

EFFECTO DE LA QUIMIOTERAPIA USADA PARA EL TRATAMIENTO DE LA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA SOBRE LA ODONTOGÉNESIS EN RATAS. Estudio preliminar.

Gloria Matilde Escobar Paucar, Odontóloga C.E.S.

RESUMEN: *Escobar G.M. Efecto de la quimioterapia usada para el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda sobre la odontogénesis en ratas. Estudio Preliminar. CES Odont 1997;10:* El objetivo del proyecto es evaluar las alteraciones del patrón de formación del molar inferior de rata tras la aplicación de 6-Mercaptopurina y Vincristina, usadas en la quimioterapia para el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda en niños. La fase preliminar busca obtener un patrón normal de odontogénesis para las condiciones del estudio y verificar que los animales toleren las dosis calculadas, para pasar a la fase experimental del proyecto.

Se sacrificaron dos animales de la especie *ratus Norvegicus* en los días 13,15,17,19,21,23,25 y 27 de vida. Los cortes teñidos con Hematoxilina-Eosina y observados bajo microscopio de luz muestran el patrón normal de odontogénesis del segundo y tercer molar inferior. Para la tolerancia a las drogas se realizó un ensayo exploratorio clínico de casos. Se dividieron los animales en tres grupos de 5 individuos. Al primero se le administraron 0.1 mg/kg de Vincristina intraperitoneal, 2.5 mg/kg de 6-Mercaptopurina vía oral al segundo, ambos en cuatro dosis y el tercero se dejó como control. Se compararon los incrementos de peso y talla con el grupo control. Los animales toleraron el esquema y este se puede usar en la segunda fase.

Palabras claves: Quimioterapia, Odontogénesis, Molar de rata, Vincristina, 6-Mercaptopurina.

ABSTRACT. *Escobar G.M. Chemotherapy effect used for the acute lymphoblastic leukemia upon rats odontogenesis. CES Odont 1997;10.* The purpose of this project is to evaluate the effect of Vincristine and 6-Mercaptopurine on the odontogenesis of second and third inferior rat molars. These drugs are used for the treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. This first stage was carried out to describe normal odontogenesis and to test the calculated doses of this drugs in order to go up to the second phase.

Two rats were sacrificed at ages of 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25 and 27 days. Mandibles were processed for histological observation under light microscope. Odontogenic pattern of the second and the third inferior molars were described. A total of 15 animals were used to test drug tolerance. Five rats received four doses of 0.1 mg/kg Vincristine intraperitoneal injections. Five of them received four oral doses of 0.3 mg/kg 6-Mercaptopurine, whereas the others were used as controls. Weight and body length increments were compared between groups. This scheme of drug application was weighted by the hole group and can be used at the experimental phase of this project.

Key words : Odontogenesis, Rat molar, Chemotherapy, Vincristine, 6-Mercaptopurine.

INTRODUCCIÓN.

Las complicaciones agudas en cavidad oral constituyen un problema durante el tratamiento de las neoplasias malignas y han sido objeto de varios estudios^{1,2,3}. Las secuelas a largo plazo se han investigado menos, a pesar de que las mayores expectativas de vida en pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda^{4,5,6,7} durante las últimas décadas hacen más importante se conocimiento.

Por su mecanismo de acción, por los efectos sobre otros tejidos y por el estado de los tejidos odontogénicos, es posible suponer que los fármacos antineoplásicos provocan defectos en el diente y sus estructuras de sostén cuando se usan en pacientes pediátricos⁸. Algunos estudios de casos clínicos sugieren que pueden existir alteraciones dentales como resultado de la quimioterapia con drogas antineoplásicas^{7,8,9,10,11,12,13,14}, aunque la multiplicidad de factores asociados dificulta la determinación del papel exacto de las drogas.

