

ANA MARIA DUARTE DIAS COSTA

ESTUDOS COM A COLCHICINA
NO CRESCIMENTO DE DENTES
DE RATOS

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba - UNICAMP,
para obtenção do grau de Mestre
em Farmacologia Aplicada à Cli-
nica Odontológica.

PIRACICABA, 1978

Aos meus pais,
que me ensinaram a lutar
por ideais verdadeiramente dignos

Ao meu marido,
pelo apoio e afeto nos momentos difíceis

dedico este trabalho.

Ao Professor

Doutor JOÃO BATISTA PEREIRA BASTOS

ao qual devo a tranquilidade de
haver trilhado o caminho certo,
amparada que fui por seus exem-
plos de devotamento ao trabalho

A G R A D E C I M E N T O S

ã Dra. WILMA PEREIRA BASTOS RAMOS, pela orientação segura deste trabalho, bem como pelo interesse demonstrado ã minha formação científica.

ao Dr. ARMANDO OCTÁVIO RAMOS, pelo apoio e sugestões apresentadas no decorrer deste trabalho.

ao Dr. ANTONIO CARLOS NEDER, pela grande colaboração e apreço demonstrado durante todo o nosso curso de mestrado.

aos Drs. MESSIAS CARLOS GALVÃO GOMES e PAULO ROBERTO CURI, pela execução da estatística do crescimento dentário de ratos, deste trabalho.

ao Dr. NATAL ANTONIO VELLO, pela colaboração na execução da estatística do peso dos animais utilizados neste traba - lho.

ao Prof. JOSÉ RONALDO VIEIRA DA COSTA, pela cooperação prestada no desempenho da parte histológica, bem como de toda parte experimental.

ao Dr. GUILHERME BLUMEN, pelo auxílio in
dispensável na elaboração da documenta -
ção fotogrática, bem como nas sugestões
apresentadas na parte histológica desse
trabalho.

ao Sr. PAULO DO AMARAL, pela colaboração
no desempenho da confecção dos prepara -
dos histológicos

ã Srta SONIA MARIA APARECIDA SEMIONATO -
VICTORIA e Prof. ULISSES DE OLIVEIRA MAR
TINS, pelo auxílio prestado.

ã Sra. IVONETE APARECIDA DORINI DE AGUIAR
E SILVA, pelos trabalhos datilográficos.

ao Senhor MODESTO BOVOLENTA, pelos ani-
mais cedidos para o experimento.

ao Senhor JOSÉ PRENTICE DOS SANTOS MUL -
FORD, pela ampliação fotogrática.

ã Gráfica do "Campus" de Botucatu, pelos
serviços de impressão.

ã Faculdade de Odontologia de Piracicaba
UNICAMP, através de seu Digníssimo Dire-
tor Dr. JOSE MERZEL pela oportunidade que
nos ofereceu para a realização deste tra-
balho.

à Universidade Estadual de Campinas, através de seu Magnífico Reitor Dr. PLINIO ALVES DE MORAIS, pelo incentivo dispensado aos que se dedicam ao ensino e à pesquisa

à Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas, através de Seu Digníssimo Diretor HÉLIO DE SOUSA, pela solidariedade de sempre.

à CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pesquisa de Nível Superior, cujo auxílio nos permitiu a conclusão deste curso.

Í N D I C E

I	- INTRODUÇÃO	1
II	- MATERIAL E MÉTODOS	8
	1 - ANIMAIS UTILIZADOS	8
	2 - PREPARAÇÃO DOS ANIMAIS	8
	3 - MEDIÇÃO DO CRESCIMENTO DENTÁRIO	9
	4 - ANÁLISE HISTOLÓGICA DOS TECI- DOS DENTÁRIOS	9
	5 - DROGAS, DOSES E VIAS DE ADMI- NISTRAÇÃO	10
III	- SISTEMATIZAÇÃO DA PESQUISA	11
	1 - DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL	11
	2 - GRUPOS EXPERIMENTAIS	12
IV	- RESULTADOS ESTATÍSTICOS	15
	A - CRESCIMENTO DENTÁRIO	15
	B - RESULTADOS ESTATÍSTICOS DO PESO DO ANIMAL	39
	C - RESULTADOS DA ANÁLISE HIS- TOLÓGICA DE DENTES DOS RA- TOS CONTROLE, NÃO TRATA- DOS COM COLCHICINA, E DA- QUELES QUE RECEBERAM A DROGA DURANTE 10 E 18 DIAS	58

V	- DISCUSSÃO	62
VI	- CONCLUSÕES	65
VII	- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

I - INTRODUÇÃO

O estudo da atividade antimitótica de drogas tem demonstrado um interesse sempre atual, principalmente pela possibilidade de, impedindo o crescimento de tecidos, apresentarem utilidade no tratamento do câncer.

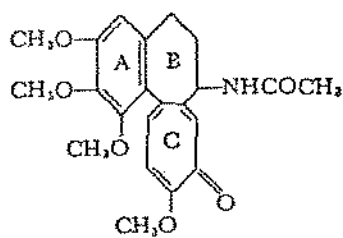
Dentre os compostos estudados, encontram-se diversos alcalóides extraídos de várias espécies vegetais e que têm demonstrado capacidade de bloquear a divisão celular, produzindo efeitos biológicos relacionados com a sua capacidade de inibir o crescimento de tecidos, especialmente aqueles com maior atividade proliferativa. Deste grupo destaca-se a colchicina.

A colchicina é um alcalóide encontrado no bulbo sólido e nas sementes do *Colchicum autumnale* (açafrão do outono, açafrão do prado), planta assim denominada porque existia em Colchis, na Ásia Menor.

Apesar de reconhecida a ação tóxica do cólchico, preparações da planta foram recomendadas para dores de origem articular, pela primeira vez por ALEXANDRE DE THALLES, no século sexto D.C., e em 1973, introduzida na terapêutica da gôta pelo Barão de VON STORCK.

A colchicina foi isolada do cólchico, em 1920 por PELLETTIER e CAVENTOU, sendo que sua fórmula

estrutural é a seguintes:



Colchicine

Devido a sua grande toxicidade, apesar - de seu efeito antitumoral, a colchicina teve seu emprego na clínica muito reduzido. Por esse motivo, os pesquisadores procuraram sintetizar derivados que, possuindo a mesma ação antimitótica da colchicina, não exercessem a mesma atividade tóxica. Os derivados sintetizados não possuem, porém, a mesma atividade antitumoral que a colchicina. Entretanto esta redução de atividade é compensada pela redução da toxicidade o que permite o emprego de doses maiores.

Os dois principais derivados da colchicina, atualmente usados são: desacetiltiocolchicina (R-261, Thio-colciran) e desacetilmetilcolchicina (Cytosol, Colcemid, Demecolcina, Colchamin). Este último é o derivado menos tóxico da colchicina.

Os principais requisitos necessários à atividade dos derivados da colchicina são: a) no mínimo um grupo oximetil no anel A; b) a esterificação do grupo amino do anel B; c) 7 membros no anel C; d) um grupo metoxi no anel C ou sua substituição por uma amina esterificada ou grupo sulfidrila de preferência es-

terificado (EIGISTI & DUSTIN, 1955).

Apesar de PERNICE (1889) ter sido o primeiro a notar que o c $\ddot{o}$ lchico influenciava a mitose, os detalhes dos efeitos da colchicina foram em primeiro lugar explicados por LITS (1934) e AMOROSO (1935). O efeito sobre a divis $\tilde{a}$ o celular é direto: a mitose é pa-
ralizada na met $\acute{a}$ fase, devido a incapacidade de forma-
çao dos fusos. Aparecem configura $\tilde{c}$ oes nucleares biza-
ras e anormais e as c $\acute{e}$ lulas muitas vezes morrem. Tal
como ocorre generalizadamente com drogas antimit $\acute{o}$ ticas,
s $\tilde{a}$ o mais afetadas aquelas c $\acute{e}$ lulas com alto grau de di-
vis $\tilde{a}$ o e metabolismo, tanto normais como cancerosas.

CALABRESE (1962), evidenciou que em do-
ses t $\acute{o}$ xicas a droga produz depress $\tilde{a}$ o da medula $\acute{o}$ ssea,
ulcera $\tilde{c}$ ao do aparelho digestivo, alopecia e dermatites.

Embora a colchicina tenha alguma ativida-
de na leucemia granuloc $\acute{i}$ tica cr $\acute{o}$ nica e na enfermidade
de Hodgkin, a Demecolcina tem sido mais utilizada por
apresentar menor toxicidade gastro intestinal.

A colchicina tem sido amplamente emprega-
da no estudo do crescimento celular normal e patol $\acute{o}$ gi-
co bem como no estudo dos efeitos de agentes carcinog $\acute{e}$ -
nicos, horm $\acute{o}$ nios e outras subst $\tilde{a}$ ncias, sobre essa fun-
çao celular.

A citogen $\acute{e}$ tica moderna deve muito ao uso
da colchicina para aumentar o n $\acute{u}$ mero de mitoses v $\acute{i}$ si-
veis em c $\acute{e}$ lulas em cultura ou para facilitar o estudo
dos cromossomos (TJIO JOE & LEVAN, 1956).

