

ROSILENE FERNANDES DA ROCHA

DESENVOLVIMENTO DE FETOS
DE RATAS TRATADAS
COM O 5-FLUORURACIL:
INFLUÊNCIA NA FORMAÇÃO DO
GERME DENTÁRIO

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba da
Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do Título de Doutor
em Ciências, Área de Farmacologia.

Piracicaba

1 9 9 1

Este exemplar foi
fundamentalmente corrigido
conforme sugestões CC.PG 03/06/83
Pneumato, 06 de março de 1982
T. Kato. Jr. H. L. P.

ROSILENE FERNANDES DA ROCHA

DESENVOLVIMENTO DE FETOS
DE RATAS TRATADAS
COM O 5-FLUORURACIL:
INFLUÊNCIA NA FORMAÇÃO DO
GERME DENTÁRIO

ORIENTADOR: PROF.DR. THALES ROCHA MATTOS FILHO

Ao Divanir, Carolina e Vinicius,
por tudo que representam em
minha vida,

Aos meus pais, que através de
exemplos de integridade e
determinação proporcionaram-me
esta oportunidade,

ofereço este trabalho

Aos Professores Drs.

Wilma Pereira Bastos-Ramos e
Thales Rocha Mattos Filho
pela honestidade profissional,
orientação segura, o meu
reconhecimento.

AGRADECIMENTOS

Aos docentes do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNCICAMP, pela contribuição à minha formação científica.

Aos docentes do Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos-UNESP, pela colaboração e incentivo sempre presentes.

Ao Prof.Dr. José Roberto de Oliveira e Silva, Chefe do Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos-UNESP, pelo apoio e amizade sempre sincera.

À CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior, pelo apoio à esta pesquisa.

Ao Prof.Dr. Thales Rocha Mattos Filho, Coordenador da Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP, pelo apoio e dedicação.

À Profa. Maria de Lourdes Garboggini da Gama, Coordenadora do Curso de Pós-Graduação - Área de Farmacologia da FOP-UNICAMP, pela colaboração no transcorrer deste trabalho.

À Profa.Dra. Terezinha de Oliveira Nogueira, da Disciplina de Patologia da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos-UNESP, pela amizade, sugestões e auxílio na leitura da parte histológica.

À Mônica Oliveira Guimarães Figueiredo e Mônica Micadei Rangel, Auxiliares Acadêmicas do Laboratório de Apoio à Pesquisa da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos-UNESP, pela execução das lâminas e fotos utilizadas neste trabalho.

Ao Guilherme Ortiz Mello, Técnico de Laboratório do Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos-UNESP, pelo eficiente auxílio na realização da parte experimental deste trabalho.

À Ivoneide Ramos Leandro, Secretária do Departamento de Ciências Fisiológicas e Luciano Muller Lima, Operador de Sistema Júnior do Núcleo de Processamento de Dados da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos-UNESP, pela paciência e dedicação no trabalho de digitação e formatação deste trabalho.

À Profa.Assist. Leila Novaes, Bibliotecária-Chefe da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos-UNESP, pela colaboração na revisão das referências bibliográficas.

À Profa.Dra. Ione Pelegatti Lemônica, que além da amizade por nós estabelecida, muito auxiliou na elaboração deste trabalho, o meu sincero respeito e agradecimento.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP, através de seu digníssimo Diretor, Doutor Renato Roberto Biral, pela oportunidade que nos ofereceu para a realização do curso de pós-graduação, bem como à Universidade Estadual de Campinas, através de seu Magnífico Reitor Doutor Carlos Alberto Vogt pelo incentivo aos que se dedicam ao ensino e à pesquisa.

A todos aqueles que, anônima e despretenciosamente, colaboraram na realização deste trabalho.

ÍNDICE

1 - INTRODUÇÃO.....	01
PROPOSIÇÃO.....	13
2 - MATERIAL E MÉTODOS.....	15
1 - Animais utilizados.....	16
2 - Metodologia.....	16
2.1- Acasalamento dos animais.....	17
2.2- Droga utilizada.....	17
2.3- Diagnóstico da prenhez.....	17
2.4- Tratamento dos animais.....	17
2.5- Cesariana das ratas.....	18
2.6- Análise dos embriões.....	19
2.6.1- Análise macroscópica.....	19
2.6.2- Análise microscópica.....	19
2.7- Sistematização da Pesquisa.....	20
3 - Análise Estatística.....	25
3 - RESULTADOS.....	26
1 - Variação do peso materno.....	27
2 - Porcentagem de gestação.....	31
3 - Número de implantações uterinas.....	33
4 - Número de reabsorções fetais.....	36
5 - Número de recém-nascidos vivos por ninhada.....	39

6 - Número de fetos mortos ao termo da gestação (natimortos).....	43
7 - Peso médio dos recém-nascidos.....	46
8 - Alterações macroscópicas dos fetos.....	47
8.1- Filhotes de mães tratadas ao 9º dia de gestação.....	47
8.2- Filhotes de mães tratadas ao 10º e 11º dias de gestação.....	48
8.3- Filhotes de mães tratadas ao 12º dia de gestação.....	48
8.4- Filhotes de mães tratadas ao 13º dia de gestação.....	49
9 - Análise microscópica dos germes dentários dos fetos de ratas.....	50
4 - DISCUSSÃO.....	70
5 - CONCLUSÕES.....	76
6 - SUMMARY.....	78
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

1 - INTRODUÇÃO

O estudo de aspectos toxicológicos de drogas antimitóticas é de grande importância pois sua atividade terapêutica é limitada pela toxicidade acentuada, oferecendo assim pequena margem de segurança. Já em 1919 Krumbhaar e Krumbhaar verificaram que a mostarda nitrogenada acarretava aplasia de medula óssea, degeneração do tecido linfóide e úlcera na mucosa gastrointestinal.

É muito difícil equacionar os efeitos tóxicos e os benéficos dessas drogas, uma vez que atuam tanto em células tumorais como em células normais. São de grande utilidade no tratamento das neoplasias disseminadas, inacessíveis a processos cirúrgicos ou radioterápicos, seja inibindo ou retardando o crescimento tumoral, aumentando assim as chances de sobrevivência do paciente, e eventualmente propiciando sua cura.

É conhecido que as células normais são tão mais sensíveis aos antimitóticos quanto mais proliferativas forem. Assim sendo, podem ter um efeito marcante sobre o tecido hematopoiético, epitelial, células germinativas e tecidos embrionários, especialmente aqueles em fase precoce de desenvolvimento. Com isso, elas são altamente teratogênicas, causando no feto as mais variadas anomalias ou mesmo levando à morte ou à reabsorção uterina.

O 5-fluoruracil (5-FU) é um agente antineoplásico reconhecidamente tóxico, apresentando baixo índice terapêutico, o qual é próximo de 1 (um). Contudo é frequentemente utilizado no tratamento de vários tipos de tumores malignos como os de mama e o do aparelho gastrointestinal, bem como propicia sucesso terapêutico em carcinomas de ovário, próstata, orofaringe e outros.

O mecanismo da ação citotóxica é bastante complexo e ainda não bem elucidado, sendo que a ação antineoplásica decorreria de vários fatores. O 5-FU e alguns de seus metabólitos interferem no metabolismo dos ácidos nucleicos ao nível do DNA, dificultando a transformação do uracil em timina, pela inibição da enzima timidilato sintetase, essencial na síntese do DNA (Chaube e Murphy, 1968; 1978; Fukuda e Komamine, 1981; Valeriotte e Santelli, 1984 e Calabresi e Parks, 1987). O 5-fluoruracil pode agir também substituindo o uracil na síntese do RNA, levando à síntese de proteínas anômalas (Akasawa e col., 1986; Armstrong e col., 1986; Takimoto e col., 1986, Kalant e Roschlau, 1991), mediando assim o efeito citotóxico da droga (Chaube e Murphy, 1968).

Como os demais antimitóticos, o 5-fluoruracil acarreta frequentemente no homem, mesmo em doses

terapêuticas efeitos tóxicos tais como estomatite, náusea, vômito, diarreia, depressão do sistema hematopoiético com leucopenia e plaquetopenia, alopecia e dermatites (Junqueira, 1977; Goodman e Gilman's, 1990). Para atenuar a toxicidade, esquemas terapêuticos preconizam a associação de dois ou mais quimioterápicos o que possibilita doses menores de cada qual.

Grande tem sido a preocupação de clínicos com relação à influência de antimitóticos sobre o desenvolvimento embrionário e nesse sentido numerosos são os casos descritos com relação à sua administração à mulheres gestantes. Segundo Blatt e col (1980), quimioterápicos administrados à mulheres antes da concepção ou depois do primeiro trimestre de gravidez não levam à anormalidades congênitas na prole.

Corroborando, Tobias e Bloom (1980) apresentaram dois casos de mulheres grávidas, que se submeteram à quimioterapia com a adriamicina durante a 20ª semana de gestação, sem apresentar anormalidades fetais. Gililland e Weinstein (1983) relataram caso de tratamento quimioterápico com adriamicina na 28ª semana, além de actinomicina D e vincristina, sem também observar anormalidades no feto. No entanto, o mesmo autor, numa

revisão da literatura mostrou que vários antineoplásicos alquilantes como a ciclofosfamida, bussulfan e clorambucil e os antimetabólitos como aminopterina, metotrexato, tioguanina e 5-fluoruracil induzem à malformações fetais quando administradas no primeiro trimestre da gestação.

É sabido da literatura que o 5-fluoruracil quando administrado durante a gestação induz à malformações várias, inclusive à embriotoxicidade, provocando, na dependência da dose e do dia da administração do antimitótico reabsorção e/ou morte fetal (Dagg, 1960; Jusko, 1972; Kromka e Hoar, 1973; Shah e Mackay, 1978; Shah e Wong, 1980; Stephens e col. 1980, Grafton e col. 1987; Naya e col. 1990).

Stadler e Knowles (1971) descreveram caso de mulher tratada com 5-Fluoruracil aos 4-5 meses de gestação, em que o neonato apresentou cianose, com coloração acinzentada do tronco e abalos musculares de extremidades; tais sintomas contudo tiveram remissão após 24 horas.

O 5-fluoruracil tem sido relacionado a defeitos de nascimento no homem quando administrado dentro do 1º trimestre da gestação. Stephens e col., (1980) mostraram que o 5-fluoruracil administrado em mulheres grávidas nas 11ª e 12ª semanas de gestação provoca

aborto, tendo o feto aplasia bilateral radial com ausência do dedo polegar, entre outras anomalias.

Numerosos são os trabalhos experimentais que tratam da influência do 5-fluoruracil e outros antimitóticos em animais prenhes.

Estudo de Wilson (1971), com macacos Rhesus, mostrou que o tratamento com 5-fluoruracil no período entre os 20º e 27º dias da gestação levava à embriotoxicidade com retardo do desenvolvimento e morte intrauterina.

Anormalidades como polidactilia, macro, oligo e sindactilia além de fissura palatina e deformidades na cauda foram observadas por Dagg (1960) em camundongos prenhes, quando da administração do 5-fluoruracil do 9º ao 13º dia de gestação. Os tipos de malformações variavam de acordo com a dose e o dia de gestação, que eram relacionadas com a fase de desenvolvimento embrionário.

Grafton e col. (1987) mostraram efeitos embrionários tóxicos do 5-fluoruracil em ratas prenhes estudando o embrião, onde as malformações apresentadas aumentavam com o maior tempo de exposição à droga, sendo que as

anomalias ocorreram mais para o lado da cauda e membros.

Drogas antitumorais como a adriamicina e daunomicina, substâncias que interferem na síntese de ácidos nucleicos através da intercalação com o DNA, quando administradas à ratas em vários períodos da gestação (entre dias 6-15), induzem a vários tipos de malformações fetais, sendo estes efeitos dependentes da dose e da época do tratamento (Thompson e col., 1978).

Frank e col. (1989), estudando o DMPT (3,3-dimetil-1-feniltiazene) em ratas prenhes mostrou também malformações embrionárias generalizadas, incluindo, micrognatismo.

Com relação aos tecidos dentários, durante sua fase de desenvolvimento embrionário, os mesmos são presumivelmente sensíveis ao uso de antimitóticos, tal como ocorre com outros tecidos proliferativos, não havendo contudo, referências na literatura compulsada.

O rato apresenta dentição única representada na hemiarcada por dois incisivos e três molares superiores e inferiores. Os dentes incisivos crescem, calcificam e erupcionam ininterruptamente por toda a vida do animal, apresentando conseqüentemente em um único dente, o ciclo

total de desenvolvimento dentário, desde a formação até à maturidade. Constituem-se dessa forma, excelente modelo experimental para estudo de crescimento e desenvolvimento dentário.

