadas e processadas para inclusão em parafina. A evolução do processo de reparo mostrou uma reorganização crescente das estruturas, culminando por restaurar as características de uma articulação com todos os seus componentes semelhantes quando comparados os Grupos I e II. Assim, pôde-se concluir que, nas condições utilizadas para a realização deste trabalho, o metotrexato não interferiu no processo de reparo após condilectomia unilateral em camundongos.

Palavras-chave: *Metotrexato; condilectomia; camundongo; reparo ósseo.*

Abstract: The methotrexate, an antineoplastic drug, acts altering the DNA synthesis, and thus, interfere on cellular proliferation. The aim of this study was to verify the effect of the methotrexate on bone repair after unilateral condylectomy in mice. There were used 31 mice (*Mus musculus*), albinus, of both sex, with 30 days of age. The animals were anesthetized with intraperitoneal injection of 0.5 mL/100 g of body weight of a 10% solution of chloral hydrate and submitted to unilateral condylectomy. The animals were separated in two groups. Those of group I received a dose of 15 mg/kg of body weight of methotrexate through intraperitoneal route soon after the surgery. The animals of the group II received a dose of physiologic serum in a similar volume as that administered to the animals of the group I, also through intraperitoneal route. The animals were sacrificed 5, 10, 15, 30 and 45 days after the surgery. The head of the animals were fixed, decalcified and embedded in paraffin. The evolution of the repair showed comparable between the groups I and II as well as that description found in literature. Thus, we can conclude that, in the conditions used to perform this investigation, the methotrexate did not alter the repair process after unilateral condylectomy in mice.

Keywords: *Methotrexate; condylectomy; mouse; bone repair.*

Introdução

Um dos tópicos mais estudados da articulação temporomandibular (ATM) é o côndilo por ser um dos centros de crescimento da face e, freqüentemente, envolvido nas cirurgias e fraturas^{9,26,32}. Nesse sentido, a condilectomia experimental tem sido empregada para estudar fenômenos biológicos envolvidos no processo de reparo.

O metotrexato é um potente agente quimioterápico atuando 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 proliferativa das células^{7,8,25}. Como droga citotóxica, o metotrexato é utilizado na quimioterapia antineoplásica, entretanto com efeitos tóxicos sobre os tecidos normais de proliferação rápida, particularmente da medula óssea e do trato gastrointestinal. Já foram relatados casos graves de anomalias do desenvolvimento em camundongos³⁶ e em coelhos⁷ e alterações na atividade osteoblástica com diminuição do volume dos ossos em ratos³⁹. Pelos riscos potenciais ao conceito, deve ser evitado o seu uso durante a gravidez. Alterações do desenvolvimento em humanos foram atribuídas ao metotrexato administrado durante a gestação³¹ na razão direta da dose empregada^{10,11}, o que, entretanto, não é confirmado por outras observações^{33,34}.

Em virtude da ausência de dados na literatura relacionando o reparo ósseo após condilectomia mandibular associado à administração do antineoplásico metotrexato com a possibilidade de ocorrência de efeitos colaterais de várias naturezas devidos à interferência dessa droga em todos os tecidos que estão em proliferação e, ainda, em virtude da sua ampla utilização em medicina, foi objetivo deste trabalho estudar o seu efeito sobre o processo de reparo ósseo após condilectomia unilateral em camundongos.

Material e método

Foram utilizados 31 camundongos (*Mus musculus*), albinos, de ambos os gêneros, com 30 dias de idade. Um animal foi utilizado para mostrar as características histológicas da articulação temporomandibular não submetida a qualquer manipulação (animal normal). Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral a 10%, na dose de 0,5 mL/100 g de peso corporal, administrado por via intraperitoneal. Após a tricotomia do lado direito da face, realizou-se uma incisão vertical, de aproximadamente 0,8 cm de extensão, 2 mm à frente do meato acústico externo, com seu limite superior ligeiramente acima do arco zigomático. Da extremidade superior dessa incisão, foi realizada uma segunda incisão, perpendicular à primeira, em direção anterior acompanhando a direção do arco zigomático, também com aproximadamente 0,8 cm de extensão, com auxílio de uma tesoura. O retalho de pele foi rebatido, a glândula

parótida afastada e as fibras do músculo masseter divulsionadas, até ser atingido o osso do ramo da mandíbula.

Uma vez individualizada a cabeça da mandíbula, fez-se a sua ressecção na região do colo com uma tesoura de ponta fina e sua remoção com uma pinça. As estruturas deslocadas foram reposicionadas, as bordas da ferida cirúrgica coaptadas e fixadas com colódio elástico.