Como referido em CORBETT (1977), as drogas que inibem a multiplicação celular atuam inespecificamente sobre todos os tecidos do organismo, agindo tanto em tecidos normais como tumorais. Entretanto, os diversos tecidos apresentam diferentes sensibilidade a esses agentes, na dependência de sua atividade proliferativa, estando demonstrado que, de maneira geral, a sensibilidade de um tecido, tanto normal como tumoral é diretamente proporcional à sua atividade mitótica e inversamente proporcional à sua diferenciação celular.

Pelo exposto, infere-se que os tecidos embrionários são muito sensíveis aos antimitóticos, assim como o são os tecidos hematopoiético, linfático, germinativo e tecido epitelial de revestimento. Por outro lado, são menos sensíveis os tecidos nervoso, ósseo e muscular.

Tais fatos conduziram alguns autores a estudarem o efeito da colchicina, antimitótico clássico com mecanismo bem determinado, sobre tecidos dentais em crescimento.

Assim, CHIBA et alii, em 1966, pesquisaram a taxa mitótica e a duração mitótica no epitélio do esmalte do dente do rato, empregando a colchicina. Diferenças regionais foram encontradas na taxa mitótica, mas não na duração mitótica, levando-o a concluir que a taxa mitótica varia de acordo com a localização das células, porém a duração mitótica é sempre constante.

OGURA (1969), relatou que a administração da colchicina causa inibição da aposição dental -

nos incisivos de ratos e coelhos.

RUCH et alii (1975) concluíram, em estudos realizados *in vitro*, que as modificações sofridas pelos odontoblastos e ameloblastos sob efeito da colchicina e da citocalasina P resultam principalmente na lesão dos microtúbulos, os quais parecem desempenhar importante papel na polarização das células estudadas.

KUDO (1975) demonstrou por métodos autoradiográficos que a colchicina não altera a síntese de dentina e matriz de esmalte, porém afeta a secreção funcional dos odontoblastos por interferir com a função dos microtúbulos das células.

Foi bem demonstrado que a colchicina e compostos relacionados atuam nos microtúbulos celulares de várias maneiras: restringe as proteínas dos microtúbulos (BORISY & TAYLOR, 1967a e b); inibindo sua polimerização (ADELMAN et alii, 1968); dissociando a estrutura microtubular (WISNIEWSKY et alii, 1968), tendo sido também sugerido o importante papel que os microtúbulos desempenham nos processos secretores (GILLESPIE et alii, 1968; WILLIAMS & WOLFF, 1970; LACY et alii, 1968, 1972; DIEGELMANN & PETERKOESKY, 1972).

Com relação ao efeito da demecolcina na erupção do dente incisivo de ratos, MAIN & ADAMS (1966) injetaram diariamente, em ratos, 1 mg da droga por kg de peso, por 8 dias, observando diferença não significativa na taxa de erupção do dente.

CHIBA et alii (1968) todavia, verifica -

ram que a dose de 2 mg/kg de peso de demecolcina repetida cada 4 horas, inibia a erupção do dente em ratos durante as 24 horas de administração da droga.

Com relação a outros antimitóticos, MASSINI (1976), estudou o efeito da ciclofosfamida sobre o crescimento e desenvolvimento dos incisivos inferiores de ratos, constatando atividade inibitória na velocidade de crescimento dos tecidos dentários. Com o aumento das doses, os animais sofriam uma diminuição progressiva de peso e evidentes sinais de toxicidade.

RANALI (1976) estudou o efeito da ametopterina sobre o crescimento e desenvolvimento dos incisivos inferiores de ratos, constatando inibição discreta dessa atividade nos tecidos dentários. O aumento da dosagem, não causou maior grau de inibição do crescimento dentário.

Com inspiração nesses trabalhos, propôs-se estudar os possíveis efeitos da colchicina, poderoso antimitótico, na velocidade do crescimento e desenvolvimento dos tecidos dentários.

A teoria da proliferação celular no crescimento dentário foi primeiramente postulada por SITCHER (1942) e tem sido confirmada por vários outros autores como SCOTT (1953) e OBRTEN et alii (1958). Essencialmente essa teoria sustenta que a erupção do dente é o resultado de taxas diferenciais de proliferação celular na polpa, periodonto e osso, e também o resultado de uma pequena pressão induzida.

STURMAN (1957) deixou bem claro que a -
erupção contínua do incisivo do rato, é localmente con-
trolada pela vascularização e atrição, enquanto que a
força de erupção é provavelmente derivada da atividade
de proliferação do epitélio odontogênico e das células
pulpare.

Confirmando os estudos de SICHER de 1942,
CHIBA em 1965, descreveu que o crescimento contínuo do
incisivo do rato é devido ao fato de novas células es-
tarem sendo constantemente produzidas na região basal
do dente. No lado labial do incisivo, por exemplo, -
existem odontoblastos mesenquimais e ameloblastos adja-
centes. Isto faz supor que ambos os tipos de células
originam-se da base e migram em direção do bordo inci-
sal, diferenciando gradualmente. Uma vez maduras, pro-
duzem matriz de dentina e esmalte.

Esta sequência de eventos pode ser demons-
trada com a observação do aspecto labial do germe den-
tal do incisivo do rato, através de crôtes sagitais.

A contínua erupção do incisivo do roedor,
segundo ZAJICEK (1976), se deve a várias populações ce-
lulares que se proliferam em harmonia, a saber: liga-
mento periodontal, ameloblastos, odontoblastos, cêlu-
las pulpare e celulares e doteliais.

Desta forma, o desenvolvimento contínuo
dos incisivos do rato, possui particularidades adequa-
das e objetivas para verificar a possível atividade da
colchicina no crescimento dos tecidos dentários.

II - MATERIAL E MÉTODOS

1 - ANIMAIS UTILIZADOS

Foram utilizados para o experimento, 72 ratos machos, da raça Wistar (Rattus norvergicus), provenientes do Biotério Central do "Campus" de Botucatu, com cerca de 20 semanas de idade e peso médio de 312 gramas no início das experiências.

2 - PREPARAÇÃO DOS ANIMAIS

2.1 - Anestesia

Para a marcação dos incisivos e para as mensurações, os animais foram anestesiados por inalação de éter etílico.

2.2 - Marcação dos dentes dos ratos

Utilizou-se o método empregado por MASSI NI (1976) e RANALI (1976).

No rato anestesiado, é feita uma marcação base nos incisivos inferiores, consistindo em pequeno sulco no limite dentogengival da fase labial -

(vestibular) dos dentes direito e esquerdo, evitando - se a lesão da mucosa gengival. O sulco foi realizado com o emprego de disco de metal de 3/4 de polegada, - adaptado a um mandril e fixado a um suporte manual movida por motor de baixa rotação (6.000 r.p.m.).

3 - MEDIÇÃO DO CRESCIMENTO DENTÁRIO

Foram realizadas durante as experiências, 4 medidas da distância entre o bordo gengival e o sulco realizado, a intervalos de 3 dias, sendo a primeira imediatamente após a marcação base. Utilizou-se para essas medidas um compasso de ponta seca, com o qual tomava a distância a ser medida; esta era feita posteriormente em paquímetro.

O valor obtido representou a média de 3 medidas consecutivas, sendo expresso em milímetros.

Com o objetivo de avaliar se a droga estaria ou não, alterando o ganho de peso e para manter a relação dose-peso, os animais foram pesados regularmente a cada realização das medidas de crescimento dentário.

4 - ANÁLISE HISTOLÓGICA DOS TECIDOS DENTÁRIOS

Os animais foram sacrificados por decapit

tação, sob efeito anestésico do éter etílico. Os dentes foram removidos, juntamente com as mandíbulas, sendo ambos fixadas em solução de Bouin, descalcificados em solução de ácido tricloroacético, desidratadas em álcool, clarificados em xilol e incluídos em parafina.

Em seguida, foram obtidos cortes histológicos no sentido sagital de 7 um de espessura, corados pelo método hematoxilina-eosina.

As regiões observadas ao microscópio optico, foram as zonas emerionaria, diferenciação e secreção e pós secreção do incisivo do rato (WARSHOWSKY & SMITH, 1971).

Foram estudados cortes de dentes dos ratos do grupo controle e dos tratados com diferentes doses de colchicina.

5 - DROGAS, DOSES E VIAS DE ADMINISTRAÇÃO

Colchicina cristalizada (Merck). Usada por via intraperitoneal nas doses de 25, 50, 100 e 200 ug/kg, utilizando-se soluções de 100 ug/ml.

Éter etílico (Química Miura Brasil), utilizado para anestesia dos animais.

