GERSON MENDES DE LIMA JÚNIOR

INFLUÊNCIA DO METOTREXATO SOBRE GLÂNDULAS
SUBMANDIBULARES DE RATOS NORMAIS E CASTRA
DOS ESTIMULADAS PELA AMPUTAÇÃO DOS INCI-
SIVOS INFERIORES.

Tese apresentada à Faculdade
de Odontologia de Piracicaba
da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção de
Título de Mestre em Ciências
(área de Farmacologia).

*Este exemplar foi devidamente corrigido
conforme resolução CCPG-036-83.*

Piracicaba, 10-10-90

[Assinatura]

PIRACICABA-SP

1990

L628i

12545/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Ao meu pai (in memoriam)

À minha mãe

À Terezinha, aos meus filhos Gerson
Flávio, Paulo Sérgio, Eduardo Maurí
cio e Beatriz.

Ao Professor Doutor Thales Rocha de
Mattos Filho, pelo apoio, amizade e
também, pela dedicação ao Curso de
Pós-Graduação...

À Professora Doutora Maria de
Lourdes Garboggini da Gama pe
la orientação, incentivo, su-
gestões e apoio...

... os meus agradecimentos
e homenagens.

À Professora Doutora Sônia
Vieira e ao Professor Dou-
tor Ronaldo Seichi Wada os
meus agradecimentos pelas
análises estatísticas dos
resultados experimentais.

Agradeço

Ao Professor Doutor Simonides Cosani, D.D. Diretor da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP, pela atenção dirigida ao ensino de Pós-Graduação.

Aos docentes do Curso de Farmacologia, Professor Doutor Samir Tufic Arbex, Professora Doutora Maria de Lourdes Garboggini da Gama, Professor Doutor Amado Leonídio de Azevedo, Professor Pedro Luiz Rosalém, Professor Doutor Eduardo Dias de Andrade e Professora Maria Cristina Volpato.

Agradecimentos especiais

Aos colegas de magistério da Universidade Federal de Minas Gerais:

Professor Doutor Rocival Lyrio de Araújo,
Professora Doutora Maria Aparecida Costa Lage Becker, Professor Doutor José Pereira Daniel, Professor Doutor Teófilo André da Costa Cruz.

Ao Professor Doutor David G. Francis da Universidade Federal de Uberlândia.

Aos senhores José Carlos Gregório
e Moisés José Maria da Silva, os
meus agradecimentos pela assistência
e cuidados com os animais.

À senhora Vilma Bizuti dos Santos
pela solicitude e cordialidade com
que sempre nos atendeu.

Í N D I C E

I	- INTRODUÇÃO.....	1
II	- REVISTA DA BIBLIOGRAFIA.....	6
III	- PROPOSIÇÃO.....	15
IV	- MATERIAL E MÉTODOS.....	16
	1 - ANIMAIS UTILIZADOS.....	16
	2 - PREPARAÇÃO DOS ANIMAIS.....	16
	3 - DROGAS, DOSES E VIAS DE ADMINISTRAÇÃO.....	18
V	- SISTEMATIZAÇÃO DA PESQUISA.....	20
	1 - DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL.....	20
	2 - AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS.....	23
VI	- RESULTADOS.....	25
	1 - RESULTADOS DO GRUPO A.....	26
	2 - RESULTADOS DO GRUPO B.....	28
	3 - RESULTADOS DO GRUPO C.....	30
	4 - RESULTADOS DO GRUPO D.....	32
	5 - RESULTADOS DO GRUPO E.....	34
	6 - RESULTADOS DO GRUPO F.....	36
VII	- DISCUSSÃO.....	38
VIII	- CONCLUSÕES.....	42
IX	- RESUMO.....	44
X	- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

I - INTRODUÇÃO

I - INTRODUÇÃO

As células normais de todo o organismo coexistem em estado de harmonia funcional, determinado pelos seus códigos genéticos.

O contato entre uma célula e outra é mantido por substâncias intracitoplasmáticas. Dessa forma, não é permitido o crescimento desproporcional de uma ou outra célula de mesma função.

Quando ocorre a retirada de parte de um tecido ou órgão, a velocidade de recuperação pela multiplicação celular é maior até que haja a recuperação morfológica e fisiológica (RAMOS JR., 1974). Fenômeno semelhante ocorre na cultura de tecidos e de células normais, que param o crescimento, quando é atingida uma certa "densidade celular", constituindo o que se denomina de "inibição celular" (HUMPHEY, 1972).

Os padrões psico-neuro endócrinos fisiológicos diferem com a idade do animal. Assim, estes variam ao nascimento, antes e após a puberdade, na idade adulta e terminada a fase reprodutiva do animal.

Até certa idade não há predominância da participação da hipófise, ou da tireóide, das adrenais ou glândulas sexuais. É claro que sempre está existindo a secreção de hormônios das glândulas referidas, porém, não de maneira bastante influente.

Chegam as idades, nas quais as manifestações de feminilidade ou masculinidade se acentuam, com

suas alterações morfológicas muito marcantes.

Vêm, finalmente, as fases de vida adulta e depois, declínio da vida reprodutiva, com as respectivas alterações do organismo (RAMOS JR., 1974).

Nas glândulas salivares do rato verifica-se a repercussão deste esquema de desenvolvimento, com alterações histológicas e bioquímicas.

Especificamente com relação às glândulas submandibulares do rato, seu desenvolvimento tem início ainda durante a vida intra-uterina e que sua diferenciação somente se completa após o nascimento (RABELO, 1971).

A porção acinosa antecede à porção tubulosa, de maneira que esta última se completa aos três meses de idade (SREEBNY e colabs., 1955; JACOBY e colab., 1959).

Ao nascimento, a glândula submandibular está constituída dos seguintes compartimentos morfológicos, considerando-se em seqüência próximo distal: túbulos terminais, ductos intercalares, ductos estriados e ductos excretores (CHANG, 1974; ALVARES & SESSO, 1975). Os túbulos terminais são estruturas transitórias e, no rato, o parênquima destas glândulas constituem unidades morfofuncionais, denominadas adenômeros, os quais possuem diversos compartimentos celulares representados por ácinos, ductos intercalares, ductos granulosos, ductos estriados e ductos excretores (JUNQUEIRA & FAVA DE MORAES, 1965).

Nas glândulas submandibulares dos roedores, na época da maturidade sexual, ocorre na porção proximal dos ductos estriados intralobulares (adjacentes aos ductos intercalares) uma "especialização" para formar um segmento de túbulo granular. As células do túbulo granular

são grandes, com núcleos situados basalmente, e restos de invaginação basais e um grande número de grânulos elétron-densos de vários tamanhos no citoplasma apical. Os túbulos granulares são muito sensíveis às influências hormonais. Geralmente são menores nas fêmeas do que nos machos, mas a administração de testosterona às fêmeas, resulta no desenvolvimento de uma estrutura como a do macho; inversamente, a castração de machos resulta em glândulas semelhantes às das fêmeas (BHASKAR, 1978).

Pesquisas têm demonstrado a interrelação entre glândulas submandibulares, hipófise e tireóide.

O camundongo macho mostra um desenvolvimento maior dos túbulos granulares e proteínas com atividades biológicas específicas. A maioria destas têm pesos moleculares semelhantes, embora com atividades diferentes sobre os tecidos (BHASKAR, 1978).

Os ductos granulosos típicos aparecem aos 60 dias de idade no rato, acontecendo de forma gradual, a partir dos ductos estriados, sendo mais intensa na porção proximal dos ductos e, num mesmo ducto, podem ser observados diversos estágios de diferenciação (JACOBY e colab., 1959; SRINIVASAN e colab., 1975).

Aos 100 dias de idade, os ductos granulosos predominam sobre os ductos estriados, e com 180 dias as glândulas apresentam as características de glândulas completamente desenvolvidas; os ductos granulosos contorcidos são proeminentes, sem, no entanto, predominarem sobre os ácinos. Há pequeno número de ductos estriados (JACOBY e colab., 1959).

Os efeitos da castração na modulação estru

tural e bioquímica dos ductos granulosos da glândula submandibular do camundongo, foram realizados por TAMES em 1979, que observou que esses ductos nos animais castrados eram semelhantes aos das fêmeas, isto é, menores e com menor número de grânulos. A castração de ratos machos foi e fetuada antes dos animais completarem 60 dias de idade, época em que estes atingem a maturidade sexual e também o completo desenvolvimento dos túbulos granulares (JACOBY e colab., 1959).