Los modelos experimentales permiten un mejor control de las condiciones que pueden intervenir y una observación directa de los cambios ocurridos en los tejidos. El incisivo de rata ha sido usado para el estudio de los efectos de varias drogas antineoplásicas y se han observado alteraciones en las células responsables de la formación de tejidos duros^{15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25}. El efecto parece ser temporal y en la mayoría de los estudios la odontogénesis continúa normalmente. Esto puede tener origen en el empleo de dosis únicas que probablemente no alcanzan el umbral necesario para producir defectos irreversibles o en el hecho de que el incisivo tiene crecimiento continuo, con células en todas las fases de diferenciación, lo cual podría alterar su capacidad de recuperación, a diferencia de los gérmenes humanos. Además, las drogas estudiadas son pocas y dejan por fuera otras de uso prolongado en los protocolos de tratamiento.

Se plantea un proyecto cuyo objetivo principal es evaluar las alteraciones en el proceso de formación del molar de ratas tras la aplicación repetitiva de Vincristina y 6-Mercaptopurina, en comparación con un grupo control. Se dividió en dos fases: una preliminar y una experimental. En la fase preliminar, que se presenta aquí, se busca obtener un patrón normal de odontogénesis del segundo y tercer molar inferior para las condiciones del estudio y verificar que los animales toleren las dosis calculadas de las dos drogas para pasar a la fase experimental.

MATERIALES Y MÉTODOS

Como animales experimentales se usaron ratas blancas de laboratorio de la especie *ratus Norvegicus*, a partir de los 13 días de vida, en período de lactancia. Los animales se mantuvieron en el bioterio del Instituto de Ciencias de la Salud C.E.S. Se eligieron el segundo y tercer molar inferior por su similitud con los gérmenes humanos.

Las drogas empleadas fueron Vincristina, la cual impide la polimerización de los microtúbulos⁶, en la presentación comercial de Oncovín de laboratorios Lilly. Esta droga ha sido usada en estudios con el incisivo de rata^{19,20}. La 6-Mercaptopurina, Mercaptopurina de Wellcome, es un antimetabolito y no ha sido evaluado su efecto en odontogénesis, a pesar de su amplia utilización en los protocolos de manejo de leucemia linfoblástica aguda.

Para el control de odontogénesis se sacrificaron dos animales con éter en los días 13,15,17,19,21,23,25 y 27 de vida. Se fijaron las mandíbulas en formol al 10% y se prepararon los cortes en el laboratorio de patología de Dinámica IPS según la técnica del Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas²⁶ para tinción con Hematoxilina - Eosina. Los cortes se observaron al microscopio de luz por la investigadora y el patólogo y se hizo la descripción de cada uno de los tejidos que conforman el germen y sus variaciones en el período estudiado.

Para la tolerancia a las drogas se emplearon 15 animales divididos en tres grupos de cinco. Al primer grupo se le aplicó Oncovín diluido a 0.1 mg/ml en solución bacteriostática. La dosis inicial de 0.5 mg/kg, usada por Stene^{19,20} tuvo que ser recalculada por la muerte de dos animales después de la primera aplicación. Finalmente se redujo a 0.1 mg/, también usada por Stene, calculada para 30gr de peso y se aplicó en inyecciones intraperitoneales durante los días 15,18,21 y 24. La Mercaptopurina se disolvió en solución salina a una concentración de 0.2mg/ml y se administró por vía oral la dosis sugerida para niños de 2.5mg/kg²⁷ calculada para 30 gr de peso, en los días

15.18.21 y 25. En el grupo control dos animales recibieron inyecciones intraperitoneales de solución salina, en dos se administró solución salina V.O. y en el restante no se intervino. El peso en gramos y la talla en centímetros se tomaron cada dos días a partir del día 15 y hasta el día 27. También se observó la apariencia clínica y comportamiento de los animales.

Resultados

Los resultados del control de odontogénesis se resumen en los cuadros 1 y 2. No se observaron diferencias entre los dos especímenes de cada día y las descripciones corresponden al corte de mejor calidad.