Os animais foram distribuídos em dois grupos: logo após a cirurgia, por via intraperitoneal, o Grupo I recebeu uma injeção de metotrexato na dose de 15 mg/kg de peso corporal, e o Grupo II recebeu uma injeção de soro fisiológico. Os animais não receberam qualquer medicação após a cirurgia, tiveram livre acesso à água durante todo o período experimental, e a ração oferecida foi pastosa nas primeiras 48 horas após a condilectomia e peletizada nos períodos subsequentes.

Três animais de cada grupo foram sacrificados 5, 10, 15, 30 e 45 dias após as cirurgias por inalação excessiva de éter sulfúrico. As cabeças tiveram a pele parcialmente removida e foram fixadas em solução de formalina a 10% por 48 horas. Após a descalcificação²⁸, as peças foram processadas para inclusão em parafina, de modo a fornecerem cortes sagitais. Pela microtomia, foram obtidos cortes com 6 µm de espessura, corados pelo método da hematoxilina e da eosina para análise de forma semi-seriada em microscopia de luz.

Resultado

Características histológicas da articulação temporomandibular no animal normal (Figura 1)

O osso temporal apresentava-se com espaços medulares de vários tamanhos e revestido por tecido conjuntivo denso e delgado.

Os espaços supra e infra-discais apresentavam-se nítidos, vazios e com células sinoviais forrando a cápsula.

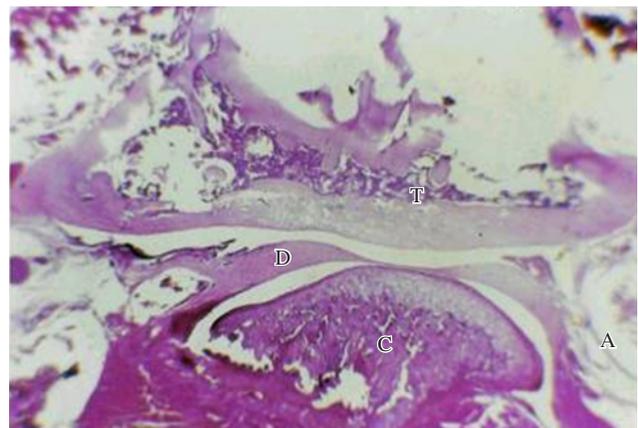


Figura 1. Articulação temporomandibular: animal normal. HE. 40X (T- osso temporal; D- disco articular; C- Coto ou côndilo mandibular; e A- região anterior da ATM).

O disco articular, constituído por tecido conjuntivo denso, era delgado na região central e dilatado na periferia.

O côndilo mandibular apresentava espaços medulares amplos e era recoberto por cartilagem hialina profundamente e tecido conjuntivo denso superficialmente.

A cápsula articular anterior e posteriormente apresentava-se ligada ao revestimento do osso temporal, ao disco articular e ao ramo da mandíbula.

Os resultados obtidos foram muito semelhantes entre os animais dos Grupo I e II quando comparados nos diferentes tempos pós-operatórios e, em decorrência, serão descritos simultaneamente, apresentando as pequenas variações naturais da biologia da regeneração tecidual.

O osso temporal apresentou-se, em todos os tempos pós-operatórios, com espaços medulares de vários tamanhos, revestido por tecido conjuntivo denso, às vezes espessado, às vezes delgado em grande parte de sua extensão. Os espaços supra e infra-discais encontravam-se bem definidos, vazios ou com rede de fibrina nos primeiros tempos pós-operatórios e, nos tempos mais longos, como uma cavidade única ou com a presença de feixes de fibras colágenas dividindo-os.

O disco articular apresentava-se espessado em toda a sua extensão ou em apenas uma parte dela, às vezes subdividido em faixas.

Aos cinco dias de pós-operatório, o coto mandibular mostrava o ramo mandibular seccionado, com espaços medulares abertos para a cavidade infra-discal ou com cartilagem hialina recobrimdo toda a sua superfície. Na região posterior, havia cartilagem hialina com revestimento de tecido conjuntivo denso. Na sua região anterior, podia-se notar a presença de grande massa de tecido conjuntivo recém-formado (Figuras 2 e 3).

Aos dez dias de pós-operatório, o coto mandibular encontrava-se revestido por tecido conjuntivo denso muito espesso e ligado à cápsula articular anterior e posteriormente. Abaixo do tecido de revestimento, encontravam-se células arredondadas caracterizando tecido cartilaginoso hialino, às vezes bastante volumoso. Na região superior do coto mandibular, havia tecido cartilaginoso recém-formado situado sobre toda a sua superfície ou apenas sobre a sua região posterior (Figuras 4 e 5).

Aos 15 dias de pós-operatório, o côndilo mandibular encontrava-se totalmente revestido por tecido conjuntivo denso e ligado anterior e posteriormente à cápsula articular. Abaixo do revestimento, encontrava-se tecido cartilaginoso hialino com áreas de neoformação óssea. O ramo da mandíbula estava alargado no sentido ântero-posterior, constituído por tecido ósseo esponjoso (Figuras 6 e 7).