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

O rato foi o animal escolhido para o presente trabalho em vista da característica de ter os dentes incisivos em constante crescimento e desenvolvimento durante toda sua vida. Portanto, num único dente pode ser demonstrado o ciclo completo do desenvolvimento dentário, desde seu início até sua maturidade. O crescimento contínuo reflete a produção contínua de novas células na região basal do dente. Assim, no lado labial dos incisivos os odontoblastos estão adjacentes aos ameloblastos, sendo aceito que ambos os tipos de células originam-se na base, migram na direção do ângulo incisal, diferenciam-se gradualmente e amadurecem produzindo dentina e matrizes de esmalte. Tal característica de crescimento contínuo faz com que o incisivo de rato se constitua em excelente modelo experimental para o estudo de proliferação e diferenciação celular.

1 - DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL

O desenvolvimento compreendeu as seguintes fases:

- a - marcação dos dentes incisivos inferiores do animal com um sulco superficial na face vestibular (labial) próximo do limite dento-gengival;
- b - injeção diária de colchicina, por via intraperitoneal;
- c - pesagem dos animais bem como medida dos dentes a cada três dias, isto é, no 1º, 4º, 7º e 10º dias de experiência, para os grupos que receberam a droga durante 10 dias e também para o grupo controle. Nos grupos tratados com a droga durante 18 dias, a mensuração foi realizada aos 9º, 12º, 15º e 18º dias após o início da administração do fármaco;
- d - sacrifício dos animais e retirada após a última mensuração, dos incisivos para a preparação de lâminas para análise histológica.

Todos os animais, antes do início das experiências foram conservados em gaiolas em condições padronizadas de alimentação e ambiente, durante pelo menos 10 dias.

2 - GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos em três grandes grupos, a saber: grupo controle e grupo tratado com colchicina, durante 10 e 18 dias.

GRUPO 1 - Animais controle - ratos não tratados com a colchicina, cujos incisivos inferiores foram marcados e nos quais foram realizadas as mensurações de crescimento dentário e bem como verificação de peso a cada três dias.

GRUPO 2 - Animais tratados com colchicina durante 10 dias. Nesse grupo os animais receberam a droga diariamente, por via intraperitoneal, sendo seus incisivos inferiores marcados ao 1º dia e as medidas e pesagens feitas aos 1º, 4º, 7º e 10º dias de experimento.

Subgrupo 2.1 - Animais tratados com colchicina na dose de 25 µg/kg.

Subgrupo 2.2 - Animais tratados com colchicina na dose de 50 µg/kg.

Subgrupo 2.3 - Animais tratados com colchicina na dose de 100 µg/kg.

Subgrupo 2.4 - Animais tratados com colchicina na dose de 200 µg/kg.

GRUPO 3 - Animais tratados com colchicina durante 18 dias. Nesse grupo os animais receberam a droga diariamente, por via intraperitoneal, sendo seus incisivos inferiores marcados no 9º dia de tratamento e as medidas e pesagens feitas aos 9º, 12º, 15º e 18º dias de experiência.

Subgrupo 3.1 - Animais tratados com colchicin
na na dose de 25 ug/kg.

Subgrupo 3.2 - Animais tratados com colchicin
na na dose de 50 ug/kg.

Subgrupo 3.3 - Animais tratados com colchicin
na na dose de 100 ug/kg.

Subgrupo 3.4 - Animais tratados com colchicin
na na dose de 200 ug/kg.

Os animais tiveram seu peso corporeo reg
istrado a cada três dias a partir do primeiro dia da
administração de colchicina.

Para fim de análise estatística, convenc
cionou-se denominar os grupos como G_1 , G_2 , ... G_9 com-
preendendo desde o controle até o subgrupo 3.4.

IV - RESULTADOS ESTATÍSTICOS

A - CRESCIMENTO DENTÁRIO

1 - Resultados do Grupo 1 (G_1) - Controle

Animais não tratados com colchicina, nos quais foi feita a medida de crescimento dentário aos - 19, 79 e 109 dias após a marcação dos dentes incisivos inferiores, obtendo-se os valores médios de respectivamente 1,77 - 3,15 - 4,74 milímetros. A reta de regressão apresentada no GRÁFICO I e II é demonstrativa desse fato.

Os dados de crescimento dentário obtidos nesse grupo encontram-se na TABELA I.

TABELA I

Crescimento dos dentes incisivos inferiores direito e esquerdo de ratos não tratados com colchicina (controle), em observações feitas aos 49, 79 e 109 dias após a marcação do bordo gengival.

Dentes	Crescimento, em milímetros, dos dentes direito e esquerdo *		
	49 dia	79 dia	109 dia
01	1,85	3,40	5,10
02	1,85	3,40	5,10
03	1,60	3,10	4,45
04	1,60	3,10	4,45
05	2,10	3,45	4,70
06	1,80	3,20	4,70
07	2,25	3,40	5,20
08	2,25	3,40	5,20
09	1,85	3,30	4,80
10	1,45	2,85	4,65
11	1,30	2,80	5,00
12	1,30	2,80	5,00
13	1,45	2,90	4,20
14	1,65	3,10	4,40
15	2,05	3,10	4,50
16	2,05	3,10	4,50
MÉDIAS	1,77	3,15	4,74

* Os números ímpares correspondem aos dentes esquerdos e os pares aos dentes direitos, nesta e nas demais tabelas que se seguem.

Foram feitas regressões lineares para os diversos grupos, estabelecendo-se portanto equações de regressão que forneceram o tamanho médio dos dentes em função do dia de medição, para cada um dos grupos.

$$y = a + bx$$

y = tamanho do dente

x = dia de medida $x_1 = 4$

$x_2 = 7$

$x_3 = 10$

Para o Grupo G_1 foi estabelecida a seguinte equação:

GRUPO	EQUAÇÃO	r	r^2	F
G_1	$y = -0,243 + 0,495 x$	0,974	0,948	834,745*

* Significante.

2 - Resultados dos Grupos tratados durante 10 dias
(G₂ a G₅)

Animais tratados com colchicina nas doses de 25, 50, 100 e 200 ug/kg respectivamente, durante 10 dias, nos quais foi feita a medida de crescimento dentário aos 4º, 7º e 10º dias após a marcação base dos dentes.

Observou-se uma diminuição significativa do crescimento dentário deste grupo quando comparados com o grupo controle.

A reta de regressão apresentada no GRÁFICO I é demonstrativa desse fato.

Os dados de crescimento dentário obtidos nesses grupos, encontram-se nas TABELAS II, III e IV.

T A B E L A II

Crescimento (em milímetros) dos dentes incisivos inferiores direito e esquerdo, de ratos tratados durante 10 dias com colchicina (25, 50, 100 e 200 µg/kg) e de ratos não tratados (controle), no quarto dia de observação.

Dentes	Controle	Tratados com colchicina			
		25 µg/kg	50 µg/kg	100 µg/kg	200 µg/kg
01	1,85	1,50	1,75	1,20	0,90
02	1,85	1,50	1,70	1,60	1,30
03	1,60	0,70	0,85	2,10	0,70
04	1,60	0,70	1,00	1,60	0,90
05	2,10	0,90	1,25	2,10	1,60
06	1,80	1,40	1,25	1,40	1,60
07	2,25	1,40	1,65	0,80	1,30
08	2,25	2,00	1,65	1,70	1,60
09	1,85	2,40	0,90	2,00	1,20
10	1,45	2,10	0,90	0,90	1,40
11	1,30	1,50	0,90	1,10	1,35
12	1,30	1,00	0,90	1,70	1,35
13	1,45	1,60	0,75	0,60	1,40
14	1,65	1,60	1,00	0,90	1,50
15	2,05	1,00	1,05	0,90	0,90
16	2,05	1,00	1,05	1,20	0,90
MÉDIAS	1,77	1,39	1,16	1,36	1,24

T A B E L A III

Crescimento (em milímetros) dos dentes incisivos inferiores direito e esquerdo, de ratos tratados durante 10 dias com colchicina (25, 50, 100 e 200 µg/kg) e de ratos não tratados (controle), no sétimo dia de observação.

Dentes	Controle	Tratados com colchicina			
		25 µg/kg	50 µg/kg	100 µg/kg	200 µg/kg
01	3,40	2,90	3,00	2,40	2,95
02	3,40	2,90	3,15	2,90	3,15
03	3,10	1,70	1,90	3,10	2,00
04	3,10	1,70	2,50	2,80	2,40
05	3,45	2,70	2,10	3,70	2,90
06	3,20	2,40	2,10	2,90	2,60
07	3,40	3,10	3,05	2,60	2,90
08	3,40	3,10	3,05	2,50	3,10
09	3,30	3,50	2,40	3,20	2,70
10	2,85	3,50	2,40	1,90	2,40
11	2,80	2,90	2,25	2,90	2,60
12	2,80	2,90	2,25	3,20	2,90
13	2,90	3,40	1,90	2,10	2,90
14	3,10	3,40	1,95	1,80	2,90
15	3,10	2,50	2,50	2,50	2,50
16	3,10	2,50	2,00	2,60	2,20
MÉDIAS	3,15	2,82	2,40	2,69	2,69

T A B E L A IV

Crescimento (em milímetros) dos dentes incisivos inferiores direito e esquerdo, de ratos tratados durante 10 dias com colchicina (25, 50, 100 e 200 µg/kg) e de ratos não tratados (controle), no décimo dia de observação.