Os dentes (Moore, 1976, Mjor e Fejerskow, 1990) desenvolvem-se a partir do ectoderma e do mesoderma, sendo o esmalte derivado do ectoderma e os demais tecidos do mesenquima. O desenvolvimento dentário começa com um espessamento no epitélio oral, em forma de U, denominado lâmina dentária. As lâminas produzem saliências arredondadas chamadas brotos dentários, que invaginam-se formando a papila dentária, originando a dentina e a polpa dentária. Assim que o órgão do esmalte e a papila se formam, o mesênquima condensa-se formando uma estrutura semelhante a uma cápsula chamada saco dentário que dá origem ao cemento e ao ligamento periodontal. As células mesenquimais da papila dentária adjacente ao epitélio interno do esmalte diferenciam-se em odontoblastos indo por sua vez produzir pré-dentina, que irá se calcificar e se transformar em dentina. As células adjacentes à dentina diferenciam-se em ameloblastos que produzirão o esmalte. À medida que os dentes desenvolvem-se e os maxilares ossificam-se, as células externas do saco dentário formarão o osso. Com o crescimento da raiz, o dente cresce e a coroa gradualmente emerge atrás da mucosa oral.

O processo de desenvolvimento da lâmina dentária do incisivo no rato inicia-se no 14º dia de vida fetal, enquanto sua erupção ocorre por volta do 10º dia de nascimento e sua oclusão no 16º dia. Para os molares, esses parâmetros ocorrem por volta do 13º ao 20º dia fetal e a erupção por volta do 19º ao 35º dia (Farris e Griffith, 1971, Nishimura e Tanimura, 1976).

As células mesenquimais de crescimento contínuo de incisivos de ratos compreende as células proliferativas da polpa, as células da polpa não proliferativas, os pré-odontoblastos e os odontoblastos. Os pré-odontoblastos e as células da polpa basal têm a capacidade de se proliferarem rapidamente; no entanto as células da polpa não proliferativas tem menor capacidade; a dentina produzindo odontoblastos são células não em divisão (Dahl, 1983).

Devido a essa capacidade de se proliferar rápida e continuamente durante toda a vida do animal, é que o dente incisivo do rato se constitui em modelo para estudo de agentes citotóxicos.

Nordlinder (1971) pesquisou possíveis malformações em ratos adultos tratados com doses únicas de ciclofosfamida sobre tecidos ósseos, encontrando como

resultado malformações de narinas, orelhas e dentes incisivos, sendo que estes, com doses elevadas, algumas vezes não irrompiam.

Koppang (1973) estudando a ciclofosfamida, em incisivos de ratos adultos demonstrou que ocorre interrupções da odontogenese com doses superiores a 50 mg/kg para o lado lingual, e acima de 75 mg/kg para o lado labial, onde ocorria formação de cistos devido a localização inicial do edema, que interferiam com as funções normais do epitélio odontogênico, sendo a formação dentária assim, interrompida.

Massini (1975) demonstrou uma diminuição do crescimento dentário de incisivos inferiores de ratos adultos com a ciclofosfamida, além de efeitos tóxicos à nível de mitoses dos odontoblastos. Resultados similares foram obtidos por Ranali (1976) estudando a ação do metotrexato no mesmo modelo experimental.

Dias Costa (1978) verificou que a colchicina nas doses de 25 a 200 ug/kg administradas durante 10 dias a ratos adultos inibe o crescimento de dentes incisivos inferiores, sem que se verificasse contudo alterações tissulares do órgão.

Também com a colchicina, Nogueira, em 1984, observou que nas doses de 0,5 e 1,5 mg/kg administradas a ratos adultos causaram alterações dose-dependentes devido a bloqueio da mitose celular com a dose de 0,5 mg/kg e um efeito estimulatório na secreção de colágeno pelos odontoblastos com a dose de 1,5 mg/kg.

Dahl (1984, 1985 a,b), realizou vários estudos com a doxorubicina, antibiótico antraciclínico, com as doses de 5, 10 e 10 mg/kg em ratos adultos mostrando um desarranjo estrutural nas células mesenquimais. Esta desorganização ocorria mais para as células em disco celular, e apareciam necróticas, com ocorrência de pré-dentina que funcionava como a fase de regeneração celular após a interrupção da administração da substância.

Com relação ao 5-fluoruracil, De Deus e Han (1976) administrando a droga em camundongos adultos na dose de 25 mg/kg por 3 dias mostraram que a estrutura dos fibroblastos na polpa dentária encontrava-se desorganizada e irregular; ocorria, contudo, um elevado grau de recuperação 10 a 14 dias após a suspensão do antimitótico.

Bastos-Ramos e col. (1991) estudando os efeitos do 5-fluoruracil sobre o desenvolvimento de dentes incisivos

de ratos adultos encontraram que a droga inibe o crescimento dentário somente em doses que acarretaram considerável intoxicação e morte precoce dos animais e sugerindo que tal inibição do crescimento não estava relacionada com a atividade antimitótica da droga, mas decorria do fenômeno geral de intoxicação. Não foram demonstradas modificações histomorfológicas dos dentes.

PROPOSIÇÃO

Tendo em vista as informações da literatura demonstrando que dentes em fase de crescimento (incisivos inferiores de ratos adultos) podem sofrer a ação de drogas antimitóticas, propõe-se estudar a influência do 5-fluoruracil sobre o desenvolvimento do germe dentário de ratos na fase embrionária, aspecto não estudado na literatura compulsada, mesmo com relação a outros agentes citotóxicos.

Paralelamente, e para fins comparativos, propôs-se observar outros efeitos teratogênicos já conhecidos, tais como fechamento do palato, malformações de face, implantação de orelhas, olhos, conformação craniana e de boca, peso de filhotes, extraídos por cesariana ao 21º dia de gestação.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Animais utilizados

Foram utilizados 140 ratos, adultos, da raça Wistar (Rattus norvegicus var albinus), sendo 125 fêmeas virgens, com 90 - 100 dias de idade ao início das experiências, com peso variando entre 200 e 250 gramas e 15 ratos machos adultos, com peso entre 250 e 300 gramas, utilizados para acasalamento, fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP. Os animais recebiam ração Probiotério (G)-Produtor, do Moinho Primor S.A e água, "ad libitum".

2.2 - Metodologia

2.2.1 - Acasalamento dos animais

As ratas eram colocadas com os machos para acasalamento, sempre ao final do dia, permanecendo com os mesmos até a manhã seguinte, após o que era colhido o material vaginal para verificar a presença de espermatozóides e conseqüentemente instalação da prenhez.

2.2.2 - Droga

5-fluoruracil (5-FU) - Roche, ampolas de 250 mg/10 ml.

2.2.3 - Diagnóstico da prenhez

Para a verificação de início de prenhez das ratas, foi realizado o esfregaço vaginal, utilizando-se uma cureta que, após flambada, era colocada em solução de NaCl 0,9% estéril e introduzida na vagina da rata. Retirava-se, assim, uma pequena quantidade de secreção que era colocada numa lâmina de vidro.

As lâminas foram observadas ao microscópio óptico e a presença de espermatozóides, bem como a verificação da fase estro do ciclo estral, foram os fatores determinados para diagnóstico positivo da prenhez, sendo esse dia considerado como o dia 0 (zero) da gestação.

2.2.4 - Tratamento dos animais

Após a constatação da prenhez, as ratas foram separadas por sorteio, para a formação dos grupos tratados com 5-fluoruracil e grupo controle.

Às ratas do grupo controle foi administrada intraperitonealmente solução fisiológica (NaCl-0,9%) num volume único, aos 9º, 10º, 11º, 12º ou 13º dias de prenhez, sendo que cada animal recebeu uma única injeção.

Às ratas do grupo experimental, era administrado 5-fluoruracil (5-FU), por via intraperitoneal, em doses de 10 mg/Kg em um primeiro grupo, 20 mg/kg em um segundo grupo, 30 mg/kg em um terceiro grupo e 40 mg/kg em um quarto grupo, aos 9º, 10º, 11º, 12º ou 13º dias de prenhez, sendo que cada animal recebeu uma única injeção.

2.2.5 - Cesariana das ratas

No 21º dia da prenhez, as ratas foram submetidas à anestesia por inalação de éter etílico, depois do que eram pesadas e contidas em decúbito dorsal em placa de cortiça. Era feita incisão mediana no abdômen e exposição dos cornos uterinos. Contava-se então o número de implantes ou reabsorções e/ou o número de filhotes de cada corno uterino. Com o auxílio de pinça e tesoura, os filhotes eram retirados e colocados em placa de Petri.

2.2.6 - Análise dos embriões

2.2.6.1 - Análise macroscópica

Os filhotes eram limpos, secos em papel de filtro e pesados em balança semi-analítica Owa Labor. Fazia-se a seguir, com o auxílio de lupa de pequeno aumento, a análise macroscópica dos mesmos, observando-se a ocorrência de possíveis anomalias morfológicas, tais como: implantação das orelhas, dos olhos, conformação craniana, palato, desenvolvimento dos membros inferiores e superiores e região caudal. Procedeu-se à pesagem dos filhotes.

2.2.6.2 - Análise microscópica

Depois de realizadas as análises macroscópicas dos filhotes, eram escolhidos cinco de cada mãe, por sorteio. As cabeças eram separadas do tronco e colocadas em frascos identificados, contendo formol a 10%, para a fixação.

Após 24 horas de fixação, as cabeças eram seccionadas em corte sagital mediano, hidratadas, desidratadas, diafanizadas e incluídas em parafina para a confecção de lâminas.

Para a feitura das lâminas, as peças foram cortadas na espessura de seis micras, em micrótomo rotativo 781-ANCAP e a seguir coradas pelo método da hematoxilina-eosina (HE). Foi realizado um total de 1254 lâminas.

Na análise microscópica foram observadas as lâminas quanto às células da polpa, tecido alveolar, processo inflamatório e o próprio germe dentário.

2.2.7 - Sistematização da Pesquisa

As 125 ratas utilizadas, após o acasalamento e verificação do estado de prenhez (dia zero da gestação) foram separados em cinco grandes grupos constituídos cada qual de 25 animais, denominados Grupos A, B, C, D e E.

Os 25 animais pertencentes à cada grupo foram divididos em cinco subgrupos diferentes, dos quais 5 ratas receberam solução fisiológica (controle) e 20 ratas foram tratados com o 5-fluoruracil em diferentes dias da prenhez e em doses também diferentes, conforme esquema a seguir relacionado. As soluções foram sempre administradas por via intraperitoneal. Todas as ratas, ao 21º dia de prenhez, foram anestesiadas, pesadas e seus filhotes retirados,

analisados macroscopicamente e suas cabeças seccionadas e fixadas em formol a 10%. Após 24 horas eram feitas as lâminas para análise histológica dos germes dentários. As mães eram sacrificadas após a operação cesariana.

Grupo A - Ratas injetadas ao 9º dia de prenhez

Os 25 animais pertencentes a este grupo receberam 5-fluoruracil ou solução fisiológica conforme distribuição em subgrupos, a seguir.

Cada sub-grupo foi constituído de 5 ratas:

Sub-Grupo A₁ - Ratas injetadas com solução de NaCl-0,9%
(controle)

Sub-Grupo A₂ - Ratas tratadas com 5-fluoruracil na dose de
10 mg/kg.

Sub-Grupo A₃ - Ratas tratadas com 5-fluoruracil na dose de
20 mg/kg.

Sub-Grupo A₄ - Ratas tratadas com 5-fluoruracil na dose de
30 mg/kg.

Sub-Grupo A₅ - Ratas tratadas com 5-Fluoruracil na dose de
40 mg/kg.

Grupo B - Ratas Injetadas ao 10^o dia de prenhez

Os animais pertencentes a este grupo foram distribuídos em 5 sub-grupos de 5 ratas cada qual:

Sub-Grupo B₁ - Ratas injetadas com solução de NaCl-0,9%.

Sub-Grupo B₂ - Ratas tratadas com 5-fluoruracil na dose de 10 mg/kg.

Sub-Grupo B₃ - Ratas tratadas com 5-fluoruracil na dose de 20 mg/kg.

Sub-Grupo B₄ - Ratas tratadas com 5-fluoruracil na dose de 30 mg/kg.

Sub-Grupo B₅ - Ratas tratadas com 5-fluoruracil na dose de 40 mg/kg.

Grupo C - Ratas injetadas ao 11^o dia de prenhez

Estes animais foram distribuídos nos seguintes sub-grupos de 5 ratas cada qual:

Sub-Grupo C₁ - Ratas injetadas com solução de NaCl-0,9%.

Sub-Grupo C₂ - Ratas tratadas com 5-fluoruracil na dose de 10 mg/kg.

Sub-Grupo C₃ - Ratas tratadas com 5-fluoruracil na dose de 20 mg/kg.

Sub-Grupo C₄ - Ratas tratadas com 5-fluoruracil na dose de 30 mg/kg.

Sub-Grupo C₅ - Ratas tratadas com 5-fluoruracil na dose de 40 mg/kg.