Aos 30 dias de pós-operatório, o côndilo mandibular encontrava-se revestido, em toda a sua extensão, por tecido conjuntivo denso, espessado e fusionado ou não ao disco e à cápsula articular. Abaixo do tecido de revestimento, em regiões diferentes, conforme o caso, encontravam-se áreas de

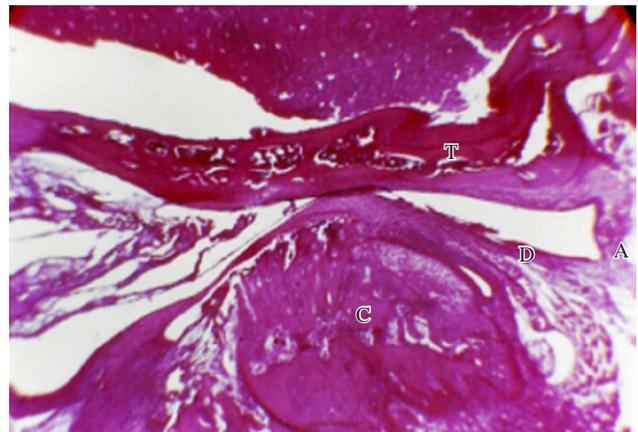


Figura 2. Articulação temporomandibular: animal tratado, 5 dias após a cirurgia. HE. 40x (T- osso temporal; D- disco articular; C- Coto ou côndilo mandibular; e A- região anterior da ATM).

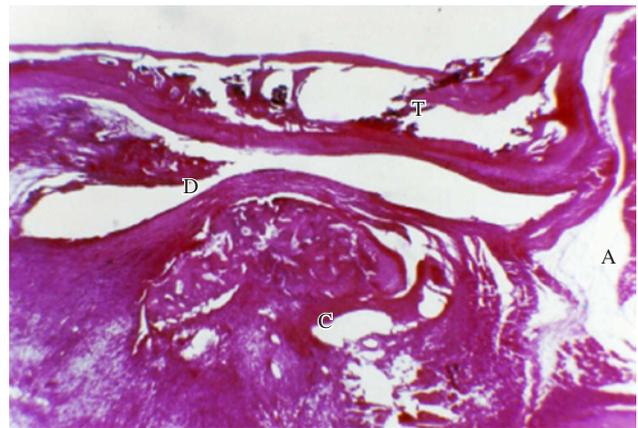


Figura 3. Articulação temporomandibular: animal controle, 5 dias após a cirurgia. HE. 40x (T- osso temporal; D- disco articular; C- Coto ou côndilo mandibular; e A- região anterior da ATM).

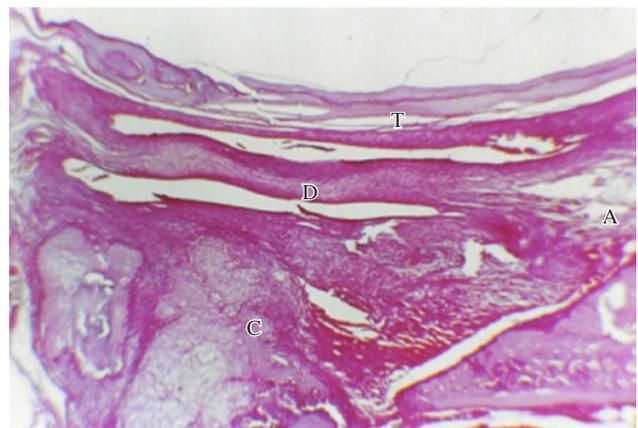


Figura 4. Articulação temporomandibular: animal tratado, 10 dias após a cirurgia. HE. 40x (T- osso temporal; D- disco articular; C- Coto ou côndilo mandibular; e A- região anterior da ATM).

cartilagem hialina e ossificação endocondral além de tecido ósseo maduro ou em formação com espaços medulares. O ramo mandibular encontrava-se alargado no sentido ântero-posterior (Figuras 8 e 9).

Aos 45 dias de pós-operatório, o côndilo mandibular estava revestido por tecido conjuntivo denso entremeado por células cartilaginosas que atingiam a superfície em alguns pontos e estava deslocado anteriormente. Em direção inferior, seguia-se um tecido cartilaginoso hialino mostrando células hipertróficas seguidas por áreas de ossificação. O ramo estava alargado no sentido ântero-posterior (Figuras 10 e 11).

A cápsula articular apresentava-se, anterior e posteriormente, ligada ao revestimento do osso temporal, ao disco articular e ao ramo da mandíbula, com características semelhantes em todos os tempos de observação.