CUADRO 1

Resumen de las Características del Germen del Segundo y Tercer Molar de Rata bajo las Condiciones de este Estudio

ESTRUCTURA	CARACTERÍSTICAS	VARIACIONES
Epitelio Dental Externo	Epitelio simple de células cúbicas.	Sólo se observa en los días iniciales del segundo molar y en el tercer molar. Finalmente se fusiona con el epitelio oral.
Reticulo estrellado	Tejido conectivo laxo, con sus células separadas entre sí. Se ubica por encima del Epitelio Dental Interno o los Ameloblastos	La cantidad varía según los días de desarrollo. Disminuye a medida que el diente se acerca al Epitelio Oral y se pierde durante la erupción.
Estrato Intermedio	Dos o tres capas de células planas, adyacentes a los Ameloblastos.	
Epitelio Dental Interno	Constituye una capa de células cilíndricas, que se prolonga hasta la porción cervical. Tienen una membrana basal eosinófila.	Solo se observa en los días 13 y 15 el tercer molar. A partir del día 17 se deferencia en Ameloblastos.
Ameloblastos	Epitelio columnar, bien definido, presente en toda la corona. Las células presentan los núcleos polarizados. Su altura disminuye a medida que se acercan a la punta de la cúspide y es máxima hacia la porción basal del germen cuando se ha depositado el esmalte y comienza el período de maduración..	Sobre las Zonas libres de esmalte en las cúspides está en contacto con la Dentina, menos definido y con apariencia de epitelio pseudoestratificado.

Esmalte	Basófilo claro, uniforme. Hay mayor espesor en las cúspides y disminuye hacia cervical.	En los días de mayor desarrollo se pierde durante el corte por su mineralización. En las puntas de las cúspides hay una Zona libre de esmalte.
Dentina	Tiene una apariencia uniforme, totalmente acelular. Hacia la papila se observa una capa más clara de predentina. Es posible observar la disposición regular de los túbulos dentinarios.	Diferente espesor entre segundo y tercer molar y entre los días.
Odontoblastos	Forman una capa de células cilíndricas con los núcleos pseudoestratificados. Se desprenden con facilidad durante el corte.	En el día 13, no se han diferenciado en el tercer molar. Aparece mayor condensación celular en la periferia de la papila.
Papila dental	Tejido conectivo laxo muy vascularizado. Sin signos de inflamación.	En algunos gérmenes aparece más fibrosa que en otros.
Vaina Radicular Epitelial de Hertwig	Formada por el Epitelio Dental Externo que se pliega en cervical y se continúa con el Epitelio Dental Interno.	

CUADRO 2

Cronología de los eventos más importantes en la Odontogénesis del segundo y tercer molar de rata.

DÍA	SEGUNDO MOLAR	TERCER MOLAR
13*	<i>Campana avanzada. Células bien diferenciadas</i>	<i>Condensación celular en la periferia de la papila.</i>
15	<i>Ameloblastos bajos en las puntas de las cúspides (Maduración).</i>	<i>Odontoblastos diferenciados. Inicio del depósito de dentina</i>
17	<i>Cúspides cerca al Epitelio Oral. No se observa Epitelio Dental Externo</i>	<i>Diferenciación de Ameloblastos Aposición de esmalte sobre la mitad coronal del germen</i>
19	<i>No hay cambios importantes</i>	<i>No hay cambios importantes</i>
21	<i>Cúspide mesial en contacto con Epitelio Oral.</i>	<i>No hay cambios importantes</i>

	<i>Ameloblastos bajos en toda la mitad coronal</i>	
23	<i>Erupción de la cúspide mesial.</i>	<i>Disminución de la altura de Ameloblastos en las las cúspides.</i>
25	<i>Erupción de las 3 cúspides. Ameloblastos bajos en toda la corona.</i>	<i>Cúspides cerca al Epitelio Oral.</i>
27	<i>No hay cambios importantes</i>	<i>Cúspides en contacto con el Epitelio Oral.</i>