Grupo D - Ratas injetadas ao 12º dia de prenhez

As ratas deste grupo foram distribuídas nos sub-grupos abaixo, constituídos de 5 ratas cada qual:

Sub-Grupo D₁ - Ratas injetadas com solução de NaCl-0,9%.

Sub-Grupo D₂ - Ratas tratadas com 5-fluoruracil na dose de 10 mg/kg.

Sub-Grupo D₃ - Ratas tratadas com 5-fluoruracil na dose de 20 mg/kg.

Sub-Grupo D₄ - Ratas tratadas com 5-fluoruracil na dose de 30 mg/kg.

Sub-Grupo D₅ - Ratas tratadas com 5-fluoruracil na dose de 40 mg/kg.

Grupo E - Ratas injetadas ao 13^o dia de prenhez

As ratas deste grupo foram distribuídas nos sub-grupos com 5 animais em cada qual:

Sub-Grupo E₁ - Ratas injetadas com solução de NaCl-0,9%.

Sub-Grupo E₂ - Ratas tratadas com 5-fluoruracil na dose de 10 mg/kg.

Sub-Grupo E₃ - Ratas tratadas com 5-fluoruracil na dose de 20 mg/kg.

Sub-Grupo E₄ - Ratas tratadas com 5-fluoruracil na dose de 30mg/kg.

Sub-Grupo E5 - Ratas tratadas com 5-fluoruracil na dose de 40 mg/kg.

Colhidos os diversos dados foi realizada a análise estatística dos resultados.

3 - Análise Estatística

Foi realizada Análise de Variância a dois critérios e Teste de Tukey. Para porcentagem de gestação foi feito o Teste do χ^2 .

3 - RESULTADOS

1 - Variação do peso materno

Os dados da Tabela 1 referem-se ao ganho de peso total de ratas do grupo controle tratadas com solução fisiológica 0,9% i.p., e das ratas tratadas com 5-fluoruracil (5-FU) nas doses de 10, 20, 30 e 40 mg/kg aos 9º, 10º, 11º, 12º ou 13º dias de gestação.

Pode-se verificar pela Tabela 1, que os animais controle apresentaram um ganho de peso médio de 112,7 gramas durante a gestação.

Pela Tabela 1 e Tabela 1-A verifica-se que houve uma diminuição significativa no ganho de peso dos animais tratados nos 9º, 10º, 11º e 12º dias de gestação com as doses de 30 e 40 mg/kg de 5-fluoruracil com relação ao grupo controle (Figura 1), não ocorrendo diferença para as doses de 10 e 20 mg/kg. Observou-se também, que não ocorreu diferença do ganho de peso materno estatisticamente significante para os animais que receberam tratamento no 13º dia de gestação, com quaisquer das doses.

Tabela 1 - Média de ganho de peso (em gramas) de ratas prenhes tratadas com solução fisiológica (0) e com 5-fluoruracil nas doses de 10, 20, 30 e 40 mg/kg aos dias 9º, 10º, 11º, 12º, ou 13º dias de gestação.

Tempo de gestação doses (mg/kg)	9º dia	10º dia	11º dia	12º dia	13º dia
0 (5)	107,2±13,2	111,2±16,1	116,6±24,5	121,8±14,8	106,8±22,2
10 (5)	105,4±30,3	103,4±42,7	86,6±36,5	98,6±41,0	118,8±23,7
20 (5)	99,2±34,4	119,0±21,5	64,2±33,4	75,8±34,8	88,4±40,5
30 (5)	28,6±12,4	33,4±30,8	36,4±9,5	70,0±8,9	85,6±21,6
40 (5)	26,4±8,3	28,8±10,9	44,6±11,6	34,0±21,0	67,0±16,5

Obs.: (entre parênteses o número de ratas).

Tabela 1-A - Análise de Variância relativa ao ganho de peso de ratos em relação aos dias de administração de 5-fluoruracil nas doses de 10, 20, 30 e 40 mg/kg (nível de significância 5%)

9º dia				
Fonte de variação	GL	SQ	QM	"F"
total	24	44739,76		
entre ratos	4	6003,76	1500,94	6,87
entre doses	4	35240,56	8810,14	40,32
resíduo	16	3495,44	218,46	
10º dia				
Fonte de variação	GL	SQ	QM	"F"
total	24	57802,36		
entre ratos	4	19644,16	4911,04	34,94
entre doses	4	35909,36	8977,34	63,87
resíduo	16	2248,84	140,55	
11º dia				
Fonte de variação	GL	SQ	QM	"F"
total	24	37665,44		
entre ratos	4	1914,64	478,66	0,52
entre doses	4	21271,84	5317,96	5,87
resíduo	16	14479,16	904,94	
12º dia				
Fonte de variação	GL	SQ	QM	"F"
total	24	39854,96		
entre ratos	4	4285,36	1071,34	1,23
entre doses	4	21634,16	5408,54	6,21
resíduo	16	13935,44	870,96	
13º dia				
Fonte de variação	GL	SQ	QM	"F"
total	24	25229,44		
entre ratos	4	1557,04	389,26	0,40
entre doses	4	8037,44	2009,36	2,05
resíduo	16	15634,96	977,18	

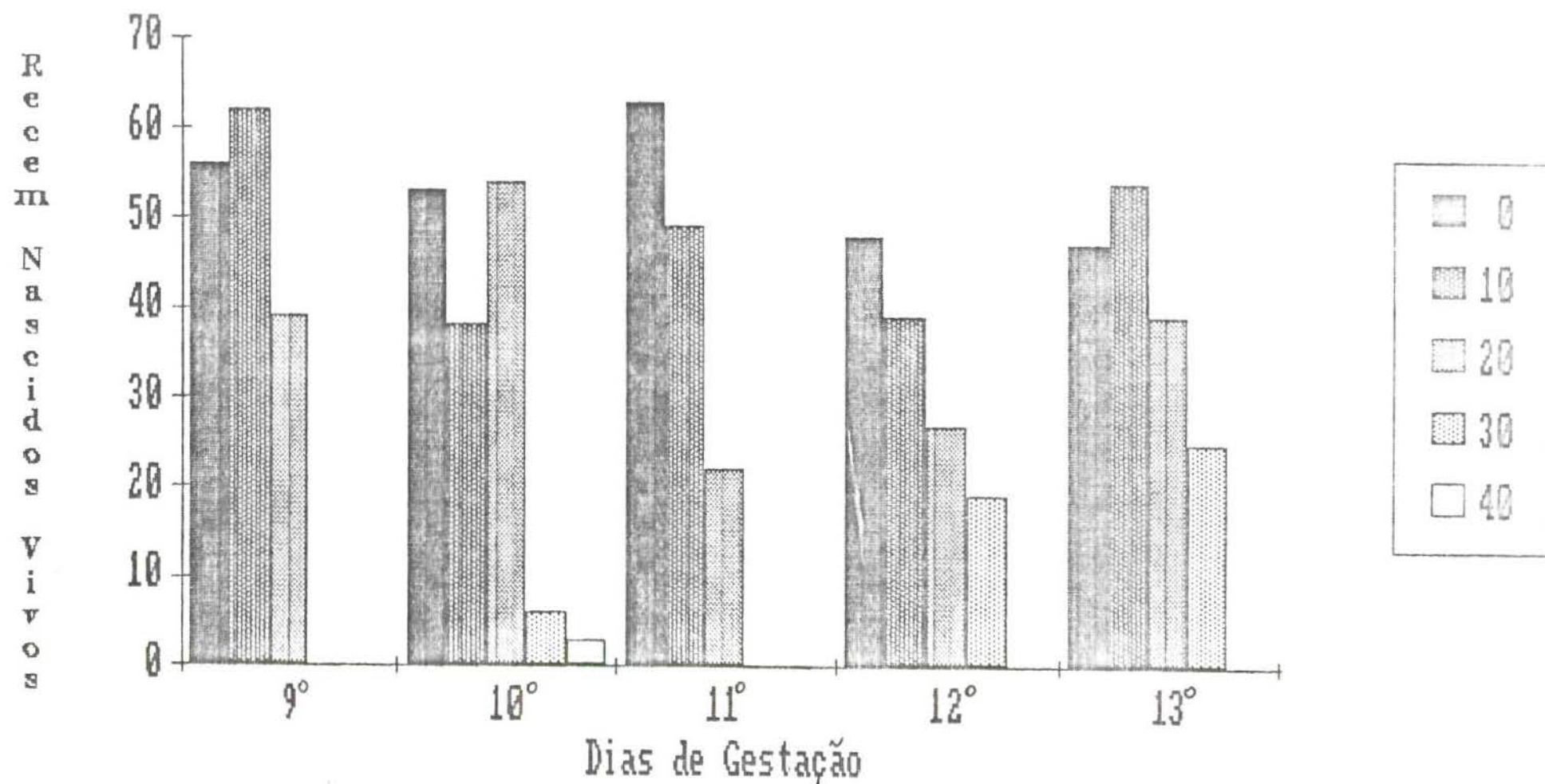


Figura 2 - Numero de recém-nascidos vivos de ratas prenhes tratadas com solução fisiologica e 5-fluoruracil nas doses de 10, 20, 30 e 40 mg/kg aos 9°, 10°, 11°, 12° e 13° dias de gestação

2 - Porcentagem de gestação

Com relação à porcentagem de gestação, as ratas do grupo controle apresentaram 100% de prenhez ao término da gestação em todos os dias de tratamento (Tabela 2).

Foi observada diminuição significativa da porcentagem de gestação a termo com o aumento da dose. Com a dose de 30 mg/kg e 40 mg/kg de 5-fluoruracil foi em torno de 30% em relação aos animais controle (100%), indicando que embora os animais tivessem apresentado diagnóstico de prenhez positiva no dia zero da gestação, o tratamento com o antimitótico interferiu com o desenvolvimento normal da mesma. Não foi observada variação significativa entre os tempos de tratamento, embora se observe, pela tabela 2, que houve menor comprometimento da porcentagem de gestação a termo quando a droga foi administrada ao 13º dia. (Teste X²).

Tabela 2 - Porcentagem de gestação a termo de ratas tratadas com solução fisiológica (0) e com 5 fluoruracil (5-FU) nas doses de 10, 20, 30, e 40 mg/kg aos 9º, 10º, 11º, 12º ou 13º dias de gestação.

Tempo de gestação doses (mg/kg)	9º dia	10º dia	11º dia	12º dia	13º dia
0	100	100	100	100	100
10	100	60	80	80	100
20	80	100	40	80	80
30	0	20	0	60	80
40	0	20	0	20	80

3 - Número de implantações uterinas

Pela Tabela 3 verifica-se que não houve alteração significativa quanto ao número de implantações uterinas em relação aos animais do grupo controle.

Pôde-se verificar também que não ocorreu alteração significativa no número de implantações uterinas para os animais tratados nos 10º, 11º, 12º ou 13º dias de gestação com nenhuma das doses de 5-fluoruracil. No entanto, para as ratas tratadas ao 9º dia de gestação, houve uma diminuição no número de implantações uterinas (Tabela 3 e Tabela 3-A), sendo esta diminuição evidente com a dose de 30 mg/kg.

Tabela 3- Número de implantações uterinas de ratas prenhes tratadas com solução fisiológica (0) e com 5-fluoruracil nas doses de 10, 20, 30 e 40 mg/kg aos 9º, 10º, 11º, 12º ou 13º dias de gestação.

Tempo de gestação doses (mg/kg)	9º dia	10º dia	11º dia	12º dia	13º dia
0	56 (11,2±1,7)	53 (10,6±3,3)	63 (12,6±1,9)	48 (9,6±2,2)	47 (9,4±2,2)
10	66 (13,2±2,1)	39 (7,8±6,6)	49 (9,8±5,0)	39 (7,8±6,0)	57 (11,4±1,9)
20	52 (10,4±0,5)	56 (11,2±2,3)	45 (9,0±4,5)	37 (7,4±4,8)	50 (10,0±2,3)
30	32 (6,4±5,6)	64 (12,8±1,3)	53 (10,6±5,4)	64 (12,8±2,1)	57 (11,4±2,0)
40	62 (12,4±1,2)	52 (10,4±5,3)	50 (10,0±5,3)	36 (7,2±5,9)	51 (10,2±2,6)

Números entre parênteses indicam a média ± desvio padrão.
Cada valor na tabela corresponde a 5 ratas.