Dentes	Controle	Tratados com colchicina			
		25 µg/kg	50 µg/kg	100 µg/kg	200 µg/kg
01	5,10	4,10	4,20	4,10	3,55
02	5,10	4,10	4,60	4,60	4,30
03	4,45	2,80	3,35	5,00	3,65
04	4,45	2,80	3,50	4,10	3,60
05	4,70	3,50	3,55	4,80	4,30
06	4,70	3,30	3,55	3,80	4,10
07	5,20	4,50	4,30	3,80	4,60
08	5,20	4,20	4,30	4,40	4,20
09	4,80	5,10	3,45	4,80	4,30
10	4,65	4,20	3,45	3,70	3,40
11	5,00	4,20	4,15	4,40	3,65
12	5,00	3,70	4,15	4,50	4,20
13	4,20	4,50	3,10	3,40	3,90
14	4,40	4,50	3,35	3,10	3,90
15	4,50	3,80	3,90	4,10	3,95
16	4,50	2,70	3,07	4,404	3,95
MÉDIAS	4,74	3,87	3,75	4,18	3,97

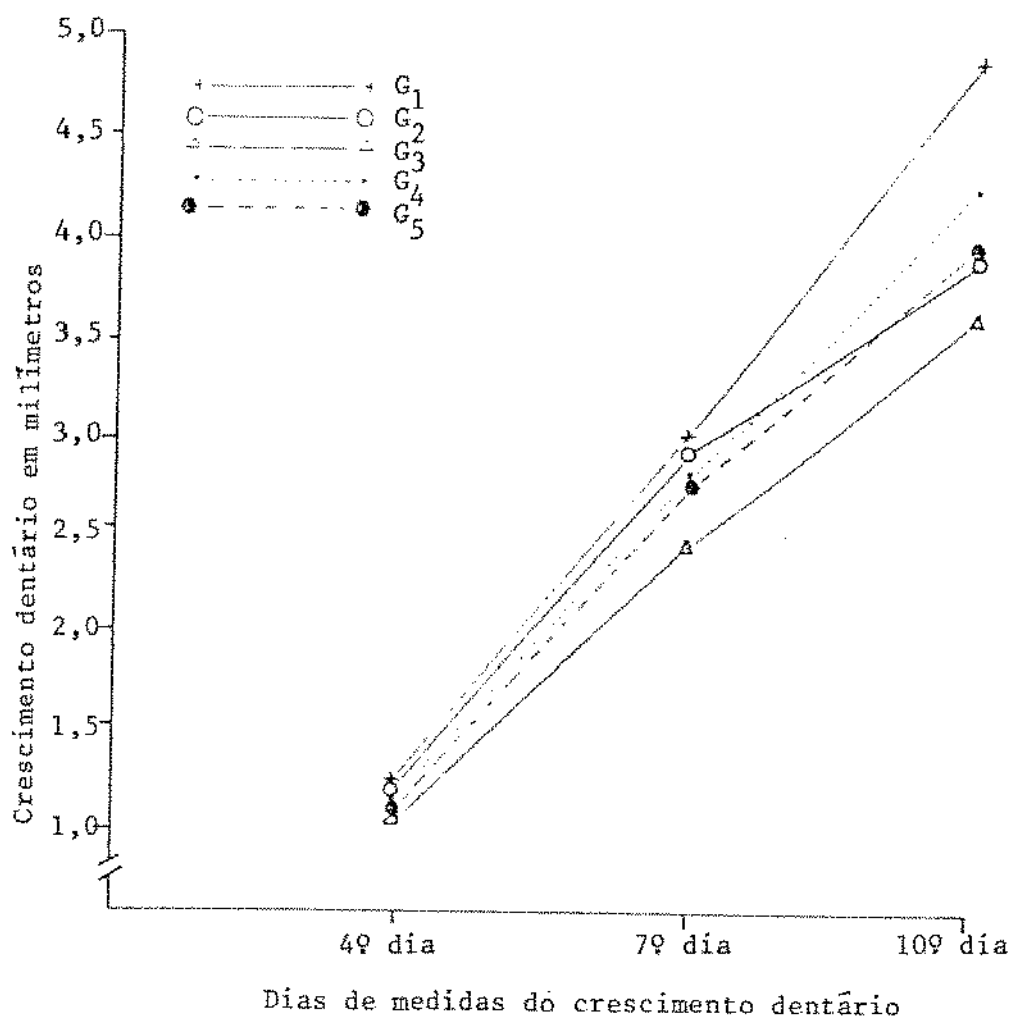
Para o grupo tratado durante 10 dias, G_2 , G_3 , G_4 e G_5 , foram estabelecidos as seguintes equações de regressão linear:

GRUPO	EQUAÇÃO	r	r^2	F
G_2	$y = -0,199 + 0,414x$	0,869	0,755	141,546*
G_3	$y = -0,582 + 0,431x$	0,932	0,869	306,574*
G_4	$y = -0,548 + 0,471x$	0,920	0,847	254,710*
G_5	$y = -0,546 + 0,455x$	0,963	0,927	585,665*

* Significante.

GRÁFICO I

Regressão linear de crescimento de dentes de ratos controle (G_1 - sem tratamento) e de ratos tratados com colchicina durante 10 dias, nas doses de 25 (G_2), 50 (G_3), 100 (G_4) e 200 $\mu\text{g/kg}$ (G_5), em observações feitas aos 49, 79 e 109 dias de crescimento.



3 - Resultados dos Grupos tratados durante 18 dias (G₆ a G₉)

Animais tratados com colchicina nas doses de 25, 50, 100 e 200 ug/kg, respectivamente, durante 18 dias. Neste grupo, iniciou-se a administração do fármaco oito (8) dias antes da realização da marcação base dos dentes, sendo esta feita portanto no 9º dia, ao início do tratamento. O tempo de observação (4º, 7º e 10º dias), é por conseguinte contado a partir do 9º dia de tratamento ou seja 12º, 15º e 18º dias.

Foi observado diminuição significativa - do crescimento dentário destes grupos quando comparados com o grupo controle.

A reta de regressão apresentada no GRÁFICO II é demonstrativa desse fato.

Os dados de crescimento dentário obtidos nesses grupos, encontram-se nas TABELAS V, VI e VII.

T A B E L A V

Crescimento (em milímetros) dos dentes inferiores direito e esquerdo, de ratos tratados durante 18 dias com colchicina (25, 50, 100 e 200 µg/kg) e de ratos não tratados (controle), ao quarto dia de observação.

Dentes	Controle	Tratados com colchicina			
		25 µg/kg	50 µg/kg	100 µg/kg	200 µg/kg
01	1,85	1,50	1,30	1,50	0,75
02	1,85	1,50	1,50	1,95	1,30
03	1,60	1,30	1,40	1,40	1,60
04	1,60	1,30	1,40	1,20	1,65
05	2,10	1,00	1,70	1,10	0,70
06	1,80	1,40	1,70	1,40	1,10
07	2,25	1,50	1,00	1,35	1,65
08	2,25	1,50	1,90	1,50	1,65
09	1,85	1,10	1,60	2,10	1,50
10	1,45	1,10	1,60	2,10	0,70
11	1,30	1,70	1,10	0,90	1,25
12	1,30	1,20	0,90	1,20	1,80
13	1,45	1,40	1,80	1,70	1,15
14	1,65	1,60	1,40	1,60	1,15
15	2,05	0,90	1,40	0,55	1,80
16	2,05	0,85	1,60	0,80	1,70
MÉDIAS	1,77	1,30	1,45	1,39	1,34

T A B E L A VI

Crescimento (em milímetros) dos dentes incisivos inferiores direito e esquerdo, de ratos tratados durante 18 dias com colchicina (25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g/kg}$) e de ratos não tratados (controle), no sétimo dia de observação

Dentes	Controle	Tratados com colchicina			
		25 $\mu\text{g/kg}$	50 $\mu\text{g/kg}$	100 $\mu\text{g/kg}$	200 $\mu\text{g/kg}$
01	3,40	2,20	2,40	2,95	2,70
02	3,40	2,20	2,30	3,25	3,15
03	3,10	2,30	2,90	2,75	3,30
04	3,10	2,80	2,90	2,55	3,40
05	3,45	2,70	3,80	1,80	2,55
06	3,20	2,10	3,60	2,30	3,05
07	3,40	3,10	3,40	2,85	2,90
08	3,40	3,10	3,40	3,05	3,00
09	3,30	2,50	3,20	3,55	3,00
10	2,85	2,50	3,20	3,05	2,20
11	2,80	3,00	2,60	2,75	2,30
12	2,80	2,00	2,20	3,15	3,03
13	2,90	3,00	3,30	3,05	2,35
14	3,10	3,30	3,30	2,95	1,95
15	3,10	2,40	3,20	1,90	2,90
16	3,10	2,10	3,20	2,20	2,80
MÉDIAS	3,15	2,58	3,05	2,75	2,80

T A B E L A VII

Crescimento (em milímetros) dos dentes incisivos inferiores direito e esquerdo, de ratos tratados com colchicina durante 18 dias (25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g/kg}$) e de ratos não tratados (controle), no décimo dia de observação.