- *En este día el segundo molar ya está en un estadio de campana avanzada, con las células del germen totalmente diferenciadas y depósito de esmalte y dentina. El tercer molar está en período de casquete. No se ha iniciado la formación de esmalte y dentina y las células responsables de su formación no se han diferenciado.*

Los animales del grupo de Oncovín se observaron más delgados al examen clínico a partir del día 25 y 4 animales presentaron alopecia localizada en el sitio de la primera inyección. El grupo de Mercaptopurina no mostró diferencias clínicas con el grupo control. En los gráficos 1 y 2 se observa el incremento de peso de los tres grupos.

GRÁFICO 1
COMPARACIÓN DE LOS PESOS PROMEDIO DE LOS TRES GRUPOS

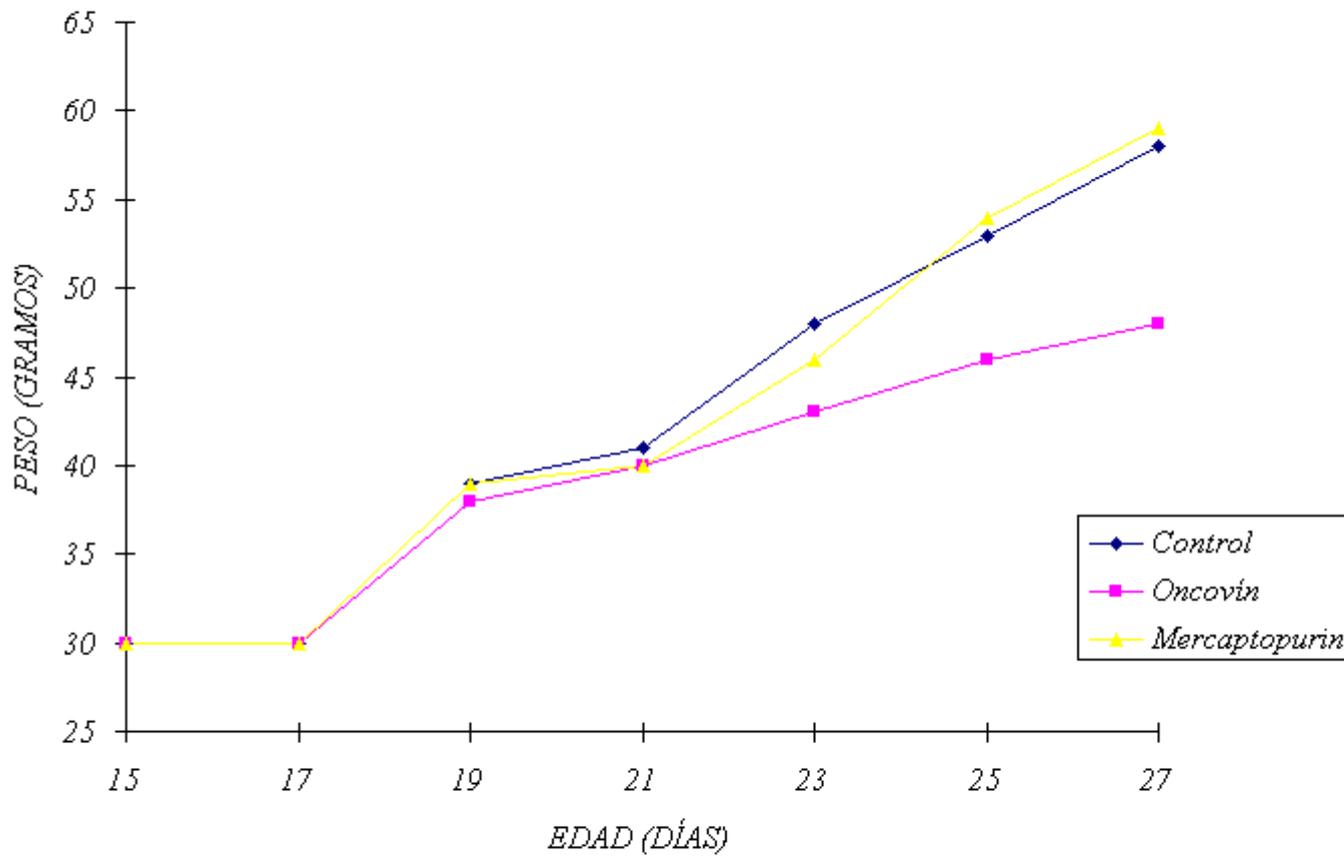
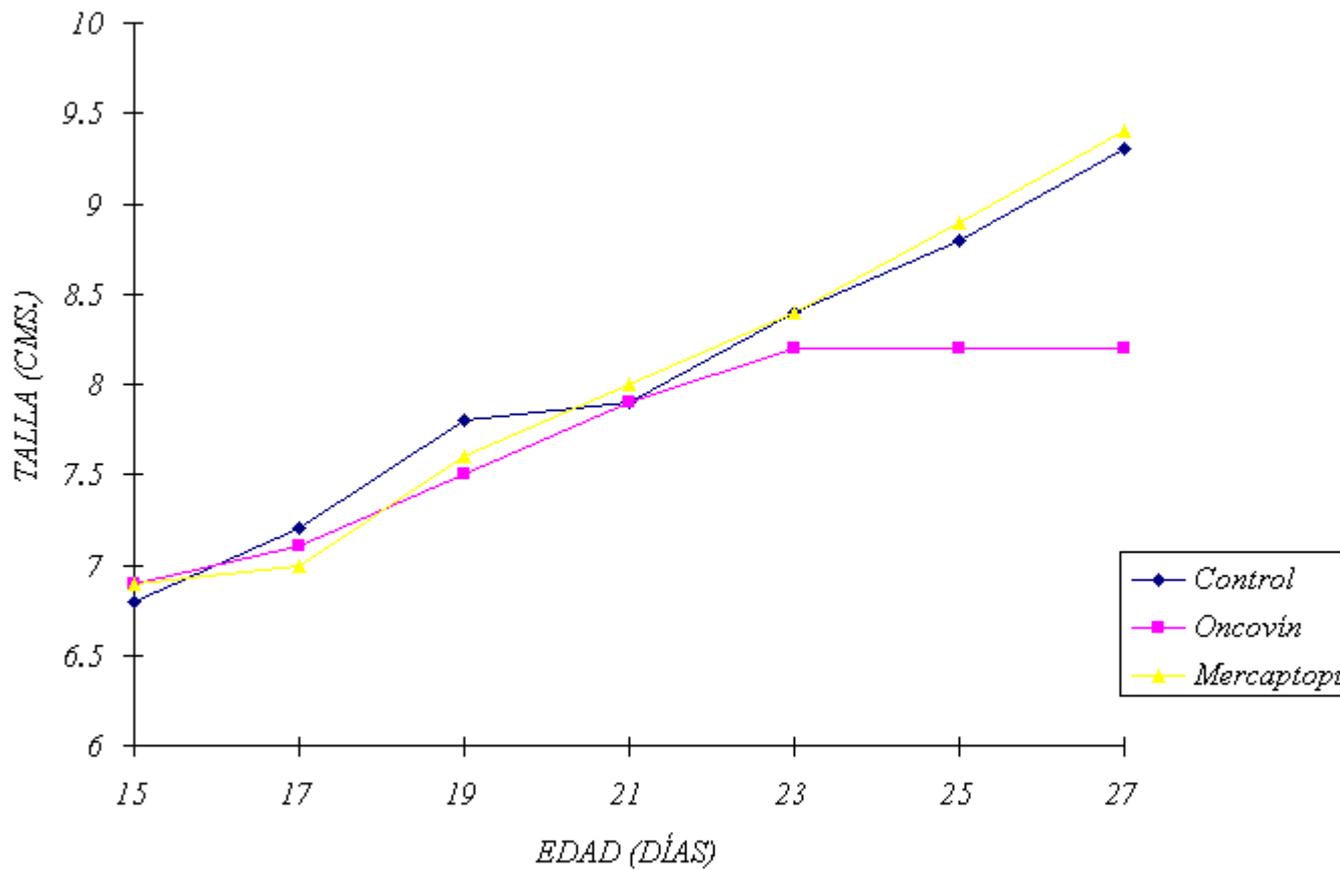