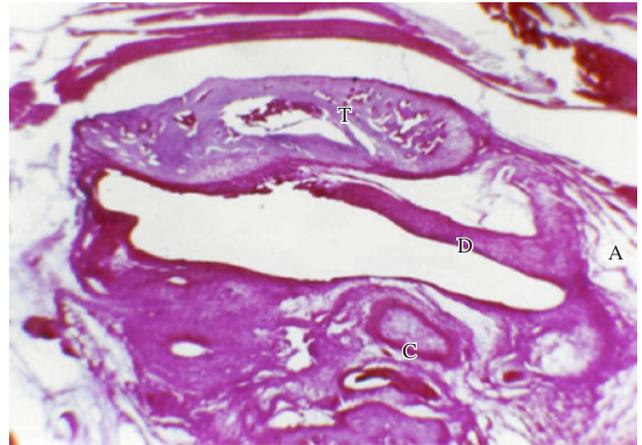


Figura 7. Articulação temporomandibular: animal controle, 15 dias após a cirurgia. HE. 40X (T- osso temporal; D- disco articular; C- Coto ou côndilo mandibular; e A- região anterior da ATM).

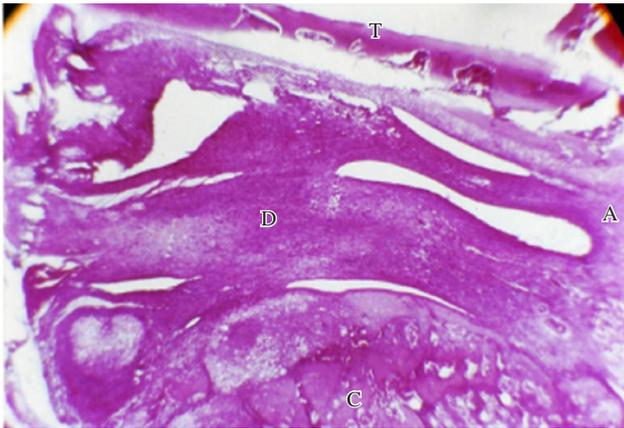


Figura 5. Articulação temporomandibular: animal controle, 10 dias após a cirurgia. HE. 40X (T- osso temporal; D- disco articular; C- Coto ou côndilo mandibular; e A- região anterior da ATM).

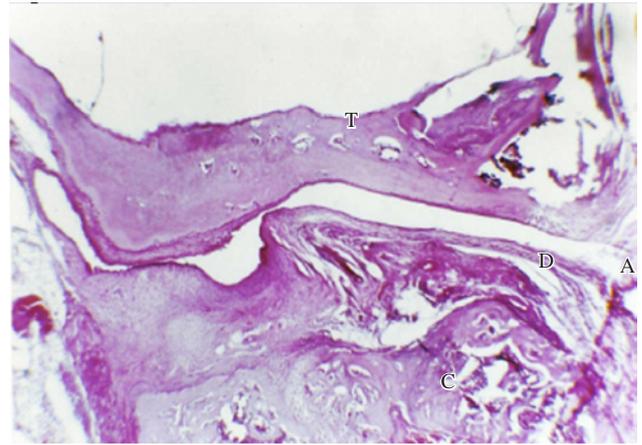


Figura 8. Articulação temporomandibular: animal tratado, 30 dias após a cirurgia. HE. 40X (T- osso temporal; D- disco articular; C- Coto ou côndilo mandibular; e A- região anterior da ATM).

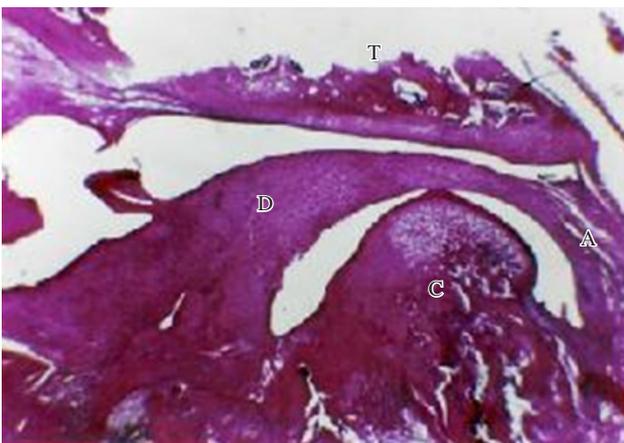


Figura 6. Articulação temporomandibular: animal tratado, 15 dias após a cirurgia. HE. 40X (T- osso temporal; D- disco articular; C- Coto ou côndilo mandibular; e A- região anterior da ATM).