Tabela 3-A - Análise de Variância relativa ao número de implantações uterinas entre ratos em relação aos dias de administração de 5-fluoruracil nas doses de 10, 20, 30 e 40 mg/kg (nível de significância 5%)

9º dia

Fonte de variação	GL	SQ	QM	"F"
total	24	343,04		
entre ratos	4	42,64	10,66	1,06
entre doses	4	139,84	34,96	3,48
resíduo	16	160,56	10,03	

10º dia

Fonte de variação	GL	SQ	QM	"F"
total	24	384,16		
entre ratos	4	52,96	13,24	0,79
entre doses	4	65,36	16,34	0,98
resíduo	16	265,84	16,61	

11º dia

Fonte de variação	GL	SQ	QM	"F"
total	24	562,00		
entre ratos	4	86,80	21,70	0,79
entre doses	4	36,80	9,20	0,33
resíduo	16	438,40	27,40	

12º dia

Fonte de variação	GL	SQ	QM	"F"
total	24	626,96		
entre ratos	4	102,16	25,54	0,98
entre doses	4	110,16	27,54	1,06
resíduo	16	414,64	25,91	

13º dia

Fonte de variação	GL	SQ	QM	"F"
total	24	134,24		
entre ratos	4	20,64	5,16	0,84
entre doses	4	15,84	3,96	0,64
resíduo	16	97,76	6,11	

4 - Número de reabsorções fetais

Nos animais controle não foram observados pontos de reabsorção fetal em nenhum dos grupos estudados (Tabela 4).

Observa-se (Tabela 4 e Tabela 4-A) que as ratas tratadas com 5-fluoruracil nos 9º, 10º, 11º e 12º dias de gestação apresentaram um aumento quanto ao número de reabsorções fetais em relação aos grupos controle, com as doses de 30 e 40 mg/kg.

No 13º dia entretanto, o número de reabsorções fetais, embora elevado com as doses de 20, 30 e 40 mg/kg de 5-fluoruracil, não foi significativo à análise estatística, em relação ao controle.

Tabela 4 - Número de reabsorções fetais de ratos tratados com solução fisiológica (0) e com 5-fluoruracil (5-FU) nas doses de 10, 20, 30, e 40 mg/kg aos 9^o, 10^o, 11^o, 12^o ou 13^o dias de gestação.

Tempo de gestação doses (mg/kg)	9 ^o dia	10 ^o dia	11 ^o dia	12 ^o dia	13 ^o dia
0	0	0	0	0	0
10	2	1	0	0	3
20	10	2	23	4	10
30	32	58	53	41	15
40	62	49	50	35	19

Cada valor na tabela corresponde à 5 ratas.

Tabela 4-A - Análise de Variância relativa ao número de reabsorções uterinas de ratos em relação aos dias de administração de 5-fluoruracil nas doses de 10, 20, 30 e 40 mg/kg (nível de significância 5%)

9º dia

Fonte de variação	GL	SQ	QM	"F"
total	24	792,56		
entre ratos	4	58,96	14,74	1,25
entre doses	4	544,96	136,24	11,55
resíduo	16	188,64	11,79	

10º dia

Fonte de variação	GL	SQ	QM	"F"
total	24	878		
entre ratos	4	74	18,50	2,21
entre doses	4	670	167,50	20,01
resíduo	16	134	8,37	

11º dia

Fonte de variação	GL	SQ	QM	"F"
total	24	972,96		
entre ratos	4	5,36	1,34	0,05
entre doses	4	532,56	133,14	4,89
resíduo	16	435,04	27,19	

12º dia

Fonte de variação	GL	SQ	QM	"F"
total	24	622,00		
entre ratos	4	14,00	3,50	0,20
entre doses	4	328,40	82,10	4,70
resíduo	16	279,60	17,47	

13º dia

Fonte de variação	GL	SQ	QM	"F"
total	24	188,64		
entre ratos	4	41,84	10,46	1,74
entre doses	4	50,64	12,66	2,10
resíduo	16	96,16	6,01	

5 - Número de recém-nascidos vivos por ninhada

Os dados apresentados nas Tabelas 5, 5-A e Figura 2 mostram que os animais controle e os tratados com o 5-fluoruracil nas doses de 10 e 20 mg/kg nos vários dias da gestação apresentaram número variável de recém-nascidos vivos, sendo que o número não diferiu significativamente entre controles e tratados.

Os animais que receberam 30 e 40 mg/kg de 5-fluoruracil apresentaram redução significativa do número de recém-nascidos vivos nos vários dias de tratamento, com relação aos controles, sendo que em muitos casos não houve formação do embrião. Com a dose de 30 mg/kg, ocorreu o nascimento de número apreciável de filhotes vivos, quando a droga foi administrada ao 12^o e 13^o dias de gestação.

Tabela 5 - Número total de recém-nascidos vivos de ratas prenhes tratadas com solução fisiológica (0) e 5-fluoruracil nas doses de 10, 20, 30 e 40 mg/kg aos 9^o, 10^o, 11^o, 12^o ou 13^o dias de gestação.

Tempo de gestação doses (Mg/kg)	9 ^o dia	10 ^o dia	11 ^o dia	12 ^o dia	13 ^o dia
0	56 (11,2±1,7)	53 (10,6±3,3)	63 (12,6±1,8)	48 (9,6±2,2)	47 (9,4±2,1)
10	62 (12,4±2,0)	38 (7,6±6,4)	49 (9,8±5,0)	39 (7,8±6,0)	54 (10,8±2,8)
20	39 (7,8±4,0)	54 (10,8±3,1)	22 (4,4±5,4)	27 (5,4±5,0)	39 (7,8±4,8)
30	0	6 (1,2±2,4)	0	19 (3,8±3,2)	25 (5,0±5,4)
40	0	3 (0,6±1,2)	0	0	0

Números entre parênteses indicam a média ± desvio padrão por grupo.
Cada valor na tabela corresponde à 5 ratas.

Tabela S-A - Análise de Variância relativa ao número de recém-nascidos vivos de ratas em relação aos dias de administração de 5-fluoruracil nas doses de 10, 20, 30 e 40 mg/kg (nível de significância 5%)

9º dia

Fonte de variação	GL	SQ	QM	"F"
total	24	829,04		
entre ratos	4	28,64	7,16	1,33
entre doses	4	714,24	178,56	33,18
resíduo	16	86,16	5,38	

10º dia

Fonte de variação	GL	SQ	QM	"F"
total	24	837,36		
entre ratos	4	76,56	19,14	1,14
entre doses	4	494,16	123,54	7,41
resíduo	16	266,64	16,66	

11º dia

Fonte de variação	GL	SQ	QM	"F"
total	24	939,76		
entre ratos	4	64,16	16,04	1,15
entre doses	4	652,56	163,14	11,70
resíduo	16	223,04	13,94	

12º dia

Fonte de variação	GL	SQ	QM	"F"
total	24	657,44		
entre ratos	4	50,24	12,56	0,60
entre doses	4	275,44	68,86	3,32
resíduo	16	331,76	20,73	

13º dia

Fonte de variação	GL	SQ	QM	"F"
total	24	686,00		
entre ratos	4	70,80	17,70	1,13
entre doses	4	365,20	91,30	5,84
resíduo	16	250,00	15,62	

6- Número de fetos mortos ao termo da gestação (natimortos)

A Tabela 6 nos mostra que as ratas pertencentes ao grupo controle não apresentaram fetos mortos ao termo da gestação.

Os animais dos grupos tratados com 10 ou 20 mg/kg de 5-fluoruracil ao 9º dia de gestação apresentaram um total de 5 fetos mortos; com a dose de 20 mg/kg, 7 natimortos foram observados quando as ratas foram tratadas aos 12º ou 13º dias de gestação. Para as ratas tratadas no 10º e 11º dia com qualquer uma das duas doses, não se verificou a presença de fetos mortos.

Com as doses de 30 e 40 mg/kg de 5-fluoruracil para as ratas tratadas no 12º e 13º dia de prenhez, observou-se um total de 54 natimortos, sendo que 49 destes, nas ninhadas de ratas tratadas com o antimitótico ao 13º dia de gestação. (Tabela 6 e Tabela 6-A).

Tabela 6 - Número total de fetos mortos, verificados ao termo da gestação, de ratas tratadas com solução fisiológica (0) e com 5 fluoruracil (5-FU) nas doses de 10, 20, 30, e 40 mg/kg aos 9^o, 10^o, 11^o, 12^o ou 13^o dias de gestação.

Tempo de gestação doses (mg/kg)	9 ^o dia	10 ^o dia	11 ^o dia	12 ^o dia	13 ^o dia
0	0	0	0	0	0
10	2	0	0	0	0
20	3	0	0	6	1
30	0	0	0	4	17
40	0	0	0	1	32

Tabela 6-A - Análise de variância relativa ao número de fetos mortos de ratos em relação aos dias de administração de 5-fluoruracil nas doses de 10, 20, 30 e 40 mg/kg (nível de significância 5%)

9º				
Fonte de variação	GL	SQ	QM	"F"
total	24	8,00		
entre ratos	4	0,80	0,20	0,57
entre doses	4	1,60	0,40	1,00
resíduo	16	5,60	0,35	
12º dia				
Fonte de variação	GL	SQ	QM	"F"
total	24	24,16		
entre ratos	4	6,56	1,64	2,21
entre doses	4	5,76	1,44	1,94
resíduo	16	11,84	0,74	
13º dia				
Fonte de variação	GL	SQ	QM	"F"
total	24	292,00		
entre ratos	4	10,00	2,50	0,33
entre doses	4	162,80	40,70	5,46
resíduo	16	119,20	7,45	

7 - Peso médio dos recém-nascidos

O peso médio dos recém-nascidos vivos, tanto dos animais do grupo controle como dos grupos tratados com o 5-fluoruracil nas doses de 10, 20, 30 e 40 mg/kg aos 9º, 10º, 11º, 12º ou 13º dias de gestação, não mostrou variação siginificativa.

8 - Alterações macroscópicas nos fetos

A análise macroscópica foi feita sob lupa de pequeno aumento analisando-se quanto a: implantação de orelhas, olhos, conformação craniana, palato, desenvolvimento dos membros inferiores e superiores e região caudal.

8.1 - Filhotes de mães tratadas ao 9º dia da prenhez

Nos animais tratados no 9º dia de prenhez pode-se verificar que dos 56 fetos do grupo controle, nenhum apresentou anormalidades no seu desenvolvimento. Nos 62 fetos cujas mães foram tratadas com o 5-fluoruracil na dose de 10 mg/kg foram encontradas 13 malformados (21%). Dos 13 fetos, 10 apresentaram fenda labial, 10 exencefalia e 3 tinham pontos hemorrágicos na região craniana (Tabela 7).

Nas mães tratadas no 9º dia com a dose de 20 mg/kg de 5-fluoruracil foram encontrados 20% dos fetos com malformações. Desses fetos, 6 apresentaram fenda labial e 5 exencefalia (Tabela 7).

Quanto às ratas tratadas ao 9º dia com as doses de 30 e 40 mg/kg, sempre ocorreram reabsorções fetais, ficando prejudicadas, portanto, a observação de malformações.

8.2 - Filhotes de mães tratadas ao 10º e 11º dias de prenhez

Os recém-nascidos das ratas tratadas durante o 10º e 11º dia de prenhez, tanto do grupo controle, como naquelas que receberam o 5-fluoruracil nas doses de 10, 20 ou 30 mg/kg não apresentaram malformações externas, nem anomalias do germe dentário. Nas fêmeas tratadas ao 11º dia, com as doses de 30 e 40 mg/kg, houve reabsorção total dos fetos.

8.3 - Filhotes de mães tratadas ao 12º dia de prenhez

Os recém-nascidos das ratas tratadas durante o 12º dia de prenhez com a dose de 10 mg/kg não apresentaram malformações externas ou alterações do germe dentário.

No grupo de fetos cujas mães foram tratadas no 12º dia de prenhez com as doses de 20 e 30 mg/kg foram verificadas malformações diversas. Dos 27 fetos oriundos de mães tratadas com a dose de 20 mg/kg, 6 (22%) apresentaram malformações externas. Entre os que apresentaram anomalias, 4 tiveram crescimento reduzido, 6 edema difuso, 6 ausência dos membros inferiores e superiores (Tabela 8).

Dos 19 fetos oriundos de mães tratadas com a dose de 30 mg/kg, 9 (47%) apresentaram malformações externas, sendo 5 com ausência dos membros, 2 sem dedos e 2 com ausência da cauda (Tabela 8).

Quanto às ratas tratadas com 40 mg/kg, a quase totalidade dos filhotes foram reabsorvidos na fase embrionária, ficando obviamente prejudicadas observações quanto à malformações.

8.4 - Filhotes de mães tratadas ao 13^a dia de prenhez

Tanto os fetos de ratas controle quanto os fetos de ratas tratadas com o 5-fluoruracil nas doses de 10 e 20 mg/kg não apresentaram malformações externas.

Quanto aos fetos oriundos de mães tratadas com 30 mg/kg de 5-fluoruracil, foram encontradas em 72% malformações externas. Dos 25 fetos estudados, oriundos de 2 ninhadas (40%), 18 apresentaram menor peso corpóreo e 9 tinham edema difuso e somente os brotos correspondentes aos membros (Tabela 9).