Dentes	Controle	Tratados com colchicina			
		25 $\mu\text{g/kg}$	50 $\mu\text{g/kg}$	100 $\mu\text{g/kg}$	200 $\mu\text{g/kg}$
01	5,10	3,50	4,00	4,30	4,05
02	5,10	3,50	4,00	4,60	4,10
03	4,45	4,25	4,00	3,95	4,80
04	4,45	4,20	4,00	3,75	4,90
05	4,70	4,05	4,70	3,00	3,80
06	4,70	3,15	4,70	3,35	4,30
07	5,20	4,20	4,20	4,05	4,05
08	5,20	4,00	4,20	4,25	4,70
09	4,80	3,40	3,65	4,80	4,60
10	4,65	4,35	3,65	4,50	3,30
11	5,00	4,40	3,35	3,90	3,90
12	5,00	4,10	2,95	4,30	4,80
13	4,20	4,15	4,80	4,65	4,20
14	4,40	4,85	4,00	4,55	3,40
15	4,50	3,60	4,00	3,10	4,20
16	4,50	3,80	4,00	3,40	4,10
MÉDIAS	4,74	3,97	4,01	4,02	4,22

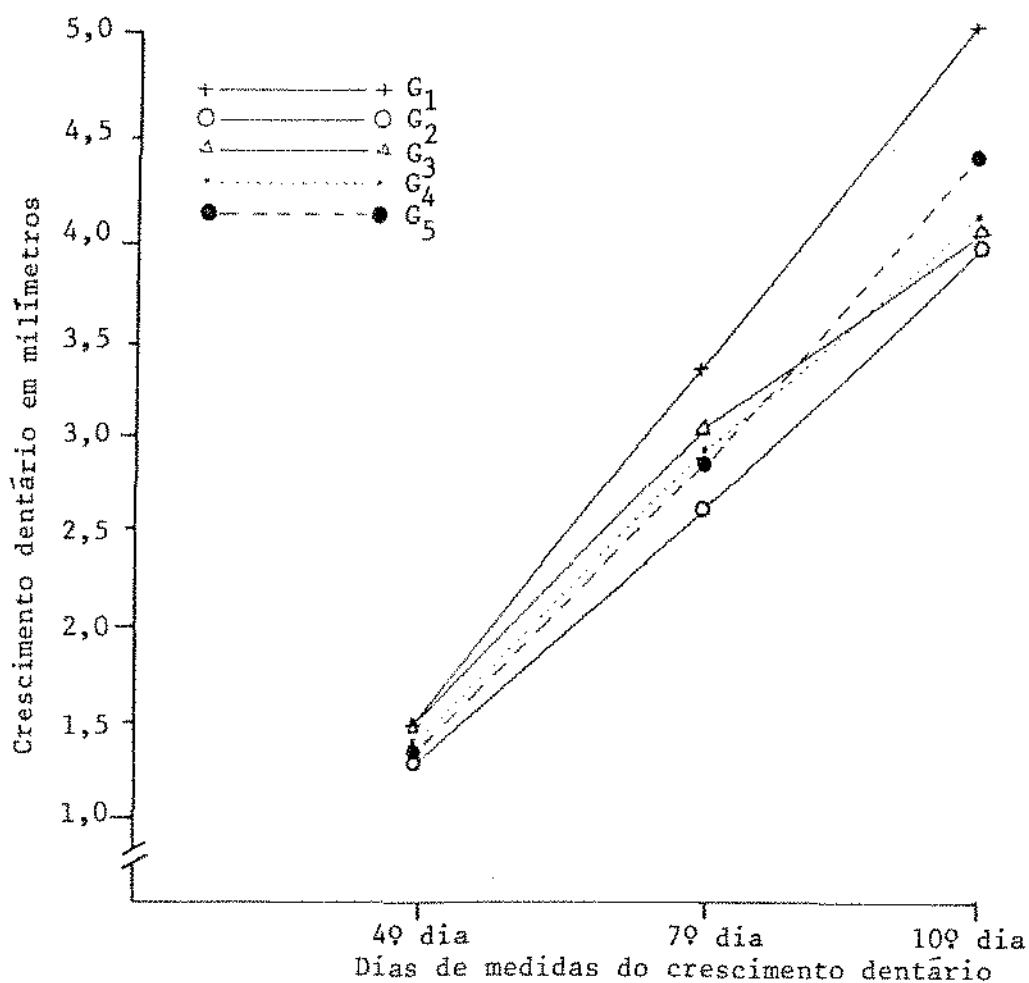
Para os grupos tratados durante 18 dias, G_6 , G_7 , G_8 e G_9 , foram estabelecidas as seguintes equações de regressão linear.

GRUPOS	EQUAÇÃO	r	r^2	F
G_6	$y = -0,492 + 0,444x$	0,946	0,895	393,921*
G_7	$y = -0,141 + 0,426x$	0,923	0,853	266,257*
G_8	$y = -0,322 + 0,439x$	0,904	0,817	204,806*
G_9	$y = -0,578 + 0,481x$	0,942	0,888	363,235*

* Significante.

G R Á F I C O II

Regressão linear de crescimento de dentes de ratos controle (G_1 - sem tratamento) e de ratos tratados com colchicina durante 18 dias, nas doses de 25, (G_6), 50 (G_7), 100 (G_8) e 200 $\mu\text{g/kg}$ (G_9), em observações feitas aos 4º, 7º e 10º dias de medida de crescimento.



Para maior compreensão das análises estatísticas realizadas, citaremos o resumo do método - estatístico utilizado neste experimento.

O problema será abordado através de uma análise de variância multivariada, a qual utiliza modelos lineares.

Os dados serão processados através de computador, usando programa MGLM do Centro de Processamento de Dados do Instituto de Matemática e Estatística da Universidade de São Paulo.

Teremos 9 grupos de tratamentos assim distribuídos:

- G_1 = controle
- G_2 = colchicina durante 10 dias, com concentração (25)
- G_3 = colchicina durante 10 dias, com concentração (50)
- G_4 = colchicina durante 10 dias, com concentração (100)
- G_5 = colchicina durante 10 dias, com concentração (200)
- G_6 = colchicina durante 18 dias, com concentração (25)
- G_7 = colchicina durante 18 dias, com concentração (50)
- G_8 = colchicina durante 18 dias, com concentração (100)
- G_9 = colchicina durante 18 dias, com concentração (200)

As respostas foram medidas do tamanho -

de dentes no 4º dia, 7º dia e 10º dia do experimento, para dentes esquerdo e direito. Teremos 8 valores ca da resposta.

Modelo inicial

$$\begin{matrix} \underline{\underline{Y}} & = & \underline{\underline{X}} & \underline{\underline{B}} & \underline{\underline{E}} \\ 72 \times 6 & & 72 \times 9 & 9 \times 6 & 72 \times 6 \end{matrix}$$

$\underline{\underline{Y}}$
72 x 6 = matriz das medidas de crescimento de dentes.

$\underline{\underline{X}}$
72 x 9 = matriz de planejamento formada por valores 1
zero

$\underline{\underline{B}}$
9 x 6 = matriz de parâmetros, cujas linhas tomam nos
dos diferentes grupos e cujas colunas tomam
com das diferentes respostas

Testes de hipóteses

As hipóteses de nulidade serão testadas através da formulação matriz:

$$\text{Ho: } \begin{matrix} \underline{\underline{C}} & \underline{\underline{B}} & \underline{\underline{U}} \\ g \times 9 & 9 \times 6 & 6 \times 1 \end{matrix} = 0$$

A estatística usada será a F com graus de liberdade - variáveis em cada caso. Para verificação da significância de F consideraremos $\alpha = 0,05$. Forneceremos - também o respectivo P valor associado ao F para dar - idéia mais nítida da significância ou não de F.

Hipóteses que foram testadas

1 - H_{01} - não há diferenças entre as medidas de dente esquerdo e direito.

$F = 0,368$ com graus de liberdade 9 e 63

P value = 0,9459 — não significativo.

Conclusão - aceita-se H_{01} . A amostra estudada não permitiu verificar diferença significativa entre dentes esquerdo e direito. Diante disso, reformularemos o modelo inicial fazendo:

$$\begin{array}{ccccc} \bar{Y} & = & \bar{X} & \bar{B} & = & \bar{E} \\ 144 \times 3 & & 144 \times 9 & 9 \times 3 & & 144 \times 3 \end{array}$$

As respostas passam ser as medidas feitas 49, 79 e 109 dia.

Com o modelo reformulado faremos todos os outros testes.

2 - H_{02} - não há diferença entre controle (G_1) e grupos tratados para cada uma das respostas.

49 dia	79 dia	109 dia
$F = 3,3718^*$	$F = 4,1161^*$	$F = 5,4400^*$
Pvalue = 0,0018	Pvalue = 0,0004	Pvalue = 0,0001

$\alpha = 0,05$

OBS,: quando Pvalue 0,05 — F significativa.