GRÁFICO 2
COMPARACIÓN DE LAS TALLAS PROMEDIO DE LOS TRES GRUPOS



El grupo con Mercaptopurina se comportó de manera muy similar al control, pero con el Oncovin hubo disminución en los incrementos a partir del día 21. Todos los animales toleraron las drogas sin deterioro marcado en su condición física.

Discusión

Una observación general de todos los cortes permitió establecer que el segundo molar se encuentra en un período de corona, con depósito de esmalte y dentina en la edad escogida para el estudio. El tercer molar se puede observar desde un período de casquete en el día trece, sin formación de tejidos duros ni diferenciación completa de Odontoblastos y Ameloblastos, hasta el depósito completo de esmalte y su contacto con el Epitelio Oral justo antes de hacer erupción. El único estudio encontrado sobre la

cronología de la formación de molares fue el de Kurahashi y colaboradores²⁸ ; los resultados de esta investigación coinciden sólo parcialmente en el segundo molar, especialmente en lo que se refiere a erupción. En el tercer molar hay coincidencia.

La conformación de cada uno de los tejidos es muy similar si se comparan las descripciones cualitativas. Estas descripciones son similares a las que aparecen en los textos de Histología humana²⁹. La única diferencia notable que se observó fue la presencia de una zona libre de esmalte en las puntas de las cúspides, como lo reportan los estudios.

En este estudio se observa perfectamente la vaina radicular epitelial de Hertwig en el tercer molar en todos los días estudiados ; en el segundo molar, por el contrario, no se observa debido a la dirección del corte. Se puede concluir que el segundo y tercer molar tienen posiciones diferentes con respecto al eje axial de la mandíbula.

Los resultados obtenidos en este estudio preliminar presentan unas características propias de cada tejido que conforma el germen del molar de rata y permiten comparar alteraciones en la segunda fase del estudio. Además puede ser de gran utilidad en otros estudios acerca de odontogénesis. Al respecto, el tercer molar inferior es un modelo más adecuado por su estado de desarrollo y la facilidad de obtener cortes axiales siguiendo el patrón de la mandíbula.

En la tolerancia a las drogas se contó con un número reducido de animales, lo cual no permitió realizar análisis estadísticos ni estudios de tolerancia con todos los parámetros. La muerte de dos animales con la dosis calculada inicialmente resalta la importancia de hacer la verificación de dosis para la situación particular, además no se habían usado animales de corta edad en los estudios previos. Sin embargo, se cumplió con los objetivos del estudio preliminar en donde se buscaba aplicar un esquema tolerable por los animales experimentales.

BIBLIOGRAFIA

1. Carl W. Local Radiation and Systemic Chemotherapy. JADA 1993 ;124: 119-23
2. Fayle SA, Cruzon ME. Oral Complications in Pediatric Oncology Patients. Pediatr Dent 1991 ;13:289-95.
3. Roldan JC. Estudio estomatológico en niños que reciben terapia oncológica. CES Odontología. 1992; 5: 7-15
4. Young JL et al. Cancer incidence, survival and mortality for children younger than 15 years. Cancer 1986 ;58: 598-602
5. Boring CC, Squires TS, Tong T. Cancer Statistics. Ca 1993 ;43: 7-26
6. Krakoff IH. Cancer chemotherapeutic and Biologic Agents. Ca. 1991 ;42: 264-78
7. Jaffe N et al. Dental and maxillofacial abnormalities in long term survivors of childhood