Dos ductos granulosos, têm sido isoladas diversas substâncias ativas, denominadas de fatores (MATHEUS, 1982). A maioria destes fatores têm pesos moleculares semelhantes, entretanto, seus efeitos sobre os tecidos e animais são absolutamente diferentes. Assim, o fator de crescimento do nervo (NGF) estimula o crescimento de neurônios a partir da raiz dorsal dos gânglios embrionários e dos gânglios simpáticos. O fator de crescimento da epiderme (EGF) causa a abertura prematura das pálpebras e a erupção dos incisivos, e aumenta a queratinização quando injetado em camundongos recém-nascidos (BHASKAR, 1978).

Ficou demonstrado por TAKEDA e colabs., 1986, que após uma única amputação dos incisivos inferiores ocorre um aumento de peso das glândulas submandibulares por hiperplasia e hipertrofia. As mitoses atingiam o máximo no 4º dia após a amputação dos dentes e o peso máximo das glândulas era atingido no 7º dia. No 10º dia, o número de mitoses se igualavam ao do grupo controle.

O aumento de peso das glândulas submandibu

lares pode ser observado também com a administração de drogas, o que ocorre quando o isoproterenol é utilizado (CATANZARO GUIMARÃES, 1974; GOODMAN e colab., 1988).

Ademais, o aumento das glândulas submandibulares, que é um órgão parenquimatoso de pouca atividade mitótica, pode a curto espaço de tempo, constituir-se num modelo favorável para o estudo do controle do mecanismo de proliferação celular. Esse aumento pode, então, ser obtido com a administração de drogas, ou pela amputação dos incisivos inferiores.

O presente trabalho situa-se nessa linha de pesquisa, uma vez que nele procuraremos estudar alterações que ocorrem no peso relativo das glândulas submandibulares de ratos normais e castrados, tratados com metotrexato, quando essas glândulas são estimuladas pela amputação dos incisivos inferiores.

II - REVISTA DA BIBLIOGRAFIA

II - REVISTA DA BIBLIOGRAFIA

A grande labilidade das glândulas salivares do rato, alterando-se estruturalmente ante variados estímulos, tornam estas, ideais para o estudo bioquímico, histológico e farmacológico (HANDLEMAN e colab., 1963; SCHNEYER e colab., 1963; WELLS, 1967).

Alterações hiperplásicas e/ou hipertróficas ocorrem quando se administra isoproterenol, ou se procede à amputação dos incisivos inferiores, ou quando os animais são submetidos a uma dieta volumosa (SELYE e colabs., 1961; BROWN-GRANT, 1961; BARKA, 1965; BASERGA, 1966; MALAMUD e colab., 1968).

A administração crônica de isoproterenol induz hipertrofia das glândulas salivares de ratos (SELYE e colabs., 1961) e camundongos (BROWN-GRANT, 1961).

Com uma única injeção de isoproterenol, ocorre um acentuado estímulo da síntese do DNA nas glândulas salivares de roedores; a síntese atinge o máximo 24 horas após a administração da droga (BARKA, 1965; BASERGA, 1966).

A administração do isoproterenol, num período de 10 dias, induz um aumento de 2,5 vezes das glândulas submandibulares (SELYE e colabs., 1961).

A hipertrofia causada pelo isoproterenol foi completamente evitada quando o metotrexato foi administrado simultaneamente com o isoproterenol (MAKULU e colab., 1972).

Os resultados destas experiências indicaram que os inibidores metabólicos podem ser úteis como ferramentas na elucidação do mecanismo de estimulação da síntese do DNA pelo isoproterenol (BASERGA, 1966) e da atividade de glândulas submandibulares de ratos e camundongos (BARKA, 1965; SELYE e colabs., 1961; BAKER e colabs., 1964).

Foram efetuadas pesquisas com a finalidade de verificar se estes fenômenos eram sexo-dependentes, isto é, se a síntese do DNA poderia ser hormonalmente influenciada e se as alterações hormonais ofereciam alguma explicação para as variações biológicas em resposta à administração do isoproterenol (BARKA, 1965; BARKA, 1967; BAKER e colabs., 1964). Os resultados indicaram que o sexo afeta a estimulação da síntese do DNA, porém, em ambos os sexos, ocorre aumento da síntese do DNA (BARKA, 1967).

Verificou-se também, que a teofilina tem efeito bastante significativo no aumento de peso das glândulas submandibulares de ratos (WELLS, 1967) e que este aumento não ocorre se houver destruição prévia da inervação autonômica (WELLS e colab., 1964). Ainda pelas pesquisas e efetuadas por estes autores, constatou-se que a administração contínua de teofilina e outros estímulos sialoadenotróficos como amputação dos incisivos inferiores em ratos, ou com a administração de alimentação volumosa, acarretava um aumento grande de peso das glândulas submandibulares. No caso de dieta volumosa o efeito sinérgico dos estímulos sialoadenotróficos acarretavam aumento das glândulas destituídas de inervação simpática. O mesmo autor concluiu que a teofilina não altera significativamente o efeito de catecolaminas e do isoproterenol no peso das glândulas salivares.

É sabido que amputações periódicas da porção erupcionada dos incisivos inferiores dos ratos resultam em aumento das glândulas submandibulares. O aumento destas é devido à hipertrofia das células dos ácinos e não tem sido encontrada proliferação mitótica de quaisquer células de estruturas das glândulas, ao contrário do que ocorre quando se administram drogas simpatomiméticas (PEREC e colabs., 1965; WELLS e colab., 1959; WELLS, 1960; WELLS e colabs., 1960; WELLS, 1963).

Por outro lado, uma simples amputação dos incisivos inferiores, provoca hipertrofia e hiperplasia, explicando, assim, o aumento das glândulas (TAKEDA e colabs., 1986; WELLS e colabs., 1959; HANDLEMAN e colab., 1963; PEREC e colabs., 1965).

TAKEDA e colabs., 1986, estudando glândulas submandibulares de ratos que tiveram os incisivos inferiores amputados uma só vez, encontraram um número aumentado de células acinosas em mitose, entre 2 e 7 dias da amputação. O maior número de mitóse atingia o máximo após 4 dias. Verificaram, ainda, que a hipertrofia dos ácinos alcançava o máximo aos 7 dias.

Este trabalho permitiu concluir haver respostas diferentes das glândulas submandibulares quando se fazem amputações periódicas, ou uma única amputação.

Estudos da ultra-estrutura das glândulas submandibulares de ratos, efetuados após uma única amputação dos incisivos inferiores, revelaram aumento de grânulos de secreção e células mais ricas em organelas.

Este número aumentado de organelas era maior entre 4 e 7 dias da amputação e o retículo endoplas-

mático de superfície rugosa e o Aparelho de Golgi ocupavam uma grande porção do citoplasma. A arquitetura das células dos ácinos se assemelhava àquelas alterações que ocorrem nas glândulas submandibulares induzidas pela administração de isoproterenol (SEIFERT, 1967; TAKAHAMA e colab., 1967).

Por outro lado, 10 a 14 dias após a amputação dos incisivos inferiores dos ratos, foram encontradas células em degeneração nos ácinos, e o tamanho e a estrutura das células remanescentes tornaram-se gradualmente similares àquelas das glândulas do grupo controle. Tais alterações degenerativas das células dos ácinos após hiperplasia, são similares àquelas alterações verificadas em células acinares destituídas de estímulo neural ou após tratamento com drogas que bloqueiam a estimulação simpática ou parasimpática (WELLS, 1960; WELLS e colabs., 1961).

A maioria dos tecidos sofre um constante processo de renovação, graças à contínua multiplicação e morte de suas células. A velocidade de renovação das células varia muito de um tecido para outro, podendo ser rápida, como no caso do epitélio intestinal, ou lenta, como no caso do pâncreas e tireóide.

Considera-se o ciclo celular como o intervalo existente entre a mitose da célula mãe e de uma ou ambas células filhas (BASERGA, 1971). Pode, ainda, ser subdividido em 4 períodos consecutivos: (a) G_1 , período que compreende o término da mitose e o início da replicação do DNA, (b) S, período de replicação ou biossíntese semi-conservativa do DNA, (c) G_2 , período que se estende do término da síntese do DNA até o início da mitose, (d) M, que compreende todo o período cariocinético (HOWARD e colab., 1953; LAMERTON e colab., 1963).

As células do organismo animal comportam-se de três maneiras diferentes quanto ao ciclo celular. Assim, algumas têm a propriedade de se dividirem continuamente, ou seja, atravessam periodicamente o ciclo. Outras células raramente se dividem, mas podem fazê-lo quando sob estímulos apropriados. Estas últimas são células que atravessam longo período interfásico por serem provavelmente células paralisadas em ponto G_1 , (PRESCOT, 1969), recebendo, então, de alguns autores a denominação de células G_0 (PATT e colab., 1963; BASERGA, 1968).