Nas ratas que receberam 40 mg/kg de 5-fluoruracil, ocorreu reabsorção e morte fetal dos embriões implantados, não sendo no entanto possível a observação dos fetos.

9 - Análise microscópica dos germes dentários dos fetos de ratas

Na histomorfologia foram observados os germes dentários de fetos de ratas quanto: às células da polpa, presença ou não de processo inflamatório, o tecido ósseo e o próprio germe dentário.

Os germes dentários, de fetos cujas mães foram tratadas com solução NaCl-0,9% (grupo controle), nos vários dias da gestação, apresentaram morfologia segundo Farris, (1971) denominada fase de "campânula" (Figura 3, 4 e 5).

As células formadoras do dente apresentaram-se em paliçada, formando duas camadas contíguas, uma de odontoblastos e uma de ameloblastos. Pode-se verificar a cavidade pulpar preenchida por tecido conjuntivo frouxo. Nesta fase observou-se ainda uma aposição de estreita camada de dentina e uma semelhante e contínua camada de esmalte, na região labial do dente tanto dos incisivos superiores como dos inferiores. Na região lingual ocorria apenas aposição de dentina, não havendo portanto a camada de ameloblastos.

Na camada de dentina, que circunda a polpa, foi observada uma nítida faixa de tecido, mais clara que a mesma, na região contígua à polpa e correspondendo à pré-dentina.

Por ser um dente de crescimento contínuo, na região mais apical, verifica-se apenas as células precursoras dos ameloblastos e dos odontoblastos, assim como uma porção de células germinativas na região da polpa. Além dessas estruturas verificou-se no espaço periodontal uma massa de tecido conjuntivo frouxo com presença de fibras colágenas direcionadas lembrando o ligamento periodontal.

Ao redor do germe dentário pode-se observar a presença de osso alveolar, com trabéculas uniformes e regulares, separadas umas das outras por tecido conjuntivo frouxo, sendo que apenas o quarto mais incisal do dente não era circundado por este tecido.

Dos 20 fetos estudados oriundos de mães tratadas com o 5-fluoruracil no 9º dia de gestação com a dose de 10 mg/kg (Figura 6) observou-se apenas três germes dentários com malformações (15%), sendo estes distribuídos em ratos de duas ninhadas (40%). Dois deles, apresentaram alterações moderadas, ou seja, tinham os núcleos das células da polpa mais arredondados e hipercromáticos. No terceiro feto, foi

evidenciado um processo inflamatório associado à presença do germe dentário. As células ameloblásticas eram arredondadas e a camada de odontoblastos não foi observada (Figura 7). No local do tecido pulpar foi verificado uma massa de células pequenas, arredondadas e mononucleares lembrando linfócitos.

Nas áreas adjacentes ao germe havia apenas escassas trabéculas de tecido ósseo com um infiltrado de plasmócitos.

Dentre os 16 filhotes de mães tratadas com 5-fluoruracil ao 9º dia de gestação na dose de 20 mg/kg, três (18,7%) apresentaram anomalias no germe dentário, sendo estes de duas ninhadas (40%). Pela tabela 7 pode-se verificar que dois deles apresentaram aplasia do germe dentário, ocorrendo no local apenas um esboço do mesmo (Figura 8).

No terceiro feto além da agenesia ou aplasia do germe dentário, foi verificado também uma fenda no rebordo ósseo.

Para os animais que receberam a dose de 30 e 40 mg/kg de 5-fluoruracil não pode-se verificar alteração do germe dentário por não termos fetos vivos para analisarmos os germes dos mesmos (Tabela 5).

Os recém-nascidos cujas mães receberam o antineoplásico no 10º dia de prenhez, nas doses de 10, 20, 30 e 40 mg/kg não apresentaram quaisquer anomalias nos seus respectivos germes dentários, onde seus germes estavam com todas as camadas celulares semelhantes aos fetos dos animais controle (Figura 9). Tal estado de normalidade ocorreu também nos fetos oriundos de mães injetadas ao 11º dia com 10 ou 20 mg/kg. Com as doses de 30 ou 40 mg/kg, houve reabsorção total dos fetos.

No grupo de fetos, cujas mães foram tratadas no 12º dia de prenhez, somente se observou fetos com anomalias do germe dentário com dose de 20 e 30 mg/kg (Tabela 8). Dos 15 fetos estudados com a dose de 20 mg/kg, quatro (26%) apresentaram agenesia do germe dentário. Em alguns casos havia apenas o esboço do germe, no local onde este deveria estar presente, apresentando somente um tecido gelatinoso no local. Na polpa era bastante evidente a presença de células inflamatórias mononucleares como os linfócitos (Figura 10 e 11).

Dos 14 fetos estudados com a dose de 30 mg/kg, três (21,4%) também apresentaram agenesia do germe dentário, como com a dose de 20 mg/kg (Figura 12).

Os fetos cujas mães receberam o 5-fluoruracil no 13º dia de gestação, nas doses de 10, 20 e 40 mg/kg não apresentaram quaisquer anomalias nos seus respectivos germes dentários.

Somente foram encontradas alterações do germe dentário em fetos tratados no 13º dia com a dose de 30 mg/kg de 5-fluoruracil. Dos fetos analisados com essa dose, 20% apresentaram agenesia do germe, além do tecido ósseo aparecer com um infiltrado de tecido cartilaginoso (Tabela 9 e Figura 13).

Os resultados referentes as malformações externas e do germe dentario estão resumidas na Tabela 10.

Tabela 7 - Incidência de anomalias do germe dentário e malformações externas de fetos de ratas tratadas com 5-fluoruracil nas doses de 10 e 20 mg/kg ao 9º dia de gestação.

ANOMALIAS DO GERME DENTÁRIO

	CONTROLE 0	TRATADOS COM 5-FU 10mg/kg	20mg/kg
Nº de fetos afetados/nº de fetos examinados	0/15	3/20 (15%)	3/16 (19%)
Nº de ninhadas afetadas/nº de ninhadas examinadas	0/5	2/5 (40%)	2/5 (40%)

TIPOS DE ANOMALIAS

células da polpa com núcleo arredondado, hipercromático	0	2	0
processo inflamatório	0	1	0
pequena quantidade de tecido ósseo	0	1	0
ausência germe dentário	0	0	2
fenda de rebordo	0	1	1

MALFORMAÇÕES EXTERNAS

Nº de fetos afetados/nº de fetos examinados	0/56	13/62 (21%)	8/39 (20%)
Nº de ninhadas afetadas/nº de ninhadas examinadas	0/5	2/5 (40%)	1/5 (20%)
Nº total de malformações	0	13	8

Tabela 8 - Incidência de anomalias do germe dentário e malformações externas de fetos de ratas tratadas com 5-fluoruracil nas doses de 20 e 30 mg/kg ao 12º dia de gestação.

ANOMALIAS DO GERME DENTÁRIO

	CONTROLE 0	TRATADOS COM 5-FU 20mg/kg	30mg/kg
Nº de fetos afetados/nº de fetos examinados	0/15	4/15 (26%)	3/14 (21,4%)
Nº de ninhadas afetadas/nº ninhadas examinadas	0/5	2/5 (40%)	3/5 (60%)

TIPOS DE ANOMALIAS OBSERVADAS

células da polpa com núcleo arredondado, hipercromático	0	2	0
processo inflamatório	0	2	0
pequena quantidade de tecido ósseo	0	0	0
ausência germe dentário	0	4	3
fenda rebordo	0	0	0

MALFORMAÇÕES EXTERNAS

Nº de fetos afetados/nº de fetos examinados	0/48	6/27 (22%)	9/19 (47%)
Nº de ninhadas afetadas/nº ninhadas examinadas	0/5	2/5 (40%)	2/5 (40%)
Nº total de malformações	0	6	9

Tabela 9 - Incidência de anomalias do germe dentário e malformações externas de fetos de ratas tratadas com 5-fluoruracil na dose de 30 mg/kg ao 13^o dia de gestação.

ANOMALIAS DO GERME DENTÁRIO

	CONTROLE	TRATADOS COM 5-FU
	0	30mg/kg
Nº de fetos afetados/nº de fetos examinados	0/15	2/10
Nº de ninhadas afetadas/nº de ninhadas examinadas	0/5	1/5 (20%)

TIPOS DE ANOMALIAS OBSERVADAS

células da polpa com núcleo arredondado, hipercromático	0	0
processo inflamatório	0	0
pequena quantidade de tecido ósseo	0	2
ausência germe dentário	0	2
fenda de rebordo	0	0

MALFORMAÇÕES EXTERNAS

Nº de fetos afetados/nº de fetos examinados	0/47	18/25 (72%)
Nº de ninhadas afetadas/nº de ninhadas examinadas	0/5	4/5 (80%)
número total de malformações	0	18

Tabela 10 - Quadro geral das alterações macroscópicas e do germe dentário de fetos de ratos, cujas mães foram tratadas com 5-fluoruracil (5-FU) nas doses de 10, 20, 30 ou 40 mg/kg nos 9º, 10º, 11º, 12º ou 13º dias de gestação.

dia de gestação	dose 5-FU	alterações morfológicas (macroscópicas)	germe dentário
9º	10	21% malformações	15% anomalias
	20	20% malformações	19% anomalias
	30	reabsorção total	prejudicado
	40	reabsorção total	prejudicado
10º	10	sem malformações	sem anomalias
	20	sem malformações	sem anomalias
	30	sem malformações	sem anomalias
	40	94,2% reabsorções e 3 fetos vivos normais	sem anomalias
11º	10	sem malformações	sem anomalias
	20	sem malformações	sem anomalias
	30	reabsorção total	prejudicado
	40	reabsorção total	prejudicado
12º	10	sem malformações	sem anomalias
	20	22% malformações	26% agenesia do germe
	30	47% malformações	21% agenesia do germe
	40	97% reabsorções e 1 feto morto	prejudicado
13º	10	sem malformações	sem anomalias
	20	sem malformações	sem anomalias
	30	72% malformações	20% agenesia do germe
	40	37% reabsorções e 63% fetos mortos	prejudicado

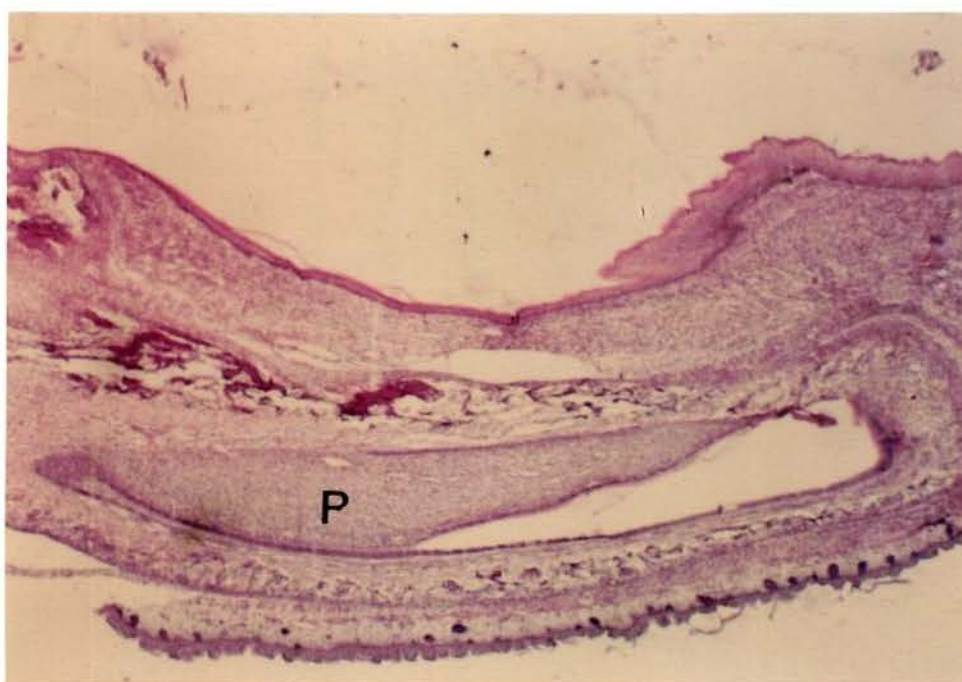


Figura 3 - Microfotografia do incisivo central inferior, corte longitudinal, de feto oriundo de ratas do grupo controle. Germe dentário em condições normais de desenvolvimento. P - polpa dentária; Aumento 32X.