Conclusão: foi determinada diferença significativa entre controle e tratados para 4º dia, para 7º dia e para 10º dia.

Pode ainda ser concluído que o tratamento com colchicina provocou uma diminuição do crescimento.

3 - H_0_3 - não há diferença entre colchicina aplicada durante 10 dias e colchicina durante 18 dias, para cada uma das respostas:

4º dia	7º dia	10º dia
F = 1,6185 n.s.	F = 4,1926*	F = 1,7026 n.s.
Pvalue = 0,2027	Pvalue = 0,0400	Pvalue = 0,1911

Conclusão - só foi possível determinar diferença significativa, para $\alpha = 5\%$, na resposta do 7º dia. De maneira geral não foi determinada diferença significativa entre colchicina aplicada durante 10 dias e colchicina aplicada durante 18 dias.

4 - H_0_4 - não há diferença entre as concentrações, para o tratamento com colchicina durante 10 dias, para cada uma das respostas.

4º dia	7º dia	10º dia
F = 1,3346 n.s.	F = 2,4495 n.s.	F = 2,2629 n.s.
Pvalue = 0,2648	Pvalue = 0,0651	Pvalue = 0,0827

Conclusão - aceita-se H_0 . Não foi possível determinar diferença significativa (para $\alpha = 5\%$) entre as concentrações para tratamento com colchicina durante 10 dias. Portanto não foi determinado efeito significativo de concentração para colchicina durante 10 dias.

5 - H_0 - não há diferença entre as concentrações de colchicina durante 18 dias, para cada uma das respostas.

4º dia	7º dia	10º dia
F = 0,5087 n.s.	F = 3,019*	F = 0,8742 n.s.
Pvalue = 0,6813	Pvalue = 0,0314	Pvalue = 0,5413

Conclusão - só foi possível determinar diferença significativa entre as concentrações de colchicina para as medidas efetuadas no 7º dia, para tratamento com colchicina durante 18 dias. No geral não há influência da concentração para tratamento de 18 dias. Pode também ser constatado que para as medidas

bo 7º dia, houve menor crescimento do dente à medida que se aumentou a concentração de colchicina, para o tratamento com 18 dias.

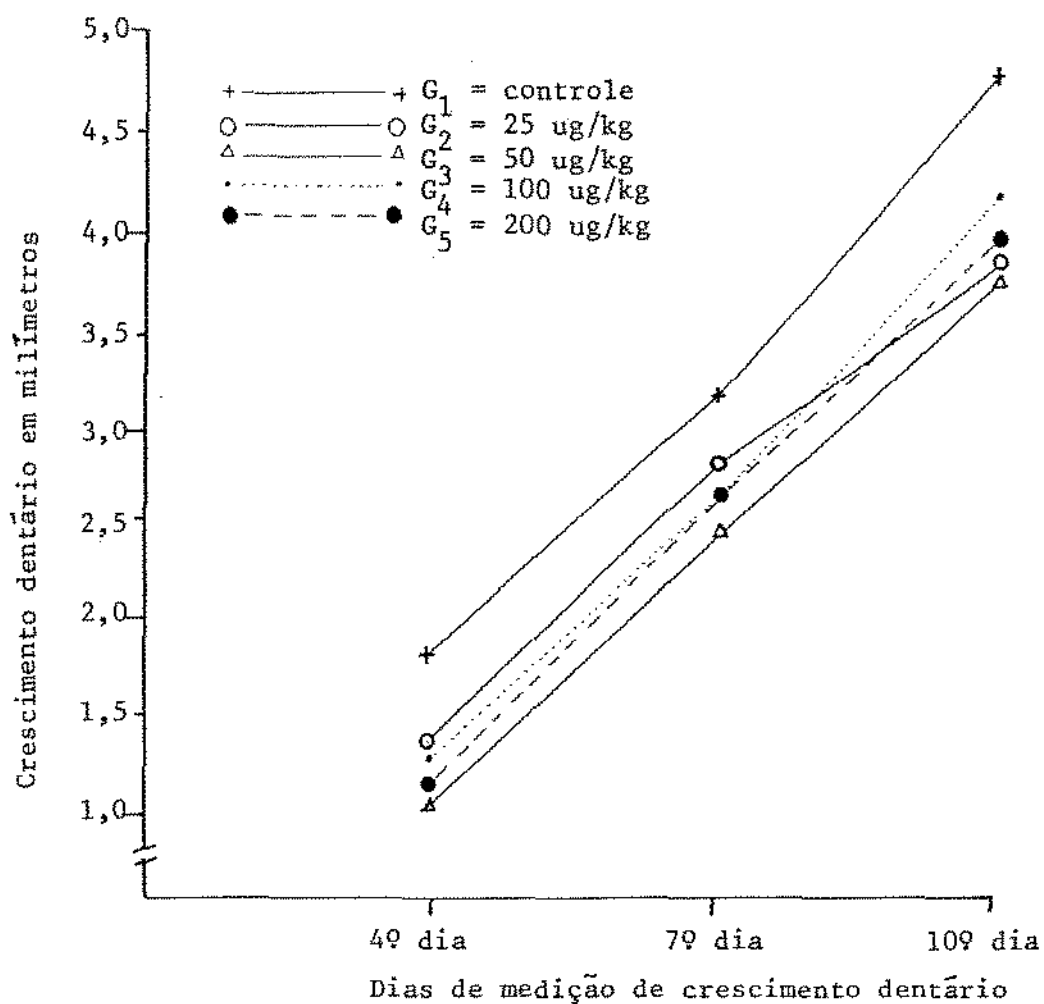
6 - Antes de colocar Ho_6 fazer uma tabela de valores e o gráfico de crescimento do dente, com a seguinte esquematização:

Médias do tamanho dos dentes de acordo com o grupo e o dia de medida

GRUPOS	4º dia	7º dia	10º dia
G_1	1,74	3,23	4,71
G_2	1,47	2,71	3,95
G_3	1,14	2,44	3,73
G_4	1,34	2,76	4,17
G_5	1,28	2,65	4,01
G_6	1,29	2,62	3,95
G_7	1,56	2,81	4,12
G_8	1,44	2,75	4,27
G_9	1,35	2,80	4,24

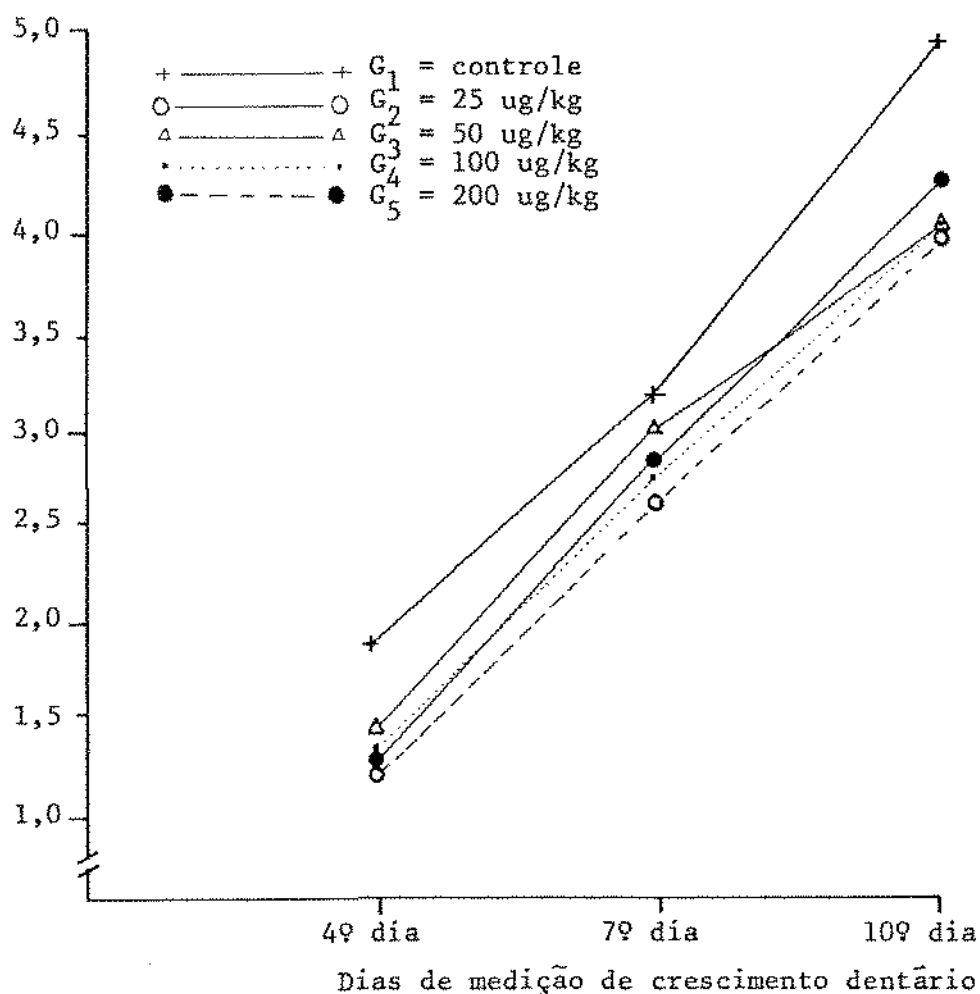
G R Á F I C O I I I

Crescimento de dentes de ratos controle (G_1 - não tratados) e de ratos tratados com colchicina durante 10 dias, nas doses de 25 (G_2), 50 (G_3), 100 (G_4) e 200 (G_5) ug/kg, em observações realizadas aos 40, 70 e 100 dias de medida de crescimento.