Alguns tecidos são caracterizados por células paralisadas no período G_1 . Tais células manifestam, via de regra, várias funções bioquímicas em consonância com seu estado de diferenciação e só ocasionalmente se dividem por terem presumivelmente perdido esta capacidade. São de interesse particular para o estudo da cancerologia, como muito bem caracteriza COOPER(1971), pois, embora atravessando um longo período interfásico adquirem rapidamente a capacidade de proliferação, quando sob o impacto de estímulos apropriados. Algumas mostram elevado índice metabólico como os hepatócitos e as células acinosas das glândulas salivares; e outras são de restrito metabolismo como os linfócitos, por exemplo, e alguns autores sugerem para estas células a denominação de células em repouso, células G_0 (PATT e colab., 1963; BASERGA, 1968), ou, ainda, células estimuláveis (FUJOKA e colabs., 1963).

O uso destas qualificações é válido, pois, permite a distinção de dois grupos celulares de acordo com o desenvolvimento do ciclo: as células G_0 que normalmente

não se dividem, mas o fazem quando sob estímulos apropriados; e as células G_1 que estão normalmente se preparando para a divisão mitótica e que por isso atravessam periodicamente o ciclo celular (FUJOKA e colabs., 1963).

Dentre as condições bioquímicas que diferenciam estes dois tipos celulares podem estar envolvidos os próprios agentes que controlam a proliferação celular (COOPER, 1971).

Vê-se, então, que os estudos das células com longo período interfásico permite um duplo enfoque do ciclo celular. Primeiro, análise do fator ou fatores que levam as células G_0 a iniciarem o ciclo; segundo, análise dos eventos bioquímicos que preparam as células durante o período G_1 , para a fase S, na qual duplica-se todo o material genômico. É no período G_1 que a célula manifesta seu caráter fenotípico particular (MUELLER, 1971). É ainda neste período que se manifestam os processos bioquímicos preliminares à duplicação do DNA (BASERGA, 1968).

Embora os conhecimentos sobre a verdadeira natureza desses processos, isto é, de como eles atuam na cinética de conversão G_1 -S sejam ainda incipientes (MUELLER, 1969), alguns fatores bioquímicos e biofísicos começam a ser delineados com impressionante exatidão, como: aumento da síntese de RNA e de proteínas, variação na atividade de timidina-quinase, modificações na massa seca, no conteúdo de potássio e sódio e na capacidade transcritiva da cromatina (CATANZARO GUIMARÃES, 1974).

Como se vê, as glândulas salivares estimuladas pelo isoproterenol ou por qualquer outro meio ou droga, constituem importantes modelos de proliferação celular, no qual as células estimuláveis, células acinosas principal-

mente, adquirem a capacidade de iniciar o ciclo reprodutivo celular imediatamente após o estímulo, sendo, portanto, autênticas células G_0 (PATT e colabs., 1963; BAŞERGA, 1968; TAKEDA e colabs., 1986; BASERGA, 1971).

Em suma, a proliferação celular pode ser induzida por uma substância cromatograficamente pura, em uma única dose, como com o isoproterenol; pela amputação dos incisivos inferiores nos ratos que pode provocar hipertrofia e hiperplasia das glândulas salivares. O número de células estimuladas à proliferação pode ser extremamente grande, sendo que o estímulo pode ser de curta duração.

Todo o referido mostra que tanto utilizando-se o isoproterenol para estimular a biossíntese do DNA como a amputação de incisivos inferiores em ratos, tornam estes métodos, modelos interessantes nos ensaios em que se utilizam inibidores mitóticos, principalmente aqueles que deprimem a função celular. No sistema em apreço, a rápida atuação do estímulo, permite não só uma avaliação mais criteriosa do efeito dos inibidores mitóticos, como também a oportunidade de se estudar mais a fundo os eventos bioquímicos do próprio ciclo celular.

O metotrexato (ametopterina) é uma droga usada em quimioterapia do câncer, e exerce profundos efeitos, tanto em células normais como anormais de homens e animais (CHABNER, 1982; MC BRIDE e colab., 1988; MC BRIDE e colab., 1987).

Acredita-se que o metotrexato se liga à enzima dihidrofolato-redutase, reduzindo, assim, as coenzimas

fólicas, necessárias para a síntese ácido nucleico, reduzindo também a amilase e RNA das glândulas parótidas e submandibulares de ratos (CHABNER, 1982; MC BRIDE e colab., 1988).

O mecanismo de ação do metotrexato é o exercido na fase S do ciclo celular, inibindo a síntese do DNA, sendo, por isso, altamente efetivo em tecidos de replicação rápida.

O metotrexato como outros agentes citotóxicos pode ter efeitos colaterais indesejáveis, principalmente na medula óssea e mucosa oral (WOLF e colabs., 1989).

As células acinares e as dos ductos das glândulas salivares não proliferam rapidamente (WOLF e colabs., 1989; YAGIL e colabs., 1985) e devido a isso, as drogas antimitóticas não interferem de maneira satisfatória, a menos que aquelas sejam estimuladas.

Como já vimos, é possível alterar esta situação, seja administrando isoproterenol nos ratos, ou procedendo a amputação dos incisivos inferiores, para provocar hiperplasia e hipertrofia das glândulas submandibulares (TAKEDA e colab., 1986).

A administração por 10 dias de isoproterenol ou isoproterenol mais metotrexato em dois grupos de ratos provocou alterações significativas, sendo que no primeiro houve um aumento de peso das glândulas submandibulares e do DNA; e no segundo grupo não houve aumento de peso glandular e da quantidade de DNA, isto em se comparando com os animais controles (WELLS e colab., 1964).

TAKEDA e colabs., 1986, conforme já nos referimos anteriormente, trabalhando em ratos, cujos incisivos foram amputados uma só vez, encontrou aumento de mito-

se das células acinares e, também, aumento de peso de glândulas submandibulares. Surgiu, então, a idéia de utilizar as glândulas submandibulares estimuladas como modelo de proliferação celular e verificar a ação do metotrexato sobre elas. A amputação dos incisivos inferiores era efetuada uma só vez e o metotrexato era injetado uma vez a cada dois dias, em dose que comprovadamente produzia inibição da síntese do DNA (TAKEDA e colabs., 1986; MAKULU e colabs., 1972).

As glândulas salivares são profundamente influenciadas por hormônios androgênicos (GRAD e colab., 1949). Anteriormente, LACASSAGNE e colab., 1940, observaram que camundongos castrados apresentam atrofia das glândulas submandibulares, atrofia esta que se acentua com a hipofisectomia e que sofre reversão após a administração de andrógenos. ISTRATE, 1955, constatou que o pleno desenvolvimento da glândula submandibular depende dos hormônios sexuais.

A relação glândulas submandibulares-gônadas está evidenciada no fato de que gonadectomia influencia as glândulas submandibulares (RAYNAUD, 1950, 1960) e estas têm influência sobre as gônadas (NARASIMHAN, M.J e colab., 1968).

PLAZA e colabs., 1979, ao estudarem o efeito da extirpação das glândulas submandibulares de ratos sobre o metabolismo do sistema nervoso central, adrenais, tireóide e testículos, concluíram que nestes locais a atividade metabólica mostrava-se aumentada.

III - P R O P O S I Ç Ã O

III - P R O P O S I Ç Ã O

O presente trabalho tem por objetivo verificar as alterações de peso que ocorrem nas glândulas submandibulares de ratos tratados com metotrexato, em diversas condições experimentais:

- 1 - Pesquisar o peso das glândulas submandibulares de ratos com incisivos inferiores amputados e ratos com incisivos inferiores amputados que receberam metotrexato.
- 2 - Fazer verificação análoga em ratos castrados que receberam metotrexato.
- 3 - Verificar se a administração de metotrexato em ratos normais altera o peso das glândulas submandibulares.
- 4 - Pesquisar se a administração de metotrexato nas doses de 0,75mg/Kg e 1,5mg/Kg produz alterações nos pesos das glândulas submandibulares de ratos com incisivos inferiores amputados.

IV - MATERIAL E MÉTODOS

IV - MATERIAL E MÉTODOS

1 - ANIMAIS UTILIZADOS

Para a realização do presente trabalho foram utilizados ratos machos (Rattus norvegicus albinus, Wistar). Estes animais foram mantidos antes e durante a fase experimental com ração granulada marca Ceres e água "ad libitum".

Para a formação de grupos experimentais, os ratos foram pesados, marcados e sorteados. Foram utilizados 157 ratos.