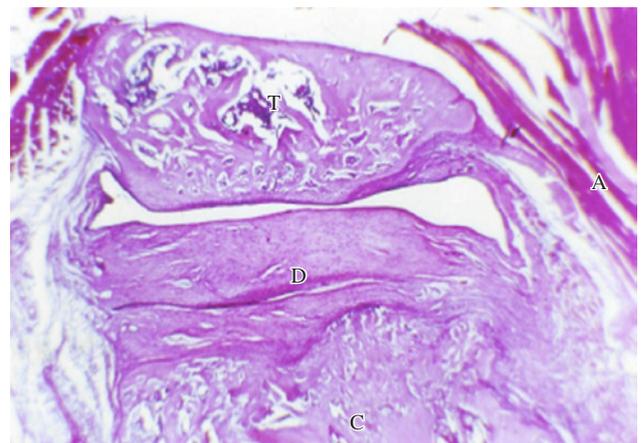


Figura 9. Articulação temporomandibular: animal controle, 30 dias após a cirurgia. HE. 40X (T- osso temporal; D- disco articular; C- Coto ou côndilo mandibular; e A- região anterior da ATM).

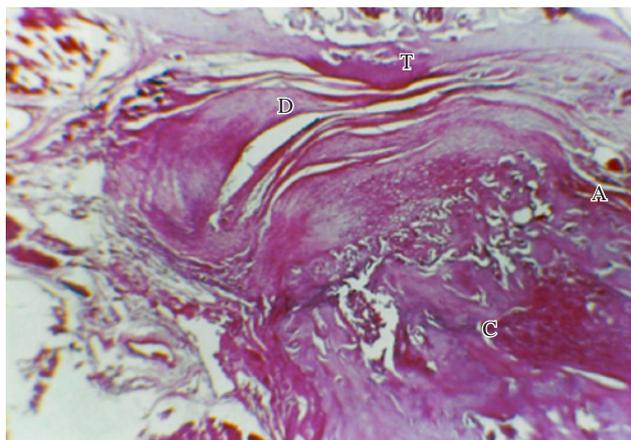


Figura 10. Articulação temporomandibular: animal tratado, 45 dias após a cirurgia. HE. 40X. (T- osso temporal; D- disco articular; C- Coto ou côndilo mandibular; e A- região anterior da ATM).

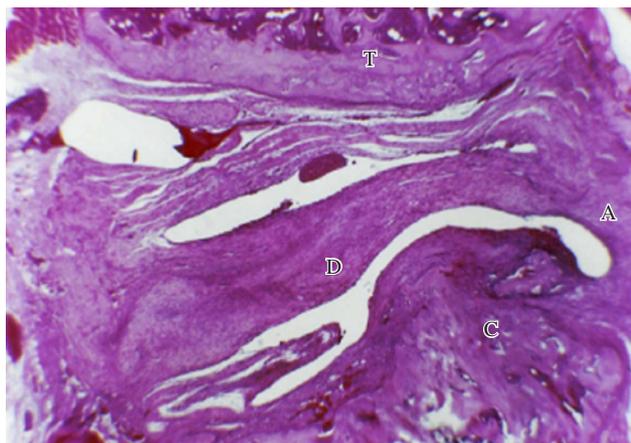


Figura 11. Articulação temporomandibular: animal controle, 45 dias após a cirurgia. HE. 40X. (T- osso temporal; D- disco articular; C- Coto ou côndilo mandibular; e A- região anterior da ATM).

Discussão

Após condilectomia, ocorre o preenchimento da cavidade cirúrgica por um coágulo sangüíneo e uma reorganização gradual até a neoformação condilar^{19,20,24,37}, por células que se originam de estruturas periarticulares, do periósteo e dos espaços medulares²⁴.

O processo de reparo do côndilo mandibular, cujo aspecto logo após a cirurgia foi mostrado anteriormente²³, ocorre, de forma semelhante à do processo de reparo de fraturas de ossos longos^{18,19,24}, a partir de estímulos transmitidos pelos músculos ao periósteo^{14,20}.

Aos cinco dias de pós-operatório, a região anterior da área cirúrgica estava ocupada por um tecido conjuntivo rico em células.

Aos dez dias de pós-operatório, o tecido conjuntivo mostrava-se mais organizado, disposto paralelamente à superfície seccionada do ramo da mandíbula. O movimento do coto mandibular influencia tanto a proliferação celular quanto a orientação das fibras colágenas até restabelecer uma articulação funcional entre o neocôndilo e o osso temporal^{30,37}. As células do periósteo diferenciam-se em osteoblastos e depositam osso. Na deficiência de vascularização da área¹³ e de estímulos funcionais^{5,14,30,37} ocorre diferenciação das células do tecido conjuntivo em condrócitos, originando no local uma fibrocartilagem, o que corrobora achados que afirmam serem as forças de cisalhamento em áreas de fraturas os elementos que induzem o recobrimento do fragmento ósseo por uma fibrocartilagem⁵.