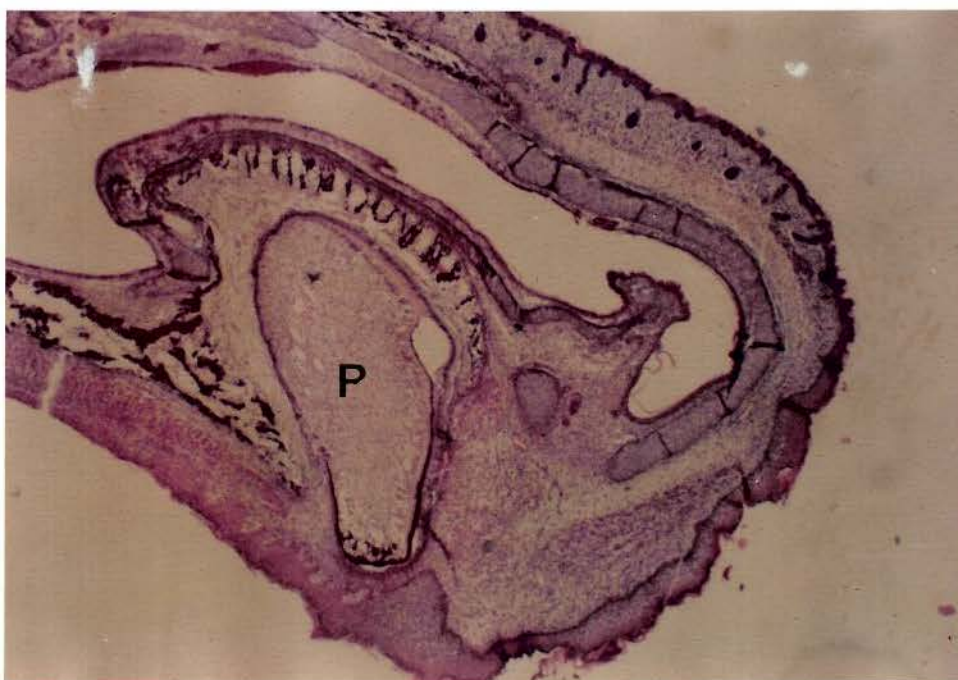


Figura 4 - Microfotografia do incisivo central superior, corte longitudinal, de feto oriundo de ratas do grupo controle. Germe dentário em condições normais de desenvolvimento. P - polpa. Aumento 32x.

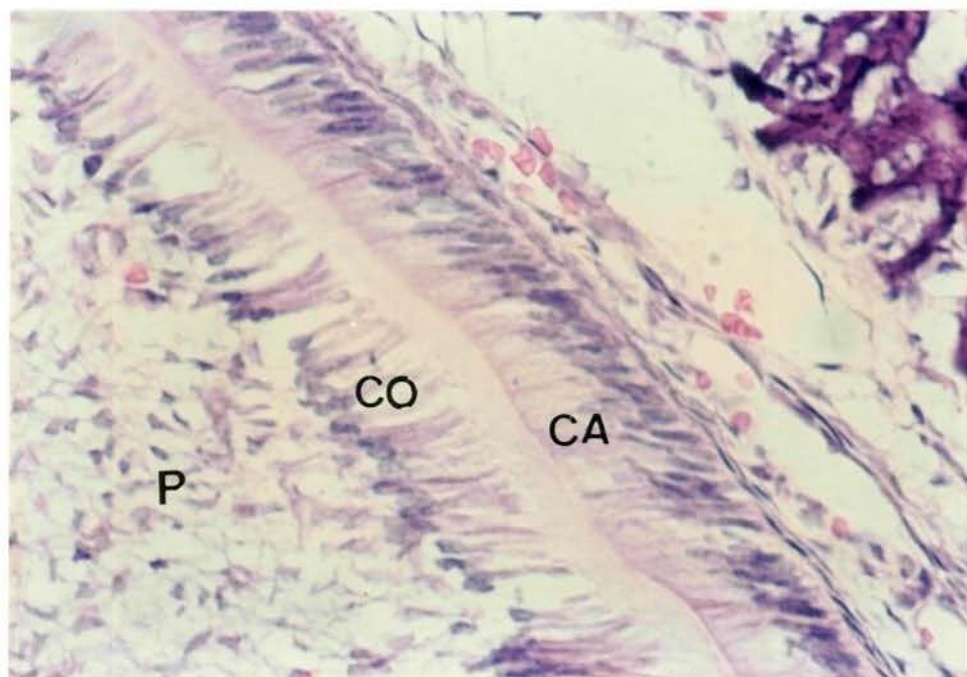


Figura 5 - Microfotografia do incisivo central inferior, corte longitudinal, de feto oriundo de ratas do grupo controle. Camada de odontoblastos (CO) e ameloblastos (CA); P - polpa dentária. Aumento de 200X.



Figura 6 - Microfotografia do incisivo central superior, corte longitudinal, de feto oriundo de rata tratada com 5-fluoruracil ao 9º dia de gestação, na dose de 10 mg/kg. Germe com características de normalidade (entre as setas). P - polpa dentária. Aumento 100X.

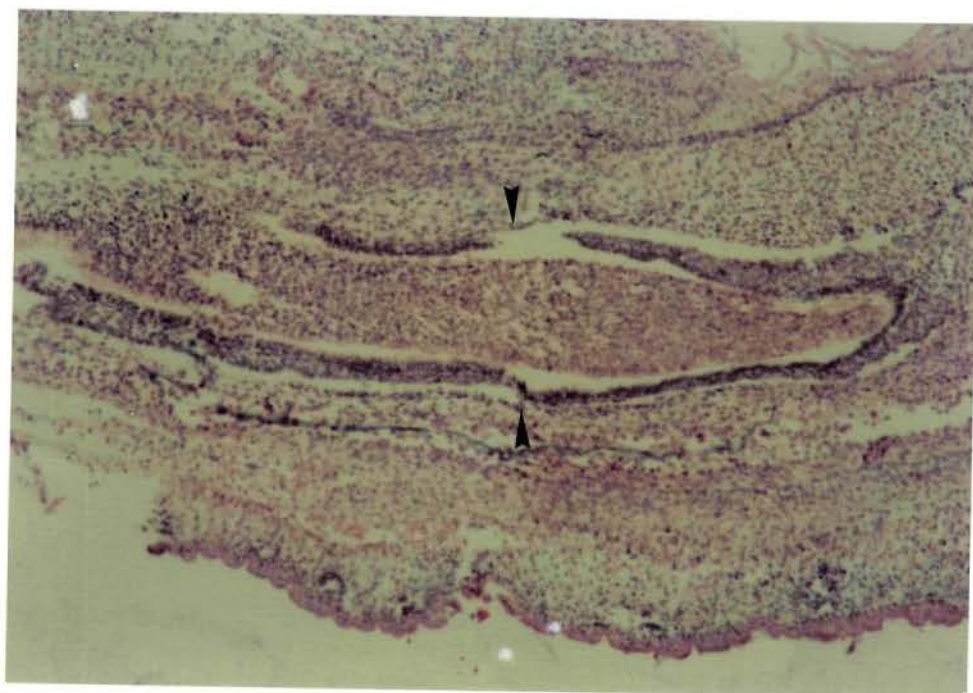


Figura 7 - Microfotografia do incisivo central inferior, corte longitudinal, de feto oriundo de rata tratada com 5-fluoruracil ao 9º dia de gestação, na dose de 10 mg/kg. Germe dentário anormal (entre setas), não ocorrendo a formação dos tecidos dentários e suas células não são semelhantes ao controle. (Figuras 3, 4 e 5). Aumento 100x.

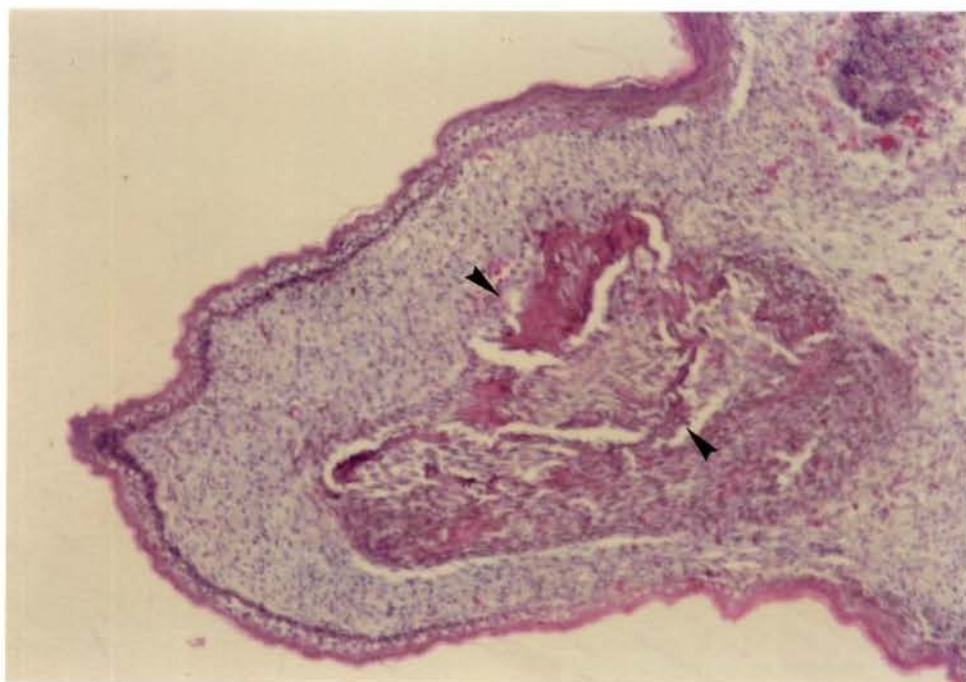


Figura 8 - Microfotografia da área onde estaria o germe dentário do incisivo central superior (agenesia, entre as setas). Corte longitudinal de feto oriundo de rata tratada com 5-fluoruracil ao 9º dia de gestação, na dose de 20 mg/kg. Aumento 100X.

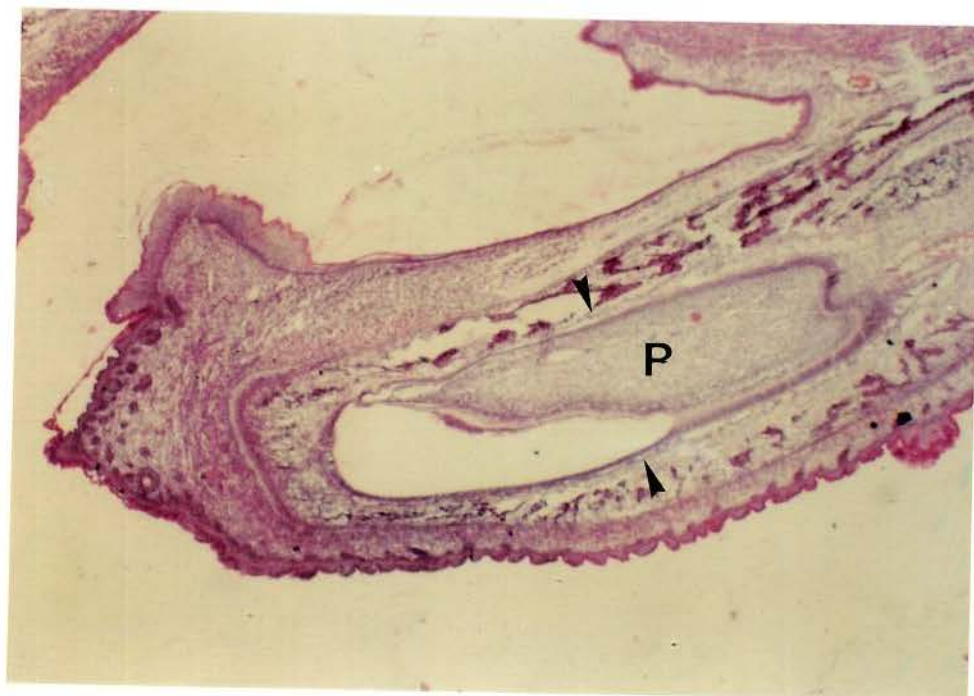


Figura 9 - Microfotografia do incisivo central inferior (entre as setas), corte longitudinal, de feto oriundo de rata tratada com 5-fluoruracil ao 10º dia de gestação, na dose de 10 mg/kg. Germe dentário com características de normalidade. P - polpa dentária. Aumento 32x.