2 - PREPARAÇÃO DOS ANIMAIS

2.1 - ANESTESIA

Para a marcação dos animais e amputação dos incisivos inferiores, os ratos foram anestesiados com éter sulfúrico, por inalação.

2.2 - AMPUTAÇÃO DOS INCISIVOS INFERIORES

No início dos experimentos fazia-se a amputação dos dois incisivos inferiores, utilizando uma pinça goiva. As amputações eram efetuadas ao nível da margem gengival.

2.3 - CASTRAÇÃO DOS RATOS

Quando se utilizavam ratos castrados, a remoção dos testículos era feita um mês antes das experiências, sob anestesia com éter. Para isto, depilava-se a região do escroto, em ambos os lados, e se praticavam duas pequenas incisões (1 cm) verticais para expor os testículos. Exteriorizados os testículos, ligavam-se em massa aos pedículos e se seccionava imediatamente, por baixo da ligadura.

Uma vez realizada a extirpação, suturavam-se as feridas, dando um par de pontos em cada lado, e neste momento, suprimia-se a anestesia. Os animais assim castrados eram utilizados depois de decorrido um mês da cirurgia.

2.4 - REMOÇÃO DAS GLÂNDULAS SUBMANDIBULARES

Com os ratos anestesiados com éter, as glândulas submandibulares eram expostas, separadas das glândulas sublinguais, removidas e imediatamente pesadas.

2.5 - AVALIAÇÃO PONDERAL

Os pesos dos ratos eram determinados em balança de 0,1g de sensibilidade, e os pesos úmidos das glândulas submandibulares em balança analítica de 0,01mg de sensibilidade.

O peso glandular foi relacionado ao peso do animal obtendo-se o peso relativo das glândulas submandibulares = $\frac{\text{Peso das glândulas (g)} \times 100}{\text{Peso do rato (g)}}$.

Obteve-se, dessa maneira, pesos relativos das glândulas submandibulares.

3 - DROGAS, DOSES E VIAS DE ADMINISTRAÇÃO

O metotrexato (ametofterina, USP.), do Laboratório Lederle, foi escolhido.

O sal era dissolvido em água destilada, obtendo as soluções nas concentrações a serem injetadas.

A droga era utilizada nas doses de 0,75mg/Kg ou 1,5mg/Kg, e injetadas por via intraperitoneal, uma vez a cada dois dias, totalizando duas injeções durante a

realização dos experimentos.

Éter Sulfúrico comercial, marca Colombina, foi utilizado para a anestesia dos animais, por inalação.

Cloreto de Sódio, PA, Merck em solução a 0,9%.

O metotrexato e o ClNa 0,9% eram injetados via intraperitoneal.

V - S I S T E M A T I Z A Ç Ã O D A P E S Q U I S A

V - S I S T E M A T I Z A Ç Ã O D A P E S Q U I S A

Foi estudada a influência do metotrexato no aumento de peso das glândulas submandibulares dos ratos.

Sabe-se que a amputação dos incisivos inferiores em ratos provoca o aumento das glândulas submandibulares, havendo aumento das mitoses, hipertrofia e hiperplasia até o 7º dia, permitindo a observação e estudos destes parâmetros em experimentos diversos.

Este trabalho consistiu em avaliar a ação do metotrexato sobre glândulas submandibulares, estimuladas por amputações dos incisivos inferiores, em ratos castrados e normais, escolhendo para avaliação, a determinação do peso relativo das glândulas submandibulares. No 1º dia amputaram-se os incisivos inferiores num grupo de ratos; em outro grupo, além das amputações dos dentes referidos, injetava-se metotrexato, via intraperitoneal, uma vez a cada dois dias, e removiam-se as glândulas submandibulares no 7º dia, após a primeira injeção.

1 - DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais:

GRUPO A - Comparação entre pesos relativos de glândulas submandibulares de animais controle, de animais com incisivos inferiores amputados e de animais com incisivos inferiores amputados mais administração de metotrexato na dose de 0,75mg/Kg. Estudo com 15 ratos.

GRUPO B - Idem, porém com 34 ratos.

GRUPO C - Comparação entre pesos relativos de glândulas submandibulares de ratos controle, de ratos castrados com incisivos inferiores amputados e de ratos castrados com os incisivos inferiores amputados mais injeção de metotrexato na dose de 0,75mg/Kg.

GRUPO D - Comparação entre pesos relativos de glândulas submandibulares de ratos normais e tratados com metotrexato na dose de 0,75mg/Kg. Os animais nas duas situações não sofreram amputação dos incisivos inferiores.

GRUPO E - Comparação entre pesos relativos de glândulas submandibulares de animais controle, de animais submetidos à amputação dos incisivos inferiores, e de animais que além das amputações dos incisivos inferiores recebem metotrexato nas doses de 0,75 e 1,5mg/Kg.

GRUPO F - Comparação entre pesos relativos de glândulas submandibulares de ratos que não sofreram amputações dos incisivos inferiores, aos quais se administrou solução fisiológica (NaCl 0,9%) e metotrexato 0,75mg/Kg.

Esses grupos foram divididos da seguinte maneira:

GRUPO A - A₁ - animais controle.
A₂ - animais com amputação dos incisivos inferiores.
A₃ - animais com amputação dos incisivos inferiores mais administração do metotrexato (0,75mg/Kg).

GRUPO B - B₁ - controle.
B₂ - amputação dos incisivos inferiores.
B₃ - amputação dos incisivos inferiores mais metotrexato.

GRUPO C - C₁ - controle.
C₂ - castrados.
C₃ - castrados mais amputação dos incisivos inferiores.
C₄ - castrados mais amputação dos incisivos inferiores mais metotrexato na dose de 0,75 mg/Kg.

GRUPO D - D₁ - controle.

D₂ - metotrexato 0,75mg/Kg.

GRUPO E - E₁ - controle.

E₂ - amputação dos incisivos inferiores.

E₃ - amputação dos incisivos inferiores mais metotrexato 0,75mg/Kg.

E₄ - amputação dos incisivos inferiores mais metotrexato 1,5mg/Kg.

GRUPO F - F₁ - controle.

F₂ - solução fisiológica.

F₃ - solução fisiológica mais metotrexato.

2 - AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística. Utilizou-se uma análise de variância com um critério de classificação e o Teste de Tukey, para comparação de médias, ao nível de 10% de significância.

Foram obtidos os pesos dos ratos e os pesos das glândulas submandibulares. Como havia variação de peso dos ratos, fez-se a análise da relação entre o peso das

glândulas e o peso do animal*.

* Peso relativo das glândulas submandibulares (%) =
$$\frac{\text{Peso das glândulas (g)} \times 100}{\text{Peso do rato (g)}} .$$

VI - RESULTADOS

VI - R E S U L T A D O S

Os resultados expressos nas tabelas subseqüentes apresentam os pesos dos ratos e os pesos absolutos e relativos das glândulas submandibulares dos diversos grupos experimentais, bem como as avaliações estatísticas de cada grupo.

1 - RESULTADOS DO GRUPO A

T A B E L A I - GRUPO A

Pesos de ratos e respectivas glândulas submandibulares de animais do grupo controle, de animais que tiveram os incisivos inferiores amputados, e animais com incisivos inferiores amputados mais administração de metotrexato 0,75mg/Kg.

GRUPO A ₁ - CONTROLE		GRUPO A ₂ - AMPUTAÇÃO DOS INCISIVOS INFERIORES		GRUPO A ₃ - AMPUTAÇÃO DOS INCISIVOS INFERIORES + METOTREXATO - 0,75mg/Kg.	
Pesos dos ratos (g)	Pesos das glândulas submandibulares direita e esquerda (g)	Pesos dos ratos (g)	Pesos das glândulas submandibulares direita e esquerda (g)	Pesos dos ratos (g)	Pesos das glândulas submandibulares direita e esquerda (g)
372,5	0,4236	326,0	0,4114	380,0	0,6433
364,0	0,5188	325,0	0,4885	341,0	0,4936
377,0	0,4688	324,0	0,4324	373,0	0,6246
327,0	0,3786	335,0	0,4826	276,0	0,4310
364,0	0,3846	343,0	0,6144	287,0	0,3916
Médias: 360,91	0,4349	330,6	0,4859	331,4	0,51682
Peso glandular relativo (*):	0,120	-	0,147	-	0,156

(*) $\text{Peso glandular relativo (\%)} = \frac{\text{Peso glandular absoluto (g)} \times 100}{\text{Peso corporal (g)}}$

T A B E L A I A - GRUPO A

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS VALORES CONSTANTES NA TABELA I.