- cancer: effects of treatment with chemotherapy and radiation of the head and neck. *Pediatrics* 1984 ;73: 816-23
8. Goho C. Chemoradiation therapy effect on dental development. *Pediatr Dent* 1993 ;15: 6-12
9. Goodman ED, Fuks AB. The effects of anti-leukemic therapy on the developing dentition: case report.
Pediatr Dent 1985; 7:318-21
10. Rosenberg SW, Kolodney H, Wong GY, Murphy L. Altered Dental Root Development in Long-Term Survivors of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer* 1987; 59:1640-1648
11. Dahllhof G, Nasman M, Borostrom A, Modeer T, Forsberg CM, Heimdahl A
Rinoden O. Effect of chemotherapy on dental maturity in children with hematological malignancies. *Pediatr Dent*. 1989; 11: 303-6.
12. De Laat, CA, Lampkin BC. Long-term survivor of childhood Cancer: Evaluation and identification of sequelae of treatment. *Ca* 1992;42: 253-82
13. Dahllhof G et al. Histologic changes in dental morphology induced by high-dose chemotherapy and T.B.I. ,1994.
14. Nasman M et al. Disturbances in the Oral Cavity in Pediatric long-term Survivors after Different Forms of Antineoplastic Therapy. *Pediatr Dent* 1994; 16: 217-23
15. Mataka S. Comparison of the effect of colchicine and vinblastine on the inhibition of dentinogenesis in rat incisor. *Arch Oral Biol* 1981;26: 955-61
16. Mikkelsen H. Acute and protracted effects of Vinblastine on Odontoblasts and Dentinogenesis in the rat incisor. *Scand J Dent Res* 1978;86(5): 313-24
17. Moe H, Mikkelsen H. Light microscopic and ultrastructural observations on the effect of vinblastine on ameloblast of rat incisors in vivo. I: Short-term effect on secretory ameloblasts. *Acta Path. Microb Scand* 1977; 85: 73-88
18. Akita H, Kagayama M, Sato R. Light and electron microscopy of the effects of Colchicine and Vinblastine on maturing ameloblasts in vivo. *Arch Oral Biol* 1983;28: 263-71
19. Stene T. Vincristine's effect on dentinogenesis in rat incisor. *Scand J Dent Res* 1979;87: 39-49

20. Stene T. Effect of Vincristine on odontoblasts in rat incisor. Scand J- Dent. Res. 1978;86: 346-56
21. Reade PC, Roberts ML. Some long-term effects of cyclophosphamide on the growth of rat incisor teeth.
Arch Oral Biol 1978; 23: 1001-5
22. Vahlsing HL et al. Dental abnormalities in rats after a single large dose of cyclophosphamide.
Cancer Res 1975;35: 2199-2202
23. Adatia AK. The effect of cyclophosphamide on odontogenesis in the rat. Arch Oral Biol 1975;20: 141-44
24. Adatia AK. Citotoxicity of cyclophosphamide in the rat incisor. Br J Cancer 1975;32: 208-18
25. Adkins KF. The effect of Actinomycin D on differentiation of odontoblasts in the rat.
Arch Oral Biol 1972;17: 323-28
26. Armed Forces Institute Of Pathology . Manual of Histologic Staining Methods.3^a ed. Mc Graw Hill, N.Y.
27. Carter SK, Livingstone RB. Drugs Available to treat Cancer. En: Carter SK, Glastein E, Livingstone RB: Principles of Cancer Treatment, Mc. Graw Hill,1982: 111-145
28. Kurahashi Y, Nagai N, Watanabe K, Watanabe H, Yama K. Chronological observations on the Odontogenesis of rat molars. Bull. Tokyo Dent Coll 1968; 9:147-59
29. Ten Cate AR. Histología Oral : Desarrollo, estructura y función. 2a. ed. Buenos Aires : Editorial Médica Panamericana, 1992 : 80-108.
-