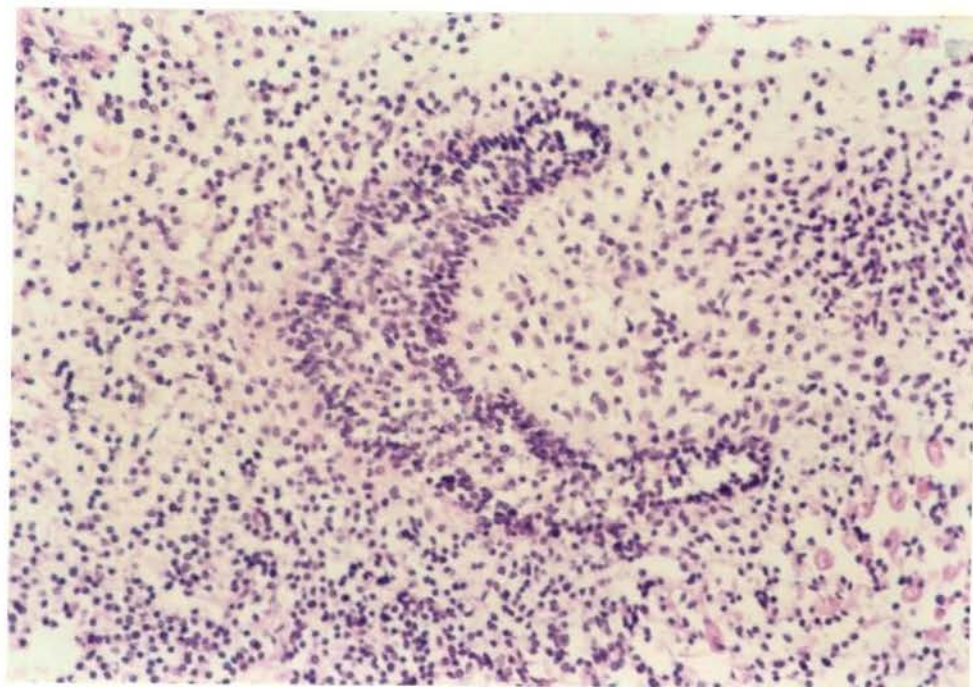


Figura 10 - Microfotografia de um corte longitudinal da região de um incisivo central inferior, de feto oriundo de rata tratada com 5-fluoruracil ao 12º dia de gestação, na dose de 20 mg/kg. Aplasia do germe dentário. (Aumento 200X).

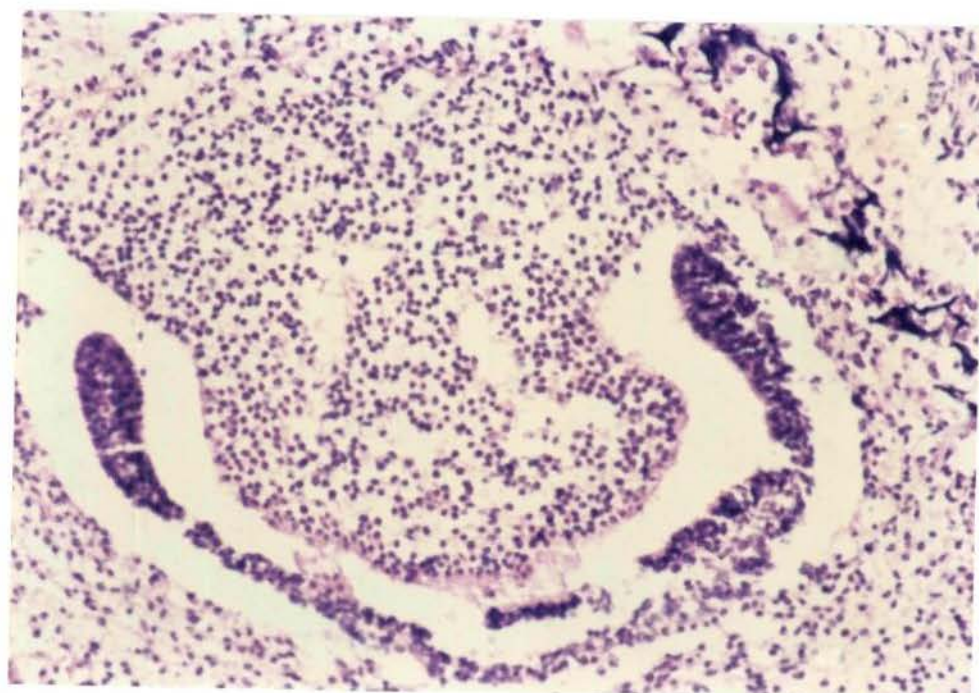


Figura 11 - Microfotografia de um corte longitudinal da região superior, de feto oriundo de rata tratada com 5-fluoruracil ao 12º dia de gestação, na dose de 20 mg/kg. Aplasia do germe dentário . Aumento 200X.

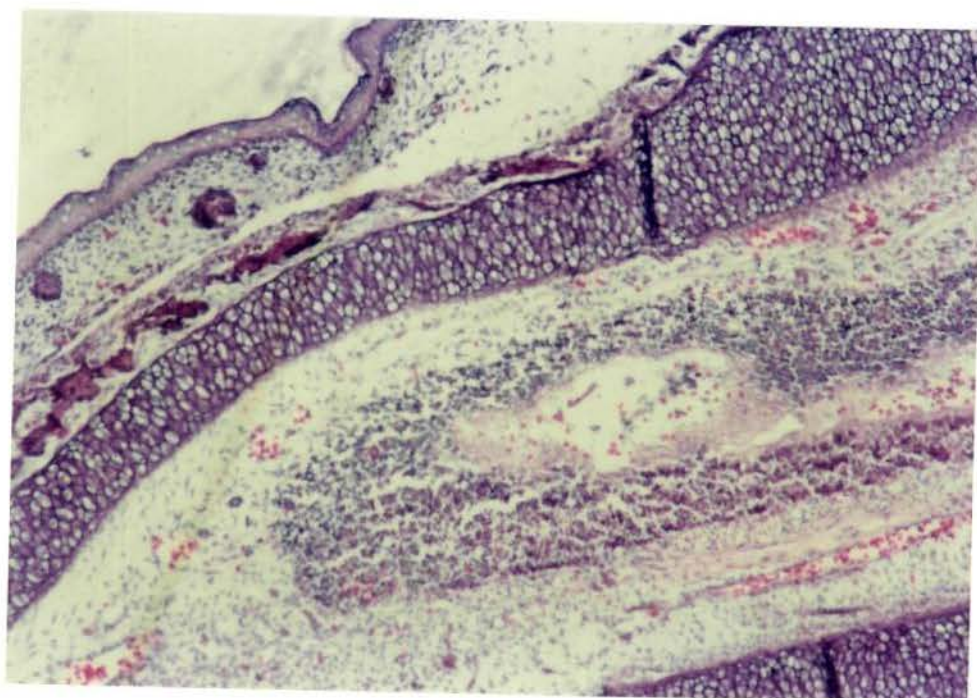


Figura 12 - Microfotografia de um corte longitudinal da região de um incisivo superior, de feto oriundo de rata tratada com 5-fluoruracil ao 12º dia de gestação, na dose de 30 mg/kg. Aplasia do germe dentário . Aumento 100X.

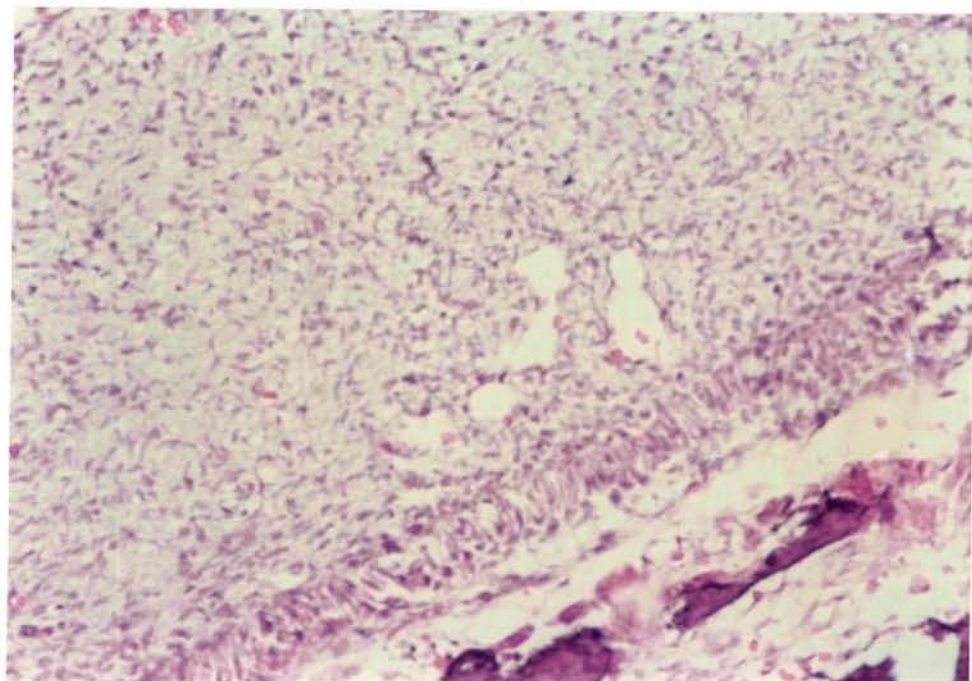


Figura 13 - Microfotografia de um corte longitudinal da região de um incisivo central inferior, de feto oriundo de rata tratada com 5-fluoruracil ao 13º dia de gestação, na dose de 30 mg/kg. Aplasia do germe dentário. (Aumento 200X).

4 - DISCUSSÃO

É bem conhecido que muitas substâncias administradas a gestantes em determinados períodos de prenhez podem causar distúrbios do desenvolvimento embrionário, no homem e em várias espécies animais. Conforme o período e doses utilizadas, causam lesões incompatíveis com a sobrevivência do conceito, resultando em reabsorção precoce do embrião, aborto espontâneo ou natimorto de termo. Pode resultar ainda em indivíduos portadores de malformações compatíveis com a sobrevivência, as quais podem ser de natureza morfológica ou funcional. Observam-se ocasionalmente retardo do desenvolvimento do embrião ou de órgãos específicos, com possibilidade de recuperação após o nascimento, resultando adultos normais. Certas drogas, na dependência de dose e de frequência de administração causam danos também ao organismo materno, com repercussões sobre o embrião.

Os antimitóticos constituem-se em drogas particularmente tóxicas tanto para organismos adultos como para aqueles em formação (Goodman e Gilman's, 1990).

No esquema experimental do presente trabalho optou-se por administrar doses únicas de 5-fluoruracil para cada rata, em dias determinados de prenhez (Dagg, 1960). As mães não apresentaram os efeitos colaterais associados ao antimitótico, como sejam diarreia, queda de pêlo, lesões de mucosa etc., mesmo quando receberam as doses altamente

embriotóxicas de 30 e 40 mg/kg. O ganho de peso foi quase sempre normal, comparando-se aos animais controle. Somente aquelas tratadas com as doses acima referidas, aos 9º, 10º, 11º e 12º dias de gestação, apresentaram menor ganho de peso, possivelmente em decorrência do elevado número de reabsorções embrionárias. Nestas ratas o número de filhotes vivos foi muito reduzido, indicando grande embriotoxicidade do 5-fluoruracil, naquelas doses e naqueles períodos de gestação.

A escolha dos tempos de gestação para a administração do antimitótico (9º ao 13º dias) se deu por estarem estes dias incluídos no período organogenético importante para a formação das estruturas da cabeça, e portanto, época favorável à demonstração de malformações nessa área (Dagg, 1960; Nishimura e Tanimura, 1976; Farris e Griffith, 1971).

Segundo o referido por Dagg (1960) o 9º dia de gestação em ratas é o de maior sensibilidade para estruturas oculares e, em coerência, no presente trabalho foi o dia em que o 5-fluoruracil causou número mais elevado de malformações, com as doses de 10 e 20 mg/kg e reabsorção total dos embriões com as doses de 30 e 40 mg/kg. As malformações externas foram frequentemente e em paralelo, acompanhadas de anomalias do germe dentário. O elevado

ro de reabsorções fetais é coerente com os dados obtidos r Shah e Mackay (1978) com hamsters.

Quando a droga foi administrada ao 10º dia de gestação, observou-se, diferentemente, menor sensibilidade fetal com as doses de 10, 20 e 30 mg/kg de 5-fluoruracil, os filhotes resultantes não apresentaram malformações externas nem anomalias do germe dentário; com a dose de 40 mg/kg, mesmo havendo reabsorção de 94,2% dos embriões, aqueles que nasceram, apresentaram-se normais.

Resultados comparáveis foram obtidos quando o antimitótico foi administrado ao 11º dia. Neste caso, não se observaram malformações externas ou alterações do germe dentário em nenhum dos animais nascidos ao termo da gestação. Com as doses de 30 e 40 mg/kg não ocorreram nascimentos, sendo todos os fetos reabsorvidos.

Já para a droga administrada às mães ao 12º dia de gestação, constatou-se maior sensibilidade fetal às doses de 20 e 30 mg/kg, quando se observaram respectivamente 22 e 47% de malformações externas. Em consonância, observou-se agenesia do germe dentário em elevada porcentagem desses filhotes. A dose de 40 mg/kg foi altamente embriotóxica, não permitindo o nascimento de animais vivos. O 12º dia é o que precede o pico de sensibilidade para fechamento do palato, o

oderia, de alguma maneira, correlacionar-se com os resultados obtidos (Nishimura e Tanimura, 1976).