G R Á F I C O IV

Crescimento de dentes de ratos controle (G_1 - não tratados) e de ratos tratados com colchicina durante 10 dias, nas doses de 25 (G_2), 50 (G_3), 100 (G_4) e 200 (G_5) ug/kg, em observações realizadas aos 49, 79 e 109 dias de medida de crescimento.



7 - H_{06} - não há interação tratamento (grupo) x resposta (dias de medição). H_{06} testa se há ou não paralelismo entre as linhas de crescimento para os 9 grupos.

Entre 4º e 7º dias

Entre 7º e 10º dias

F = 1,7701 n.s.

F = 6,8524*

Pvalue = 0,0877

Pvalue = 0,0001

Conclusão - no 1º trecho do gráfico, do 4º ao 7º dia não foi constatada interação significativa entre grupos e resposta — as linhas de crescimento podem ser consideradas como paralelas estatisticamente. No 2º trecho, do 7º ao 10º dia, ocorreu o contrário. As linhas de crescimento não podem ser consideradas paralelas.

B - RESULTADOS ESTATÍSTICOS DO PESO DO ANIMAL

Comparando-se os animais tratados com colchicina durante 10 dias nas doses de 25, 50, 100, e 200 ug/kg, com os animais não tratados - controle - constatou-se queda significativa de peso dos animais a través da análise de variância.

As tabelas X, XI, XII, XIII, XIV, XV e XV-A, mostram os dados relativos ao peso dos animais nas diferentes doses de colchicina, bem como a análise de variância correspondente.

O mesmo foi feito com os animais tratados com colchicina durante 18 dias nas doses de 25, 50, 100 e 200 ug/kg, constatando-se também queda significativa de peso dos animais tratados em relação com os não tratados - controle.

As tabelas XVI, XVII, XVIII, XIX, XX, XXI, XXI-A, mostram os dados relativos ao peso dos animais nas diferentes doses de colchicina, bem como a análise de variância correspondente.

Comparando-se as médias dos tratamentos de 10 e 18 dias com o controle, utilizando-se o teste de Dunnett bem como uma análise de variância conjunta, constatou-se também que:

a - existe diferença significativa entre pelo menos 2 tratamentos.

b - existe diferença significativa entre os 2 experi -

mentos, isto é, de 10 e 18 dias.

c - a interação significativa indica que os efeitos dos tratamentos foram diferentes de um experimento para o outro.

Tais fatos podem ser verificados nas TABELAS XXII, XXII-A e XXII-B.

T A B E L A X

Peso (em gramas) dos animais do grupo con
trole no 1º, 4º, 7º e 10º dia de observação.

Animais	Dias. de pesagem			
	1º	4º	7º	10º
01	388	387	370	392
02	300	290	285	306
03	255	255	245	258
04	273	269	258	277
05	369	381	372	380
06	276	279	267	273
07	315	320	314	321
08	327	330	322	338
M É D I A S	312	314	304	318

T A B E L A XI

Peso (em gramas) dos animais tratados com colchicina durante 10 dias com a dose de 25 μ g/kg, no 1º, 4º, 7º e 10º dia de observação.

Animais	Dias de pesagem			
	1º	4º	7º	10º
01	296	291	294	298
02	303	298	304	304
03	315	310	322	323
04	293	286	291	295
05	284	299	291	302
06	324	332	325	320
07	253	261	262	261
08	312	325	319	327
M É D I A S	297	300	301	303

T A B E L A XII

Peso (em gramas) dos animais tratados com colchicina durante 10 dias com a dose de 50 µg/kg, no 1º, 4º, 7º e 10º dia de observação.

Animais	Dias de pesagem			
	1º	4º	7º	10º
01	333	335	334	326
02	359	381	389	361
03	343	331	333	332
04	352	350	351	348
05	334	342	353	337
06	275	273	278	274
07	316	314	317	314
08	328	324	324	323
M É D I A S	330	331	334	326

T A B E L A XIII

Peso (em gramas) dos animais tratados com colchicina durante 10 dias com a dose de 100 g/kg, no 1º, 4º, 7º e 10º dia de observação.

Animais	Dias de pesagem			
	1º	4º	7º	10º
01	311	319	316	306
02	318	315	307	307
03	315	308	303	298
04	319	320	317	311
05	307	305	302	298
06	321	314	315	310
07	384	374	364	359
08	299	301	292	286
M É D I A S	321	319	314	309

T A B E L A XIV

Peso (em gramas) dos animais tratados com colchicina durante 10 dias com a dose de 200 g/kg, no 1º, 4º, 7º e 10º dia de observação.

Animais	Dias de pesagem			
	1º	4º	7º	10º
01	369	355	342	338
02	364	364	345	344
03	326	309	303	284
04	300	297	295	289
05	331	321	308	300
06	298	288	277	273
07	289	285	277	275
08	322	310	300	294
M É D I A S	324	316	305	299

T A B E L A X V

Diferenças de peso (em gramas), do 10º dia para o 19º dia de experimento, de ratos do grupo - controle e de ratos tratados com colchicina durante 10 dias, com as doses de 25, 50, 100 e 200 ug/kg.

Animais	Controle	Tratados com colchicina			
		25 ug/kg	50 ug/kg	100 ug/kg	200 ug/kg
1	4	2	- 7	- 5	-31
2	6	1	2	-11	-20
3	3	8	-11	-17	-42
4	4	2	- 4	- 8	-11
5	11	18	3	- 9	-31
6	- 3	- 4	- 1	-11	-25
7	6	8	- 2	-25	-14
8	11	15	- 5	-13	-28
T O T A L	42	50	-25	-99	-202

TABELA XV-A

Análise de variância $\frac{1}{/}$ dos dados referentes a TABELA XV.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	4	5 567,85	1 391,96	29,26**
Resíduo	35	1 665,25	47,58	
T O T A L	39	7 233,10		

$\frac{1}{/}$ Delineamento inteiramente casualizado.

F.V. = Fonte de Variação

G.L. = Grau de Liberdade

S.Q. = Soma dos Quadrados

Q.M. = Quadrado Médio

** = Significância a 5% e 1%

* = Significância a 5%

T A B E L A XVI

Peso (em gramas) dos animais do grupo - controle no 1º, 4º, 7º, 9º, 12º, 15º e 18º dias de observação.

Animais	Dias de pesagem						
	1º	4º	7º	9º	12º	15º	18º
1	388	379	373	388	387	370	392
2	295	296	280	300	290	285	306
3	256	249	246	255	255	245	258
4	276	264	257	273	269	258	277
5	371	371	358	369	381	372	380
6	280	280	265	276	279	267	273
7	314	315	304	315	320	314	321
8	317	314	308	327	330	322	338
M É D I A S	312	308	299	313	314	304	318

T A B E L A XVII

Peso (em gramas) dos animais tratados -
com colchicina durante 18 dias com a dose de 25 ug/kg
no 1º, 4º, 7º, 9º, 12º, 15º e 18º dias de observação.

Animais	Dias de pesagem						
	1º	4º	7º	9º	12º	15º	18º
1	220	220	226	224	216	233	232
2	282	282	289	292	285	296	304
3	256	252	265	259	258	272	272
4	309	307	309	310	312	311	318
5	348	346	344	347	330	344	350
6	303	301	299	303	298	304	304
7	304	310	312	303	299	303	314
8	336	339	341	334	317	373	329
M É D I A S	295	295	298	296	289	298	302

T A B E L A XVIII

Peso (em gramas) dos animais tratados - com colchicina durante 18 dias com a dose de 50 ug/kg no 1º, 4º, 7º, 9º, 12º, 15º e 18º dias de observação.

Animais	Dias de pesagem						
	1º	4º	7º	9º	12º	15º	18º
1	378	358	367	356	338	344	355
2	320	306	310	309	293	298	301
3	323	317	324	324	302	310	315
4	367	359	354	353	330	337	342
5	330	331	325	314	303	291	277
6	298	295	291	276	282	274	261
7	340	345	347	335	326	319	305
8	296	294	279	281	269	266	256
M É D I A S	331	326	325	318	305	304	301

T A B E L A XIX

Peso (em gramas) dos animais tratados - com colchicina durante 18 dias com a dose de 100 ug/kg, no 1º, 4º, 7º, 9º, 12º, 15º e 18º dias de observação.