As nossas observações aos 15 dias pós-operatórios confirmaram, com pequenas variações, os relatos relacionados ao revestimento do osso temporal, ao espaço supra-discal, à membrana sinovial, ao disco articular, ao côndilo e ao ramo da mandíbula²⁴.

A superfície do coto mandibular, aos 30 dias pós-operatórios, apresentava-se revestida por um espesso tecido conjuntivo denso seguido de cartilagem hialina, aspectos divergentes daqueles segundo os quais o côndilo mandibular neoformado apresentar-se-ia revestido somente por tecido conjuntivo denso¹²; entretanto, corroboram os que observaram a presença de cartilagem hialina e de revestimento fibroso^{2,19,20,24,29}.

Paralelamente à diferenciação celular e ao desenvolvimento do tecido conjuntivo, ocorre reabsorção na superfície seccionada e nos espaços medulares através de atividade osteoclástica^{6,19,20}, atividade remodeladora, que se inicia principalmente nas paredes dos espaços medulares e estende-se desde o 5º dia pós-operatório até os 45 dias após a cirurgia. Ela ocorre no processo de reparo de feridas ósseas, em áreas que estão sofrendo ossificação endocondral^{22,35} e na superfície do côndilo mandibular durante adaptações fisiológicas e patológicas, tanto no que se refere à aposição quanto à reabsorção óssea provocada por novas posições da mandíbula, decorrentes de distúrbios oclusais oriundos de etiologias diversas^{4,27}.

Aos 45 dias de pós-operatório verifica-se a formação de um neocôndilo semelhante ao côndilo original, constituído de cartilagem hialina recoberta por tecido conjuntivo denso, o que confirma dados encontrados na literatura tanto sobre esses aspectos^{2,17-20,24,30} quanto sobre a largura maior do ramo e a posição mais anterior do côndilo²⁴. Contudo são divergentes dos que relatam que ocorre regeneração apenas nos animais jovens³⁷ e dos que observaram regeneração apenas parcial do côndilo mandibular³⁸.

O metotrexato é um potente agente quimioterápico que age inibindo o processo de síntese do DNA³ e, como consequência, interfere na capacidade proliferativa das células^{7,8} ou na sua capacidade de síntese e secreção²⁵. Assim, era de

se esperar que, em função da dose e da sua administração na fase inicial do processo de reparo após condilectomia, pudesse haver interferência no mesmo, o que não ocorreu, entretanto, como se vê quando comparados os dados obtidos entre os Grupos I e II.

A teratogenicidade do metotrexato somente foi configurada em embriões de camundongo empregando-se doses entre 25 mg/kg e 50 mg/kg de peso, o que não ocorreu com a utilização de 10 mg/kg de peso³⁶; e a utilização de 5 mg de metotrexato por kg de peso não produziu alterações no desenvolvimento do germe dental transplantado para a câmara anterior do olho¹⁵.

Nossos resultados corroboram os obtidos com 5 mg/kg de peso¹⁵ e os dos estudos que utilizaram 10 mg/kg de peso³⁶ de metotrexato; entretanto, divergem dos relatados pelos que utilizaram doses entre 25 mg/kg e 50 mg/kg de peso dessa droga³⁶.

A utilização de 0,75 mg/kg de peso de metotrexato durante 5 dias, interrompida por 9 dias, e retomada novamente por 5 dias, por via intraperitoneal, em ratos com três meses de idade, mostrou diminuição do volume dos ossos, com interferência na sua formação, na atividade osteoblástica e no aumento na atividade osteoclástica³⁹. Esses resultados corroboram os relatos sobre a utilização de 0,3 mg/kg de peso, ou menos, de metotrexato em embriões de ratos, que observaram a ocorrência de embriofetividade com baixa teratogenicidade²¹.

Em ratas prenhes, a utilização de doses que variaram de 1 mg/kg a 50 mg/kg de peso de metotrexato induziu atraso no aparecimento dos centros de ossificação dos corpos vertebrais³. Também, uma única dose de 25 mg/kg a 50 mg/kg de peso em ratos adultos, por via intraperitoneal, mostrou que a capacidade do sistema fagocitário mononuclear para responder a uma infecção pode ser severamente comprometida¹⁶. Os trabalhos realizados com ratos mostram uma atividade deletéria do metotrexato, considerada sob vários aspectos, utilizando doses variadas em diferentes épocas da vida dos animais. Esses relatos não encontram apoio em nossos resultados, pois não verificamos interferência no processo de reparo ósseo após condilectomia em camundongos jovens, o que pode ser explicado pela dose, pela idade dos animais quando os estudos foram realizados e pelos tipos de observações que foram realizadas.