CAUSAS DE VARIÂÇÕES	GRAUS DE LIBERDADE	SOMAS DOS QUADRADOS	QUADRADOS MÉDIOS	F
GRUPO	2	0,00034118	0,0017059	5,320*
RESÍDUO	12	0,00038479	0,0003206	
TOTAL	14	0,00072597		

* Nível de significância de 10%.

Os dados da Tabela I foram submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey a 10% de significância. O valor de "F" é significativo. A d.m.s., pelo teste de Tukey, é 0,0256.

As médias dos grupos são:

$$A_1 \quad \bar{X}_1 = 0,120$$

$$A_2 \quad \bar{X}_2 = 0,147$$

$$A_3 \quad \bar{X}_3 = 0,156$$

Verifica-se que A_2 e A_3 são significantes, isto é, maiores do que A_1 . Assim, A_2 e $A_3 > A_1$.

Note que nos grupos que sofreram amputações dos incisivos inferiores as glândulas estavam aumentadas.

2 - RESULTADOS DO GRUPO B

T A B E L A II - GRUPO B

Pesos de ratos e respectivas glândulas submandibulares de animais do grupo controle, de animais com incisivos inferiores amputados, e com incisivos inferiores amputados mais administração de metotrexato 0,75mg/Kg.

GRUPO B ₁ - CONTROLE		GRUPO B ₂ - AMPUTAÇÃO DOS INCISIVOS ² INFERIORES		GRUPO B ₃ - AMPUTAÇÃO DOS INCISIVOS ³ INFERIORES + METOTREXATO - 0,75mg/Kg.	
Pesos dos ratos (g)	Pesos das glândulas submandibulares direita e esquerda (g)	Pesos dos ratos (g)	Pesos das glândulas submandibulares direita e esquerda (g)	Pesos dos ratos (g)	Pesos das glândulas submandibulares direita e esquerda (g)
372	0,5230	277	0,4272	225	0,4282
390	0,4498	357	0,6222	209	0,4998
342	0,4136	220	0,4068	268	0,4372
322	0,4968	341	0,4574	308	0,5094
347	0,5704	255	0,3450	258	0,4308
335	0,5266	336	0,4230	306	0,5018
375	0,3386	314	0,5700	371	0,4112
335	0,4642	373	0,7230	260	0,4382
390	0,4686	330	0,5418	286	0,4312
278	0,4350	-	-	320	0,4592
-	-	-	-	335	0,4520
-	-	-	-	314	0,5080
Médias: 348,6	0,4688	311,4	0,5018	288,3	0,4589
Peso glandular relativo (*):	0,134	-	0,161	-	0,159

(*) Peso glandular relativo (%) = $\frac{\text{Peso glandular absoluto (g)} \times 100}{\text{Peso corporal (g)}}$

T A B E L A I I A - G R U P O B

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS VALORES CONSTANTES NA TABELA II.

CAUSAS DE VARIÂÇÕES	GRAUS DE LIBERDADE	SOMAS DOS QUADRADOS	QUADRADOS MÉDIOS	F
GRUPO	2	0,004377	0,0021885	2,813*
RESÍDUO	28	0,022000	0,0007780	
TOTAL	30	0,026377		

* Nível de significância de 10%.

Os dados da Tabela II foram submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey. O valor de "F" é significativo a 10%. O teste de Tukey tem d.m.s. = 0,0275, para comparar B_1 e B_2 ; d.m.s. = 0,0256, para comparar B_1 e B_3 ; e d.m.s. = 0,0264, para comparar B_2 e B_3 .

As médias dos grupos são:

$$B_1 \quad \bar{X} = 0,134$$

$$B_2 \quad \bar{X} = 0,161$$

$$B_3 \quad \bar{X} = 0,159$$

Verifica-se que B_2 e B_3 são estatisticamente maiores que B_1 , o que confirma os resultados da Tabela I.

Este Grupo B_3 , embora tenha sido tratado com metotrexato, não apresentou diferenças quando comparados com os do Grupo B_2 .

3 - RESULTADOS DO GRUPO C

T A B E L A III - GRUPO C

Pesos de ratos e respectivas glândulas submandibulares de animais controle, de animais castrados, de animais com incisivos inferiores amputados e castrados, e animais castrados com incisivos inferiores amputados mais administração de metotrexato 0,75mg/Kg.

GRUPO C ₁ - CONTROLE		GRUPO C ₂ - ANIMAIS CASTRADOS		GRUPO C ₃ - ANIMAIS CASTRADOS + AMPUTAÇÃO		GRUPO C ₄ - ANIMAIS CASTRADOS + AMPUTAÇÃO + METOTREXATO		
Pesos dos ratos (g)	Pesos das glândulas submandibulares direita e esquerda (g)	Pesos dos ratos (g)	Pesos das glândulas submandibulares direita e esquerda (g)	Pesos dos ratos (g)	Pesos das glândulas submandibulares direita e esquerda (g)	Pesos dos ratos (g)	Pesos das glândulas submandibulares direita e esquerda (g)	
372	0,5230	355	0,441948	311	0,4800	267	0,6428	
390	0,4498	350	0,5140	352	0,4396	272	0,3804	
342	0,4136	442	0,5302	335	0,4192	296	0,6557	
322	0,4968	326	0,3506	287	0,4422	317	0,6344	
347	0,5704	379	0,4582	375	0,5486	273	0,3987	
335	0,5276	398	0,4316	280	0,4840	319	0,3744	
375	0,3386	374	0,4546	326	0,5036	315	0,4504	
335	0,4642	342	0,3930	360	0,4790	264	0,3968	
390	0,4696	378	0,4674	298	0,5058	299	0,3556	
378	0,5350	295	0,4206	-	-	357	0,4088	
-	-	-	-	-	-	316	0,4100	
Médias	358,6	0,47886	363,9	0,443958	324,88	0,478	299,54	0,4643
Peso glandular relativo (*):	0,134	-	0,122	-	0,147	-	0,155	

(*) $\text{Peso glandular relativo (\%)} = \frac{\text{Peso glandular absoluto (g)} \times 100}{\text{Peso corporal (g)}}$

T A B E L A III A - GRUPO C

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS VALORES CONSTANTES NA TABELA III.

CAUSAS DE VARIÂÇÕES	GRAUS DE LIBERDADE	SOMAS DOS QUADRADOS	QUADRADOS MÉDIOS	F
GRUPO	3	0,0065196	0,0021732	2,599*
RESÍDUO	36	0,0300000	0,0008360	
TOTAL	39	0,0365196		

* Nível de significância de 10%.

Os dados da Tabela III foram submetidos a análise de variância. O valor de "F" é significativo a 10%.

A d.m.s., para comparar C_1 e C_2 , C_1 e C_4 , é 0,03. A d.m.s., para comparar C_1 e C_3 , C_2 e C_3 é 0,031. E, a d.m.s., para comparar C_3 e C_4 é 0,0303.

Verifica-se que C_4 é maior do que C_2 , o que equivale dizer que o grupo de ratos que sofreu amputação mais administração de metotrexato teve um aumento de peso maior que os dos outros grupos.

Com relação aos grupos C_1 e C_2 , C_2 e C_3 , não a apresentaram diferenças entre si.

4 - RESULTADOS DO GRUPO D

T A B E L A IV - GRUPO D

Pesos de ratos e respectivas glândulas submandibulares de ratos do Grupo D - controle e tratados com metotrexato 0,75mg/Kg.

GRUPO D ₁ - CONTROLE		GRUPO D ₂ - INJETADOS COM METOTREXATO	
Pesos dos ratos (g)	Pesos das glândulas submandibulares direita e esquerda (g)	Pesos dos ratos (g)	Pesos das glândulas submandibulares direita e esquerda (g)
201	0,3148	216	0,3208
215	0,2732	226	0,3400
200	0,3078	203	0,2736
213	0,3866	136	0,3356
228	0,3752	221	0,2924
198	0,3444	237	0,3124
205	0,4222	200	0,3320
200	0,3534	246	0,3768
224	0,2546	206	0,3110
213	0,23992	214	0,3050
Médias: 209,7	0,327212	210,5	0,31996
Peso glandular relativo (*):	0,156	-	0,152

(*) Peso glandular relativo (%) = $\frac{\text{Peso glandular absoluto (g)} \times 100}{\text{Peso corporal (g)}}$

T A B E L A I V A - GRUPO D

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS VALORES CONSTANTES NA TABELA IV.

CAUSAS DE VARIÂÇÕES	GRAUS DE LIBERDADE	SOMAS DOS QUADRADOS	QUADRADOS MÉDIOS	F
GRUPO	1	0,00010153	0,00010153	0,087 N.S.*
RESÍDUO	18	0,02100000	0,00116670	
TOTAL	19	0,02110153		

* N.S. Não significativo a 10%.