Quando o antimitótico foi administrado às mães no 13º dia, dia de pico de sensibilidade para fechamento do palato, somente a dose de 30 mg/kg induziu a fetos malformados (72%) e com agenesia do germe dentário (20%). Aqueles nascidos do tratamento com 10 e 20 mg/kg apresentaram-se normais. Foi menor a sensibilidade à dose de 40 mg/kg uma vez que 62,7% dos fetos evoluíram, embora nascendo mortos, ocorrendo somente 37,2% de reabsorções.

À luz dos conhecimentos embriológicos disponíveis, é difícil explicar os fenômenos compulsados, porém pode-se generalizar que a maior sensibilidade embrionária ao 5-fluoruracil ocorreu ao 9º dia de prenhez, única época em que a dose de 10 mg/kg acarretou malformações externas e anomalias do germe dentário. Menor sensibilidade embrionária se observa ao 13º dia de prenhez, uma vez que a dose de 40 mg/kg, que sempre acarretou alto índice de reabsorção fetal, permitiu que 62,7% dos embriões evoluíssem, embora nascendo mortos. Baixo índice de sensibilidade foi constatado quando o antimitótico foi administrado ao 10º e 11º dias de gestação, quando nenhuma das doses causou malformações ou problemas de germe dentário nos animais que nasceram de termo. Pode-se observar que a sensibilidade fetal variou conforme o estágio de evolução

embrionário, sendo estes mais sensíveis nos estágios mais precoces.

Observam-se que nos grupos em que ocorreram malformações, sempre houve anomalias do germe dentário, às vezes em proporções comparáveis e em outras ocasiões, em proporções díspares, tornando difícil generalizar-se uma correlação.

Os presentes resultados sugerem novas experiências no sentido de estudar-se a evolução da dentição de filhotes de mães tratadas com o 5-fluoruracil após o nascimento, com a droga administrada nos mesmos períodos de gestação escolhidos para o presente trabalho, bem como estudar-se os efeitos do antimitótico quando administrado à mães em períodos mais precoces.

5 - CONCLUSÕES

1 - O 5-fluoruracil, administrado a ratas prenhes, interfiriu no desenvolvimento normal dos fetos acarretando malformações externas e anomalias do germe dentário, na dependência do dia da gestação em que foi administrado e da dose utilizada.

2 - Os tipos de malformações observadas são relacionadas com a fase do desenvolvimento embrionário, na qual a droga foi administrada, observando-se maior sensibilidade ao 9º dia e menor sensibilidade ao 13º dia.

3 - Com relação ao germe dentário observou-se que na dependência da dose e do dia de gestação, ocorreu agenesia do órgão.

4 - Com as doses de 30 e 40 mg/kg de 5-fluoruracil observou-se um número muito elevado de reabsorção embrionária e morte fetal, mostrando que essas doses são altamente embriotóxicas.

6 - SUMMARY

Development of embryo born from 5-fluoruracil treated rats influence on dental germ formation.

It was studied in rats the influence of 5-fluoruracil on the formation of dental germ and external malformations of rats embryo born from treated mothers. 5-fluoruracil was administered intraperitoneally in single dose to each rat, that is 10, 20, 30 and 40 mg/kg in different phases of pregnancy: 9th, 10th, 11th, 12th or 13th days. The fetuses were examined at the 21st of day of pregnancy, after Caesarian operation. They were examined regarding to external malformations, the heads cut out of hystological examination of dental germ. The results were the following according the days of pregnancy the drug was administered:

a) 9th day: dose of 10 mg/kg caused respectively 21 and 20% of external malformations and 15 and 19% of anormal dental germ; all of the embryos were reabsorbed with doses of 30 and 40 mg/kg; 10th day: dose of 10, 20 and 30 mg/kg caused no malformations and dose of 40 mg/kg induced 94,2% of fetal reabsortion; 11th day: doses of 10 and 20 mg/kg caused no malformations while with those of 30 and 40 mg/kg total reabsortion of fetuses occurred; 12th day: only the dose of 10 mg/kg caused no abnormal fetuses; the doses of 20 and 30 mg/kg induced respectively 22 and 47% of malformations and 26-21% of dental germ agenesis; the dose of 40 mg/kg induced

97% of embryonic reabsorption; 13th day: doses of 10 and 20 mg/kg had no influence on fetuses; the one of 30 mg/kg caused 72% of malformations and 20% of dental agenesis; with the dose of 40 mg/kg 63% of the embryos were dead at the birth.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKASAWA, S., KUMAI, R., YOSHIDA, K., AYUSAWA, D., et al. The cytotoxicity of 5-fluorouracil is due to its incorporation into RNA and not is inhibition of thymidylate synthase as evidence by the use of a mouse cell mutant deficient in thymidylate synthase. Jpn.J.Cancer Res. v. 77, p. 620-624, 1986.

ARMSTRONG, R.D., LEWIS, M., STERN, S.G. et al. Acute effect of 5-fluorouracil on cytoplasmic and nuclear dihydrofolate reductase messenger RNA metabolism. J.Biol. Chem. v. 261, p. 7366-7371, 1986.

BASTOS-RAMOS, W.P., COELHO, M.J., COSTA, J.P. et al. Efeito do 5-fluoruracil sobre o crescimento de dentes de ratos. Resumos V Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental. p. 461, 1991.

BLATT, J., MULVIHILL, J.J., ZIEGLER, J.L., et al. Pregnancy outcome following cancer chemotherapy. Am.J.Med. v. 69, p. 828-832, 1980.

CALABRESI, P. PARKS, Jr., R.E. Quimioterapia das doenças neoplásicas. In GOODMAN, L.S., GILMAN, A.G., RALL, T.W. et al. As bases Farmacológicas da Terapêutica. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1987, p. 813-856.

- CHAUBE, S., MURPHY, M.L. The teratogenic effects of the recent drugs active in cancer chemotherapy. Adv.Teratol. v. 3, 181-237, 1968.
- DAGG, C.P. Sensitive stages for the production of developmental abnormalities in mice with 5-fluoruracil. Am.J.Anat. v. 106, p. 89-96, 1960.
- DAHL, J.E. - Immediate and delayed effects of repeated doxorubicin injections on rat incisor mesenchymal cells. Acta Odontol.Scand. v. 43, 155-162, 1985a.
- DAHL, J.E. Influence of doxorubicin on rat incisor mesenchymal cells. Scand.J.Dent.Res. v. 92, p. 6-13, 1984.
- DAHL, J.E. Proliferation and migration of rat incisor mesenchymal cells. Scand.J.Dent.Res. v. 91, p. 335-340, 1983.
- DAHL, J.E. Response of rat incisor mesenchymal cells to doxorubicin after bleomycin pretreatment. Acta Odontol.Scand. v. 43, p. 279-284, 1985b.

DAHL, J.E., KOPPANG, H.S. Renewal and migration of rat incisor mesenchymal cells after doxorubicin administration. Acta Odontol.Scand. 43: 97-102, 1985.

DE DEUS, Q.D., HAN, S.S. Modificações ultra-estruturais de fibroblastos da polpa dental após administração de 5-fluoruracil. Arq.Cent.Est.Cur.Odont. v. 13, p. 149-175, 1976.

DIAS COSTA, A.M. Estudos com a colchicina no crescimento de dentes de ratos. Piracicaba - UNICAMP, 1978. 70 p. Tese (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.

FARRIS, E.J., GRIFFITH, Jr.J.O. The rat in laboratory investigation. 2 ed. Philadelphia. J.B. Lippincott Company. New York, Hafner, 1971, p. 542.

FRANK, A.A., THOMPSON, D.J., KAZACOS, E.A. Teratogenicity of 3,3-Dimethyl-1-phenyltriazenes in the rat: gross malformations including micrognathism. Teratology, v. 39, 53-61, 1989.

FUKUDA, H. KOMAMINE, A. Relationship between tracheary element differentiation and DNA synthesis in single cells isolated from the Mesophyll of Zinnia elegans - Analysis by inhibitors of DNA synthesis. Plant & Cell Physiol. v. 22, p. 41-49, 1981.

GILILLAND, J., WEINSTEIN, L. The effects of cancer chemotherapeutic agents on the developing fetus. Obstr. Gynecol. Surv. v. 38, p. 6-13, 1983.

GOODMAN, L.S., GILMAN, E.D. The pharmacological Basis of Therapeutics 8. ed. New York: Pergamon Press, 1990, p. 1202-1263.

GRAFTON, T.F., BAZARE Jr., J.J., HANSEN, D.K., et al. The in vitro embriotoxicity of 5-fluoruracil in rat embryos. Teratology, v. 36, 371-377, 1987.

JUNQUEIRA, A.C.C. Drogas Antineoplásicas. In CORBETT, C.E. Farmacodinâmica. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1977, p. 652-684.

JUSKO, W.J. Pharmacodynamic principles in chemical teratology: dose-effect relationships. J. Pharmacol. Exp. Ther. v. 183, p. 469-480, 1972.

- KALANT, H., ROSCHLAU, W.H.E. Princípios de Farmacologia Médica. 5 ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991, p. 493-500.
- KOPPANG, H.S. Histomorphologia investigations on the effect of cyclophosphamide on dentinogenesis of the rat incisor. Scand.J.Dent.Res. v. 81, p. 383-396, 1973.
- KROMKA, M., HOAR, R.M. Use of guinea pigs in teratological investigations. Teratology. v. 7, p. A21-A22, 1973.
- KRUMBAHAAR, E.B., KRUMBAHAAR, H.D. The blood and bone marrow in yellow cross gas (mustard gas) poisoning: changes produced in the bone marrow of fatal cases. J.Med.Res. v. 40, p. 497-507, 1919.
- MASSINI, N. Estudo do crescimento dentário em ratos tratados com ciclofosfamida (Enduxan[®]). Piracicaba: UNICAMP, 1975. 35 p. Tese (Mestrado em Farmacologia). Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.
- MJOR, I.A., FEJERSKOW, O. Embriologia e Histologia Oral Humana. São Paulo: Editorial Médica Panamericana, 1990, p. 31-49.

MOORE, K.L. Pele, Anexos Cutâneos e Dentes. In: MOORE, K.L. Embriologia Básica. Rio de Janeiro: Interamericana Ltda, 1976, p. 229-235.

NAYA, M., MATAKI, Y., TAKAHIRA, R. et al. Effects of phorone and/or buthionine sulfoximine on teratogenicity of 5-fluorouracil in mice. Teratology. v. 40, p. 275-280, 1990.

NISHIMURA, H., TANIMURA, T. Clinical aspects of teratogenicity of drugs. Excerpta Médica, Amsterdam. Oxford, American. Elsevier Publishing Company. 1976, p. 99-270.

NOGUEIRA, T.O. Efeitos da colchicina na dentinogênese no incisivo superior de rato. Estudo radioantográfico. São Paulo: USP, 1984, 72 p. Tese (Doutorado em Clínicas Odontológicas - Área Patologia) Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo.

NORDLINDER, H. Malformations in newborn rats treated with a single dose of ciclofosfamida. Acta Soc. Med. Upsal. v. 26, 87-90, 1971.

RANALI, J. Influência da Ametopterina (Methotrexato[®]), sobre o crescimento dentário dos incisivos inferiores de ratos. Piracicaba: UNICAMP, 1976. 41 p. Tese (Mestrado em Farmacologia) Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.

SHAH, R.M., MACKAY, R.A. Teratological evaluation of 5-fluorouracil and 2-bomo-2-deoxyuridine on hamster fetuses. J.Embryol.Exp.Morph. v. 43, p. 47-54, 1978.

SHAH, R.M., WONG, D.T.W. Morphological study of cleft palate deveopmental in 5-fluorouracil - treated hamster fetuses. J.Embryol.Exp.Morph. v. 57, p. 119-128, 1980.

STADLER, H.E., KNOWLES, J. Fluorouracil in pregnancy: Effect on the neonate. JAMA, v. 217, p. 214-215, 1971.

STEPHENS, J.D., GOLBUS, M.S., MILLER, T.R., et al. Multiple congenital anomalies in a fetus exposed to 5-fluorouracil during the first trimester. Amer.J.Obstet.Gynecol. v. 137, p. 747-749, 1980.

TAKIMOTO, C.H., CADMAN, E.C. ARMSTRONG, R.D. Precursor-dependent differences in the incorporation of fluorouracil in RNA. Mol. Pharmacol. v. 29, 637-642, 1986.

THOMPSON, D.J., MOLELLO, J.A., STREBING, R.J. et al. Teratogenicity of adriamycin and Daunomycin in the rat and rabbit. Teratology. v. 17, p. 151-158, 1976.

TOBIAS, J.S., BLOOM, H.J.G. Doxorubicin in pregnancy. The Lancet, v. 5, p. 776, 1980.

VALERIOTE, F., SANTELLI, G. 5-fluorouracil (FUra). Pharmacol. Ther., v. 24, p. 107-132, 1984.

WILSON, J.G. Use of rhesus monkeys in teratological studies. Fed. Proc. v. 30, p. 104-109, 1971.