Uma dose de 6,5 mg/kg de peso de metotrexato administrada em coelhas no início da prenhez não produziu nenhum defeito visível nos embriões¹. Já a injeção de 19,2 mg/kg de peso por via endovenosa, entre os dias 10 e 15 de gestação, produziu poucas mortes e um espectro constante de malformações em uma alta porcentagem de filhotes²¹, o que não está de acordo com os relatos sobre coelhas injetadas pela mesma via e com a mesma dosagem de metotrexato no décimo segundo dia de gestação, os quais descreveram múltiplas malformações da cabeça, membros e tronco ou

um aumento dos espaços intercelulares, mudanças nucleares no mesênquima dos brotos embrionários dos membros e defeitos ósseos. Essas alterações foram minimizadas utilizando-se leucovorina até 24 horas após a administração do metotrexato⁷ ou simultaneamente à trimetilimidazolidina⁸.

Os resultados obtidos com coelhos foram concordantes quando foi utilizada uma dose de 19,2 mg/kg de peso de metotrexato por via endovenosa^{7,8,21}, pois todos mostraram alterações severas durante a gestação, o que não foi verificado pela utilização de uma dose de 6,5 mg/kg de peso de metotrexato por via endovenosa no início da prenhez²¹, situação em que nenhum defeito foi visível nos embriões. Tal discrepância de resultados só pode ser atribuída à dose empregada, pois o período e a via de administração da droga foram semelhantes.

Cabe ressaltar que os dados obtidos com coelhos resultaram de estudos realizados com doses pequenas durante o período de gestação, as quais não produziram alterações de desenvolvimento¹, com o que os nossos resultados concordam; entretanto, quando utilizadas doses elevadas, foram identificadas alterações graves do desenvolvimento^{7,8,21}, o que não encontra apoio em nossos resultados.

Essas observações falam a favor dos efeitos indesejáveis do metotrexato em função da dose, da época e do período da sua administração.

Estudos realizados com macacos utilizando uma dose de 30 mg/kg de peso de metotrexato, por via endovenosa, nos dias 29 a 32 da gestação, mostraram que houve um atraso transitório no crescimento embrionário⁴⁰, mas que não foi teratogênico, resultados que não são corroborados pelos nossos achados.

A avaliação dos nossos achados em comparação com os dados da literatura mostra que os efeitos do metotrexato estão diretamente relacionados à dose empregada, ao período de administração e à época em que é administrado; entretanto, novos estudos são recomendados considerando a ampliação da dose e o aumento do número de aplicações a fim de se detectar possíveis ações desse medicamento sobre o organismo, pois o mesmo vem sendo utilizado para outras finalidades terapêuticas como, por exemplo, artrite reumatóide.

Conclusão

Diante dos resultados alcançados com a realização deste trabalho, pode-se concluir que o metotrexato, nas condições utilizadas, não interferiu no processo de reparo ósseo após condilectomia unilateral em camundongos.

Agradecimento

À Teresinha de Jesus B. Carvalho pela execução dos serviços de laboratório e às Faculdades Unificadas FEB pela cessão de equipamentos e instalação para a realização deste trabalho.