Os dados foram submetidos à análise de variância e o valor de "F" foi não significativo a 10%.

Não se conseguiu notar diferenças estatisticamente entre grupos.

5 - RESULTADOS DO GRUPO E

T A B E L A V - GRUPO E

Pesos de ratos e respectivas glândulas submandibulares de ratos do grupo controle, de ratos que sofreram amputações dos incisivos inferiores e que tiveram a amputação dos incisivos inferiores mais administração de 0,75mg/Kg e 1,5mg/Kg de metotrexato.

GRUPO E ₁ - CONTROLE		GRUPO E ₂ - AMPUTAÇÃO DOS INCÍSIVOS INFERIORES		GRUPO E ₃ - AMPUTAÇÃO + 0,75mg/Kg METOTREXATO		GRUPO E ₄ - AMPUTAÇÃO + 1,5mg/Kg METOTREXATO	
Pesos dos ratos (g)	Pesos das glândulas submandibulares direita e esquerda (g)	Pesos dos ratos (g)	Pesos das glândulas submandibulares direita e esquerda (g)	Pesos dos ratos (g)	Pesos das glândulas submandibulares direita e esquerda (g)	Pesos dos ratos (g)	Pesos das glândulas submandibulares direita e esquerda (g)
308	0,3609	273	0,3171	243	0,4800	263	0,4177
287	0,3982	288	0,4705	226	0,4396	204	0,2817
309	0,4249	232	0,3000	253	0,4399	280	0,5325
253	0,2867	268	0,3312	241	0,4247	239	0,3916
278	0,3539	234	0,3300	276	0,5379	238	0,4504
282	0,4155	198	0,3661	231	0,4515	180	0,3832
Médias: 286,16	0,37335	248,83	0,35248	245	0,46226	234	0,4095
Peso glandular relativo (*):	0,130	-	0,142	-	0,189	-	0,175

(*) $\text{Peso glandular relativo (\%)} = \frac{\text{Peso glandular absoluto (g)} \times 100}{\text{Peso corporal (g)}}$

T A B E L A V A - GRUPO E

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS VALORES CONSTANTES NA TABELA V.

CAUSAS DE VARIÂÇÕES	GRAUS DE LIBERDADE	SOMAS DOS QUADRADOS	QUADRADOS MÉDIOS	F
GRUPO	3	0,0130000	0,004441	10,04*
RESÍDUO	20	0,0088048	0,000442	
TOTAL	23	0,0218048		

* Nível de significância de 10%.

A análise de variância, apresentada na Tabela V A, mostra "F" significativa ao nível de 10%. A d.m.s., pelo teste de Tukey, é 0,029.

As médias são:

$$\bar{X}_1 = 0,130$$

$$\bar{X}_2 = 0,142$$

$$\bar{X}_3 = 0,189$$

$$\bar{X}_4 = 0,175$$

É fácil ver que E_3 (recebera 0,75mg/Kg de metotrexato + amputação) é maior do que E_1 (animais controle) e do que E_2 (amputação) e E_4 (recebera 1,5mg/Kg de metotrexato + amputação), o que significa que grupos que receberam 0,75mg/Kg (E_3) e 1,5mg/Kg (E_4) têm os pesos relativos das glândulas submandibulares maiores do que a do grupo controle (E_1) e do grupo com amputação (E_2).

Em resumo: $E_4, E_3 > E_1, E_2$.

6 - RESULTADOS DO GRUPO F

T A B E L A VI - GRUPO F

Pesos de animais e respectivas glândulas submandibulares de animais do grupo controle, animais injetados com solução fisiológica e animais que receberam metotrexato 0,75mg/Kg.

GRUPO F ₁ - CONTROLE		GRUPO F ₂ - INJETADOS COM SOLUÇÃO ² FISIOLÓGICA (NaCl 0,9%)		GRUPO F ₃ - INJETADOS COM METOTREXATO - 0,75mg/Kg	
Pesos dos ratos (g)	Pesos das glândulas submandibulares direita e esquerda (g)	Pesos dos ratos (g)	Pesos das glândulas submandibulares direita e esquerda (g)	Pesos dos ratos (g)	Pesos das glândulas submandibulares direita e esquerda (g)
340	0,4133	344	0,4317	308	0,452
314	0,3596	313	0,4547	282	0,3654
306	0,4172	320	0,4347	311	0,357
323	0,3996	308	0,3509	307	0,5136
310	0,547	323	0,5058	339	0,4766
306	0,4194	306	0,4274	337	0,4759
Médias:316,5	0,4260	319	0,4342	314	0,4400
Peso glandular relativo (*):	0,135	-	0,136	-	0,140

(*) Peso glandular relativo (%) = $\frac{\text{Peso glandular absoluto (g)} \times 100}{\text{Peso corporal (g)}}$

T A B E L A VI A - GRUPO F

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS VALORES CONSTANTES NA TABELA VI.

CAUSAS DE VARIÂÇÕES	GRAUS DE LIBERDADE	SOMAS DOS QUADRADOS	QUADRADOS MÉDIOS	F!
GRUPO	2	0,00008524	0,0000426	0,125 N.S.*
RESÍDUO	15	0,00510930	0,0003405	
TOTAL	17	0,00519454		

* N.S. Não significante a 10%.

A análise de variância revelou que não existe diferença significativa entre médias dos grupos, ao nível de 10%.

VII - D I S C U S S Ã O

VII - D I S C U S S Ã O

No início do nosso trabalho, pensávamos em utilizar as glândulas submandibulares como modelo de proliferação celular, que serviria para estudos de inibidores de crescimento.

A estimulação pelo isoproterenol com consequente hiperplasia e hipertrofia, síntese acelerada de proteínas, aumento de mitoses, possibilita o estudo dos eventos bioquímicos nas diversas fases do ciclo proliferativo celular.

TAKEDA e colabs., 1986, estudando as alterações das glândulas submandibulares, conseqüentes a uma simples amputação dos incisivos inferiores, verificaram o correr após a hiperplasia, hipertrofia e aumento do índice mitótico, que atingia o máximo 7 dias após a amputação.

Por outro lado, trabalhos indicam que o aumento que ocorre nas glândulas, quando se amputam os incisivos inferiores, é devido a um mecanismo neural (WELLS, H. 1960; HOUSSAY, A.B., 1966).

Assim, a administração do metotrexato a ratos, cujas glândulas submandibulares haviam sido estimuladas pela amputação dos incisivos inferiores, serviria como modelo de estudo, com a vantagem do referido aumento, verificar-se sem administração de drogas (TAKEDA e colabs., 1986).

Acontece que ao se analisar os dados da ta bela II, verificamos que os ratos do Grupo B₂ (amputação dos incisivos inferiores) e os ratos do Grupo B₃ (que sofreram amputação dos incisivos inferiores mais metotrexato), apresentaram um aumento de peso das glândulas submandibulares, quando comparados aos animais do grupo controle.

Estes dados, confirmam aqueles relacionados na Tabela I (Grupo A), quando realmente ficamos sem saber o que ocorria, isto é, porque os animais que tiveram os incisivos inferiores amputados e que receberam metotrexato apresentaram um aumento das glândulas submandibulares, pois pensávamos de início, que com a administração de uma droga antimetabólica iria haver uma diminuição das glândulas, mesmo sendo estas estimuladas pela amputação dos incisivos inferiores.

É interessante notar que não ocorrem diferenças estatisticamente significantes entre os pesos relativos das glândulas submandibulares dos animais com os incisivos inferiores amputados (B₂) e aqueles do Grupo B₃ (animais com incisivos inferiores amputados e que receberam metotrexato).

Confirmando o trabalho de TAKEDA e colabs., 1986, verifica-se ainda nas Tabelas I e II, um aumento de peso das glândulas submandibulares dos animais com incisivos inferiores amputados quando comparados com o controle.

Por outro lado, quando o metotrexato foi administrado a ratos que não sofreram amputação, não houve aumento de peso das glândulas (Grupo D₂) quando comparados com os animais do Grupo D₁ (Tabela IV). Yagil e colabs., 1985, verificaram que o metotrexato não interfe-

re, de maneira satisfatória, nas células dos ductos das glândulas salivares, a não ser que estas sejam estimuladas.

Considerando que com a dose de 0,75 mg/Kg de metotrexato não houve diferença significativa com o grupo que sofreu unicamente amputação dos incisivos inferiores (Tabela II), resolvemos aumentar a dose para 1,5mg/Kg.

Não obstante isso, não foram estatisticamente diferentes, os pesos relativos das glândulas submandibulares dos ratos que receberam estas diferentes doses de metotrexato (0,75 e 1,5mg/Kg) com prévia amputação dos incisivos inferiores (Grupos E Tabela V).

Nesta mesma tabela, observamos que tanto o grupo de animais que sofreu amputação, como os grupos que sofreram amputação mais as diferentes doses de metotrexato apresentaram aumentos significantes dos pesos das glândulas submandibulares em relação ao grupo controle.

De acordo com os trabalhos de LACASSAGNE e colab., 1940 e de GRAD e colab., 1949, ficou demonstrada a atrofia das glândulas submandibulares após a castração, e que estas glândulas são profundamente influenciadas por hormônios androgênicos (ISTRATE, 1955), observou também que o pleno desenvolvimento das glândulas submandibulares depende dos hormônios sexuais.

Com base nestes estudos e ainda no fato de existir uma relação glândulas submandibulares - gônadas (RAYNAUD, 1950, 1960), fizeram amputação de incisivos inferiores de ratos previamente castrados com o intuito de verificar a influência que poderia decorrer da ausência da testosterona sobre o aumento de peso destas glândulas.

Assim, verificamos nos dados da Tabela III, que os animais castrados (Grupo C₂) apresentaram pesos glandulares relativos menores que os do grupo controle (Grupo C₁), embora não estatisticamente significantes. Já o peso glandular dos animais castrados que sofreram amputação dos incisivos inferiores (Grupo C₃) foi maior do que no Grupo C₂ (animais castrados).

Com relação ao Grupo C₄ (animais castrados, mais amputação, mais metotrexato) foi encontrado um aumento de peso estatisticamente superior aos demais grupos, o que nos chama atenção novamente, o fato do metotrexato induzir um aumento de peso glandular em animais que sofreram amputação.

Os dados da Tabela VI referente ao Grupo F, constituído por animais que não sofreram amputação, demonstraram que não houve diferenças significantes entre animais controle (Grupo F₁), animais que receberam solução fisiológica (Grupo F₂) e aqueles que receberam o metotrexato (0,75mg/Kg (Grupo F₃). Esta experiência mostra que a administração de metotrexato ou solução fisiológica, não provoca alterações de peso das glândulas normais não estimuladas, embora estas sejam muito lábeis e sujeitas a estímulos.

Além do mais, os resultados do Grupo F₃ (administração do metotrexato apenas), isto é, sem amputação confirmam os resultados da Tabela IV Grupo D, quando se verificou não haver diferenças entre ratos controle (Grupo D₁) com os tratados com metotrexato (Grupo D₂).

VIII - CONCLUSÕES

VIII - C O N C L U S Õ E S

Nas condições que que foi realizado o presente experimento, julgamos válidas as seguintes conclusões:

- 1 - Os pesos relativos das glândulas submandibulares de ratos que tiveram os incisivos inferiores amputados e que receberam metotrexato não apresentaram diferenças significantes, quando comparados com os animais que tiveram somente os incisivos inferiores amputados, en tretanto, os pesos relativos das glândulas dos animais destes dois grupo foram maiores que os do grupo controle (Tabelas I e II; p.26 e 28).
- 2 - Em ratos castrados, não ocorreu aumento de peso relativo das glândulas submandibulares, quando os incisivos inferiores foram amputados, porém a administração de metotrexato em ratos castrados com incisivos inferiores amputados, induz a um aumento de peso relativo das glândulas submandibulares (Tabela III; p. 30).
- 3 - Em ratos normais, a administração do metotrexato não produziu alteração nos pesos relativos das glândulas submandibulares (Tabela IV; p. 32).

- 4 - As glândulas submandibulares de ratos com incisivos inferiores amputados, que receberam metotrexato nas doses de 0,75mg/Kg e 1,5mg/Kg, não apresentaram diferenças significantes de pesos relativos (Tabela V; p. 34).
- 5 - Também não apresentaram diferenças significantes de pesos, as glândulas submandibulares de ratos que receberam solução fisiológica e metotrexato quando comparados ao grupo controle (Tabela VI; p. 36).

IX - R E S U M O

IX - R E S U M O

Foi estudada a ação de metotrexato nas doses de 0,75mg/Kg e 1,5mg/Kg sobre o peso relativo de glândulas submandibulares de ratos machos estimulados pela amputação dos incisivos inferiores. Procedia-se a amputação dos incisivos inferiores, em ratos castrados e não castrados. Esses animais recebiam injeções de metotrexato via intraperitoneal, uma vez a cada dois dias e no 7º dia as glândulas eram removidas e pesadas em balança analítica.

No grupo de ratos não castrados que foram submetidos a amputação dos incisivos inferiores e no grupo com amputação dos incisivos inferiores mais a administração de metotrexato, verificou-se aumento de peso relativo das glândulas submandibulares, quando comparados ao grupo controle.

Em ratos castrados, não ocorreu aumento de peso relativo das glândulas submandibulares, quando os incisivos inferiores foram amputados, porém a administração de metotrexato em ratos castrados com incisivos inferiores amputados, induz a um aumento de peso das glândulas submandibulares.

Por outro lado, comparando pesos relativos de glândulas submandibulares de ratos normais que receberam administração de metotrexato nas doses de 0,75mg/Kg e 1,5mg/Kg ou Cloreto de Sódio 0,9% não encontramos diferenças.

Os resultados foram submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey.

X - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

X - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVARES, E.P. & SESSO, A. Cell proliferation, differentiation and transformation in rat submandibular gland during early postnatal growth. A quantitative and morphological study. Arch. hist. Jap., 38: 117-208, 1985.

BAKER, B.L.; CLAPP JR., H.W.; LIHT, J.A. Salivary glands and their secretions: An international conference, Pergamon Press, The Macmillan Company, New York, 1964, p. 63.

BARKA, T. Stimulation of desoxyribonucleic acid synthesis in the salivary gland by isoproterenol. The effect of sex. Exp. Cell. Res., 48: 53-60, 1967.

_____. Induced cell proliferation: The effect of isoproterenol. Exp. Cell. Res., 37: 662-79, 1965.

_____. Stimulation of DNA synthesis by isoproterenol in salivary gland. Exp. Cell. Res., 39: 355-64, 1965.

BASERGA, R. Inhibition of stimulation of DNA synthesis by isoproterenol in submandibular glands of mice. Life Sciences, 5: 2033-9, 1966.

_____. The control of cell proliferation in mammalian cells. In: Drugs and cell regulation. E. Mihich ed., Academic Press, New York and London, 1971, p. 35-50.

_____. Biochemistry of the cell cycle: A review. Cell Tissue Kinet, 1: 167-91, 1968.

BHASKAR, S.N. Histologia e Embriologia Oral de Orban, 8 ed., Trad. E.D. Muhler, Artes Médicas, São Paulo, 1978.

BROWN-GRANT, K. Enlargement of salivary gland in mice treated with isopropylnoradrenaline. Nature, 191: 1076-8, 1961.

CALABRESI, P. & PARKS JR., R.C. Antiproliferative agents and drugs used for immunosuppression. In: The Pharmacological Basis of Therapeutics. Gilman A. Goodman; L.S. Goodman; A. Gilman eds., 6 ed., Macmillan-New York, 1985, p. 817-56.

CATANZARO GUIMARÃES, S.A. Glândulas salivares estimuladas pelo isoproterenol: um modelo de proliferação celular. Ciência e Cultura, 26 (8): 729-44, 1974.

CHABNER, B.A. Pharmacologic principles of cancer treatment. In: Methotrexate (B.A Chabner, ed.), W. B. Saunders Co., Philadelphia, 1982, p. 229-55.

CHANG, W.W.L. Cell population changes during acinus formation in the postnatal rat submandibular gland. Anat. Rec., 178: 187-202, 1974.

COOPER, H.L. Biochemical alterations accompanying initiation of growth in resting cells. In: R. Baserga ed. The cell cycle and cancer. Marcel Decker, New York, 1971, p.191-224.

FUJOKA, M; KOGA, M.; LIEBERMAN, I. Metabolism of ribonucleic acid after partial hepatectomy. J. Biol. Chem. 238: 3401-6, 1963.

GILMAN, A.G. & GOODMAN L.S. As Bases Farmacológicas da Terapêutica, 7 ed., Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan, S/A., 1988.

GRAD, B. & LEBLOND, C.P. The necessity of testis and thyroid hormones for maintenance of serous tubules of submaxillary gland in the male rat. Endocrinology 45 : 250-66, 1949.

HANDLEMAN, C.S. & WELLS, H. Morphological and histochemical studies of experimentally enlarged and atrophied salivary glands of rats. Am. J. Anat., 112 : 65-71, 1963.