Referências

- Adams CE, Hay MF, Lutwak-Mann C. The action of various agents on the rabbit embryo. *J Embryol Exp Morphol.* 1961;9: 468-91.
- Adler EA. Regenerated human mandibular condyle. Case report. *Aust Dent J.* 1981;26:216-7.
- Berry CL. Transiente inhibition of DNA synthesis by methotrexate in the rat embryo and fetus. *J Embryol Exp Morphol.* 1971;26:469-74.
- Blackwood HJJ. Cellular remodeling in articular tissue. *J Dent Res.* 1966;45:480-9.
- Choukas NC, Toto PD, Guccione JM. Mandibular condylectomy in the rhesus monkey. *J Oral Surg.* 1966; 24:422-32.
- Choukas NC, Toto PD, Schoen JN. Gross and histologic changes in the jaws of the Macaca rhesus monkey following surgery. *Oral Surg.* 1969;27:795-805.
- Desesso JM, Goeringer GC. Amelioration by leucovorin of methotrexate developmental toxicity in rabbits. *Teratology.* 1991; 43:201-15.
- Desesso JM, Goeringer GC. Methotrexate- induced developmental toxicity in rabbits is ameliorated by 1- (ptosyl)-3,4,4- trimethylimidazolidine, a functional analog for tetrahydrofolate-mediated one-carbon transfer. *Teratology.* 1992; 45:271-83.
- Dibetts JMH. Introdução a articulação temporomandibular. In: Enlow DW. *Crescimento facial.* 3ª ed. São Paulo: Artes Médicas; 1993 p.154-8.
- Donnenfeld AE, Pastuzak A, Noah JS, Schik B, Rose NC; Koren G. Methotrexate exposure prior to and during pregnancy. *Teratology.* 1994; 49:79-81.
- Feldkamp M, Carey JC. Clinical teratology counseling and consultation case report: low dose methotrexate exposure in the early weeks of pregnancy. *Teratology.* 1993;47:533-9.
- Gianelly AA, Moorrees CFA. Condylectomy in the rat. *Arch Oral Biol.* 1965; 10:101-6
- Ham AW. *Histologia.* 9ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1991.
- Hayes AM. Changes in the mandibular fossa of alizarin studies on the rat following unilateral condylectomy. *J Can Dent Assoc.* 1961; 27: 647-57.
- Hetem S, Roslindo EB, Ramalho LTO, Roslindo NC, Zunfrilli FS. Effects of methotrexate on intraocular tooth germ development. *Rev Odontol UNESP.* 1995; 24: 211-20.
- Janice Z, Cunera MB, Gudewicz PW. Effects of high-dose methotrexate on rat alveolar and inflammatory macrophage populations. *Inflammation.* 1984;8: 231-8.
- Jarabak JR. Regeneration of the mandibular condyle in the rat. *J Dent Res.* 1950;29: 692-3.
- Jarabak JR. The regeneration of the mandibular condyle following bilateral resection [abstract]. *J Dent Res.* 1951; 30: 491-2.
- Jarabak JR, Vehe K. Condylar regeneration in the rat. *J Dent Res.* 1952; 31: 510.
- Jolly M. Condylectomy in the rat. An investigation of the ensuing repair processes in the region of the temporomandibular articulation. *Aust Dent J.* 1961; 6: 243-56.
- Jordan RL, Wilson JG, Schumacher HJ. Embryotoxicity of the folate antagonist methotrexate in rats and rabbits. *Teratology.* 1976; 15: 73-80.
- Larsson A. Light microscopic and ultrastructural observation of the calcifying zone of the mandibular condyle in the rat. *Anat Rec.* 1975; 185: 171-86.
- Maenaut K, Westhovens R, Dequeker J. Methotrexate osteopathy, does it exist? *J Rheumatol.* 1996; 23:2165-9.
- Martins AA. Estudo histológico do processo de reparo após condilectomia mandibular unilateral em camundongos (*Mus musculus*) [Dissertação de Mestrado]. *Araçatuba: Faculdade de Odontologia da UNESP; 1978.*
- McBride RK, Harper C, Siegel A. Methotrexate induced changes in rat parotid and submandibular gland function. *J Dent Res.* 1987; 66: 1445-8.
- Mjör I A, Fejerskov O. *Histologia e embriologia oral.* São Paulo: Panamericana; 1990.
- Moffet B. The morphogenesis of the temporomandibular joint. *Am J Orthod.* 1966; 52: 401-15.
- Morse A. Formic acid-sodium citrate decalcification and butyl alcohol dehydration of tooth and bone for sectioning in paraffin. *J Dent Res.* 1945; 24: 143-53.
- Poswillo DE. Experimental investigation on the effects on intra- articular hydrocortisone and high condylectomy on the mandibular condyle. *Oral Surg.* 1970; 30: 161-73.
- Poswillo DE. The late effects of mandibular condylectomy. *Oral Surg.* 1972; 33: 500-12.
- Powell HR, Ekert H. Methotrexate- induced congenital malformations. *Med J Aust.* 1971; 2: 1076-7.
- Sharawy M, Bhussry BR, Soares FR. *Articulação temporomandibular.* In: Bhaskar SN. *Histologia e embriologia oral de Orban.* 10ª ed. São Paulo: Artes Médicas; 1989. p.427-37.
- Shepard TH. *Catalog of teratogenic agents.* 9th ed. Baltimore: Johns Hopkins; 1998.
- Sieber SM, Adamson RH. Toxicity of antineoplastic agents. In: Klein G, Weinhouse S, editors. *Advances in cancer research.* New York: Academic Press; 1975.
- Silbermann M, Frommer J. The nature of endochondral ossification in the mandibular condyle of the mouse. *Anat Rec.* 1972; 172: 659-68.

36. Skalko RG, Gold MP. Teratogenicity of methotrexate in mice. *Teratology*. 1974; 9: 159-64.
37. Skuble FD, Choukas NC, Toto DP. Craniomandibular bone changes in the rhesus monkeys induced by condylectomy. *J Oral Surg*. 1970; 28:273-9.
38. Soni NN, Malloy RB. Mandibular condylectomy in the guinea pig: quantitative triple fluorochrome study. *J Dent Res*. 1976; 55: 848-53.
39. Wheeler DL, Vander RAG, Wronski TJ, Miller GJ, Keith EE, Graves JE. The short- and long-term effects of methotrexate on the rats skeleton. *Bone*. 1995; 16: 215-21.
40. Wilson JG, Scott WJ, Ritter EJ, Fradkin R. Comparative distribution and embryotoxicity of methotrexate in pregnant rats and rhesus monkeys. *Teratology*. 1979; 19: 71-80.