HOUSSAY, A.B. Nervous and hormonal control of the structure and I_{131} uptake by the submaxillaries. Alabama J. Med. Sci. 3: 312-24, 1966.

HOUSSAY, A.B.; PERONACE, A.A.V.; PEREC, C.J.; RUBINSTEIN, O. Role of chorda tympani in submaxillary hipertrophy by incisor amputation in the rat. Acta Phisiol. Latinoam., 12: 153-66, 1962.

HOWARD, A. & PELC, S.R. Synthesis of desoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromossome breakage. Heredity (supl.), 6: 261-73, 1953.

HUMPHEY, T. Cell contact, contact inhibition of growth and the regulation of macromolecular metabolism. Cells interation, Lepetit Colloquium, 3 ed., London, North Hol. Publ. Co., 1972, p. 264-76.

ISTRATE, 1955. Apud Nova Cruz, J.L.: Influência da sialoadenectomia sobre os testes de sensibilidade à insulina e de tolerância à glicose em cães. Rev. Fac. Odont. Pelotas, 5: 43-70, 1964.

JACOBY, F. & LEESON, C.R. The postnatal development of the rat submandibular gland. J. Anat., 93: 201-16, 1959.

JUNQUEIRA, L.C.V. & FAVA DE MORAES, F. Comparative aspects of the vertebrate major salivary glands biology. In: Funktionelle und morphologische organization der zelle sekretion und excretion. Berlim, Springer-Verlag, 1965, p. 36-48.

LACASSAGNE, A. & CHAMORRO, A. Réaction a la testosterone de la glande sous maxillaire, atrophiée consecutivement a l'hypophysectomie chez la souris. C.R. Sceanc. Soc. Biol. Fil., 133: 180-1, 1940.

LAMERTON, L.F. & FRY, R.J. Cell proliferation. Blackwell, Oxford, 1963.

LIEBERMAN, M.W. DNA metabolism cell death, and cancer chemotherapy. In: The pathology of transcription and translation, Faber, E. ed. . Marcel Dekker, Inc. New York, 1972, p. 38-50.

MAKULU, D.R. & ASHMORE, J. Glucose oxidation in isoproterenol stimulated salivary glands of the rat. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 139 (1): 19-23, 1972.

MALAMUD, D. & BASERGA, R. Glycogen concentration and DNA synthesis in isoproterenol stimulated salivary glands. Exp. Cell. Res., 50: 581-8, 1968.

MC BRIDE, R.K.; HARPER, L.; SIEGEL, I.A. Methotrexate induced changes in rat parotid and submandibular gland function. J. dent. Res., 66 (9): 1445-8, 1987.

MC BRIDE, R.K. & SIEGEL, I.A. Effect of methotrexate on protein and amylase secretion by rat parotid and submaxillary salivary glands. Archs oral Biol., 33 (4): 245-9, 1988.

MATHEUS, G. Estudo morfológico e morfométrico das glândulas parótidas e submandibulares de animais nascidos de ratos injetados com Parotin. Araçatuba, Faculdade de Odontologia, 1982, (Tese de Doutorado).

MUELLER, G. C. Biochemical perspectives of G_1 and S intervals in the replication cycle of animal growth . In: The cell cycle and cancer. R. Baserga, ed., 1971, p. 269-304.

_____. Biochemical events in the animal cell cycle. Fed. Proc. Fed. Soc. Exp. Biol., 28: 1780-9, 1969.

NARIMSHAN, M.J. & GANHA, V.G. The regulatory influence of the submandibular gland on growth. Ann. Endocr., 29 : 513-22, 1968.

PATT, H.M. & QUASTLER, H. Radiation effects on cell renewal and related systems. Phys. Rev., 43: 357-96 , 1963.

PEREC, C.J.; HOUSSAY, A.B.; PERONACE, A.A.V.; HARFIN, J.F. Submaxillary and retrolingual gland hypertrophy by different incisors amputations in the rat. J. dent. Res., 44: 683-9, 1965.

PEREC, C.J.; HOUSSAY, A.B.; PERONACE, A.A.V.; FABIANO, M.
N. Submaxillary and retrolingual hypertrophy by
inferior incisor extraction in the rat. Acta. Physiol.
Lat. AM., 14: 211, 1964.

PLAZA, A.V.; MENENDEZ PATTERSON, A.; MARIN, B. Effects of
the extirpation of submandibular salivary glands on
the oxidative activity of nervous and glandular
structure in the male rat. Arch oral Biol., 24: 245-7,
1979.

PRESCOT, D.M. Composition of cell life cycle. In: Fry, R.
J.M.; Grien, M.L. & Kirsten, W.H. eds. Normal and
malignant cell growth, recent results in cancer
research. Springer Verlag, Berlin, 1969, v. 17, p. 79-
90.

RABELO, A.S. Contribuição para o estudo morfológico e
funcionamento da glândula submandibular do rato
(Rattus norvegicus albinus, Rodentia, Mammalia) duran-
te o desenvolvimento embrionário e pós-natal. Rev. Fac.
Odont. USP, 9: 149-67, 1971.

RAMOS JR., J. Oncologia Clínica, 1ed., São Paulo, Savier,
1974.

RAYNAUD, J. Action locale de la testosterone injecté dans la glande sous-maxillaire de la souris. C. R. Acad. Sci., 230: 2045-7, 1950.

_____. Controle hormonal de la glande sous-maxillaire de la souris. Bull. Biol. fr. Belg., 94: 339-523, 1960.

SCHNEYER, C.A. & SHACHLEFORD, J.M. Accelerated development glands of early postnatal rats following isoproterenol. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 112: 320-4, 1963.

SCHNEYER, L.H. & SCHNEYER, C.A. Advance in oral bioolgy . P.H. Staple ed. Academic, New York, 1964, v.1, p. 5-10.

SEIFERT, G. Experimental sialadenosis by isoproterenol and other agents: histochemistry and electron microscope. In: Secretory mecanisms of salivary glands. L.H.Schneyer & C.A. Schneyer eds., Academic Press, Inc. New York, 1967, p. 191-208.

SELYE, H.; VEILLEUX, R.; CANTIN, M. Excessive stimulation of salivary gland growth by isoproterenol. Science , 133: 44-5, 1961.

- SREEBNY, L.M.; MEYER, J.; BACHEM, E.; WEINMANN, S.
Postnatal changes in proteolytic activity and in
morphology of the submaxillary gland in male and
female albino rats. Growth, 19: 57-74, 1955.
- SRINIVASAN, R. & CHANG, W.W.L The development of the
granular convoluted duct in the submandibular gland.
Anat. Rec., 182: 29-40, 1975.
- TAKAHAMA, M. & BARKA, T. Electron microscopic alterations
of submaxillary gland produced by isoproterenol. J.
Ultrastruct. Res., 17: 452-74, 1967.
- TAKEDA, Y.; HIROSE, H.; ENOMOTO, S. Enlargement of rat
submandibular salivary gland induced by single
amputation of lower incisor teeth. J. oral Pathol., 15:
327-33, 1986.
- TAMES, D.R. Efeitos da castração na modulação estrutural
e bioquímica dos ductos granulados de glândulas subman-
dibulares do camundongo. São Paulo, Instituto de Ciên-
cias Biomédicas, USP, 1979, (Tese de Doutorado).
- WELLS, H. Inhibition by surgical procedure and drugs of
accelerated growth of salivary glands of rats. Am. J.
Physiol., 199: 1037-40, 1960.
- _____. The neural regulation of salivary gland growth.
Ann N.Y Acad. Sci., 106: 654-67, 1963.

_____. Salivary gland enlargement in rats after administration of the theophylline. Am. J. Physiol., 212: 1293-6, 1967.

WELLS, H. & PERONACE, A.A.V. Synergistic and nervous regulation of accelerated salivary gland growth. Am. J. Physiol., 207: 313-8, 1964.

_____. Functional hypertrophy and atrophy of the salivary glands of rats. Am. J. Physiol. 212: 247-51, 1967.

WELLS, H.; HANDELMAN, C.; MILGRAM, E. Regulation by sympathetic nervous system of accelerated growth of salivary glands of rats. Am. J. Physiol., 201: 707-10, 1961.

WELLS, H. & MUNSON, P.L. Experimental enlargement of submandibular salivary glands of rats. Am. J. Physiol. 199 (1): 63-6, 1960.

WELLS, H.; ZACKIN, S.J.; GOLDHABER, P.; MUNSON, P. L. Increase in weight of the submandibular salivary glands of rats following periodic amputation of the erupted portion of the incisor teeth. Am. J. Physiol., 196 (4): 827-39, 1959.