Animais	Dias de pesagem						
	1º	4º	7º	9º	12º	15º	18º
1	342	329	325	317	319	319	317
2	326	328	326	318	318	316	317
3	331	318	320	307	304	298	305
4	329	326	310	308	302	294	299
5	326	319	312	295	306	301	284
6	362	350	348	331	343	341	346
7	311	316	300	288	295	291	292
8	309	314	293	284	293	288	293
M É D I A S	329,4	325	317	306	310	306	307

T A B E L A XX

Peso (em gramas) dos animais tratados - com colchicina durante 18 dias com a dose de 200 ug/kg, no 1º, 4º, 7º, 9º, 12º, 15º e 18º dias de observação.

Animais	Dias de pesagem						
	1º	4º	7º	9º	12º	15º	18º
1	371	360	344	337	326	317	327
2	306	298	297	290	284	278	280
3	328	318	314	305	299	293	300
4	378	357	337	328	318	318	317
5	315	308	290	301	296	305	312
6	358	338	317	324	314	309	320
7	289	277	258	262	246	246	247
8	324	313	291	293	282	284	275
M É D I A S	334	321	306	305	296	294	297

T A B E L A XXI

Diferenças de peso (em gramas), do 18º dia para o 1º dia de experimento, de ratos do grupo - controle e de ratos tratados com colchicina durante - 18 dias, com as doses de 25, 50, 100 e 200 ug/kg.

Animais	Controle	Tratados com colchicina			
		25 ug/kg	50 ug/kg	100 ug/kg	200 ug/kg
1	4	12	-23	-25	-44
2	11	22	-19	- 9	-26
3	2	16	- 8	-26	-28
4	1	9	-25	-30	-61
5	9	2	-53	-42	- 3
6	- 7	1	-37	-16	-38
7	7	10	-35	-19	-42
8	21	- 7	-40	-16	-49
T O T A L	48	65	-240	-183	-291

TABELA XXI-A

Análise de variância 1/ dos dados referentes a TABELA XXI.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	4	13 757,35	3 439,34	22,59**
Resíduo	35	5 329,62	152,27	
T O T A L	39	19 086,98		

1/ Delineamento inteiramente casualizado.

F.V. = Fonte de Variação

G.L. = Grau de Liberdade

S.Q. = Soma dos Quadros

Q.M. = Quadrado Médio

** = Significância a 5% e 1%

* = Significância a 5%

T A B E L A XXII

Total das diferenças de peso (em gramas), do último dia para o primeiro dia do experimento, de - ratos dos grupos controles e de ratos tratados com col- chicina durante 10 e 18 dias, com as doses de 25, 50, 100 e 200 ug/kg.

Tratamentos	Total das diferenças de peso		Total de Tratamentos
	10 dias	18 dias	
0	42	48	90
25	50	65	115
50	- 25	-240	-265
100	- 99	-183	-282
200	-202	-291	-493
T O T A L	-234	-601	-835

T A B E L A XXII-A

Comparação das médias dos tratamentos
com o controle (Teste de Dunnett)

Tratamentos	10 dias	18 dias
0	5,25	6,00
25	6,25 ^{ns}	8,13 ^{ns}
50	3,13*	30,00**
100	12,38**	22,88**
200	25,25**	36,38**

** = Significância $d'_{1\%}$ e $d'_{5\%}$

* = Significância $d'_{5\%}$

Para 10 dias

$$d'_{5\%} = 7,73$$

$$d'_{1\%} = 10,14$$

Para 18 dias

$$d'_{5\%} = 13,82$$

$$d'_{1\%} = 18,14$$

T A B E L A XXII-B

Análise de variância conjunta dos dados
referentes a TABELA XXII.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	4	17 167,38	4 291,85	42,95**
Experimentos	1	1 683,62	1 683,62	16,85**
T x E	4	2 157,82	539,46	5,40**
Resíduo Médio	70	6 994,87	99,93	
T O T A L	79			

G.L. = Grau de Liberdade

S.Q. = Soma dos Quadrados

Q.M. = Quadrado Médio

F.V. = Fonte de Variação

T.E. = Tratamentos x Experimentos

** = Significância a 5% e 1%

* = Significância a 5%

C - RESULTADOS DA ANÁLISE HISTOLÓGICA DE DENTES DOS RA
TOS CONTROLE, NÃO TRATADOS COM COLCHICINA, E DAQUE
LES QUE RECEBERAM A DROGA DURANTE 10 E 18 DIAS

A face labial dos incisivos inferiores de ratos apresenta-se constituída por 4 zonas, em direção incisal: embrionária, diferenciação, secreção e pós-secreção.

O órgão do esmalte típico, ou seja, aquele formado por epitélio interno, estrato intermédio, retículo estrelado e epitélio externo, só é observado na zona embrionária e de diferenciação. Nas demais zonas, somente epitélio interno (ameloblastos secretores e pós-secretores) e estrato intermédio são visíveis.

Cortes histológicos dos dentes de ratos tratados com colchicina com todas as doses usadas neste experimento, quando comparadas com aqueles do grupo controle, a nível de microscópio óptico, não mostraram alterações citomorfológicas (Figuras 1, 2, 5 e 6).

O mesmo é válido para as células da papila, polpa e odontoblastos das zonas correspondentes ao órgão do esmalte descritas acima (Figuras 3 e 4).

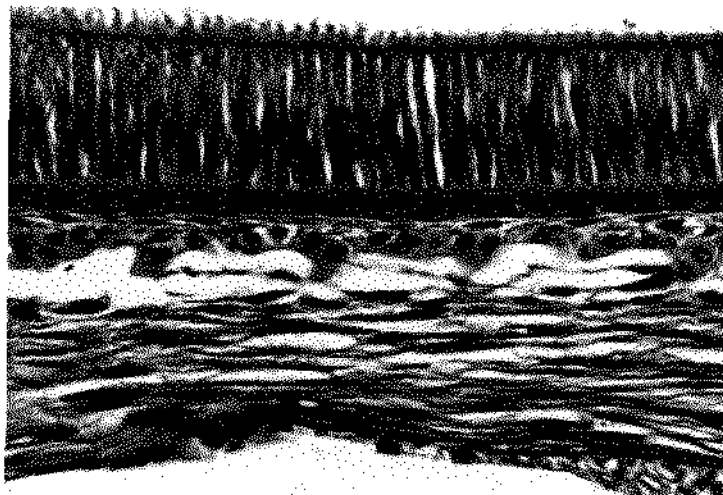


FIGURA 1 - Cortes de incisivos de dentes de ratos tra
tados com colchicina - Ameloblastos dife -
renciados.

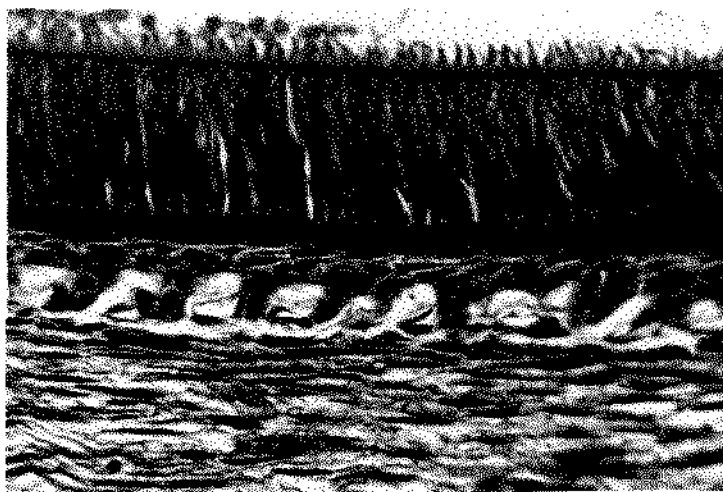


FIGURA 2 - Cortes de incisivos de dentes de ratos tra
tados - controle - Ameloblastos diferen -
ciados.

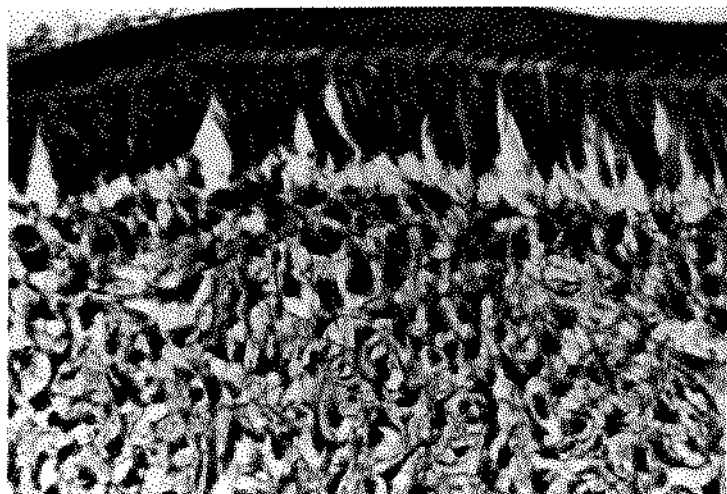


FIGURA 3 - Cortes de incisivos de dentes de ratos tratados com colchicina - Odontoblastos e dentina.

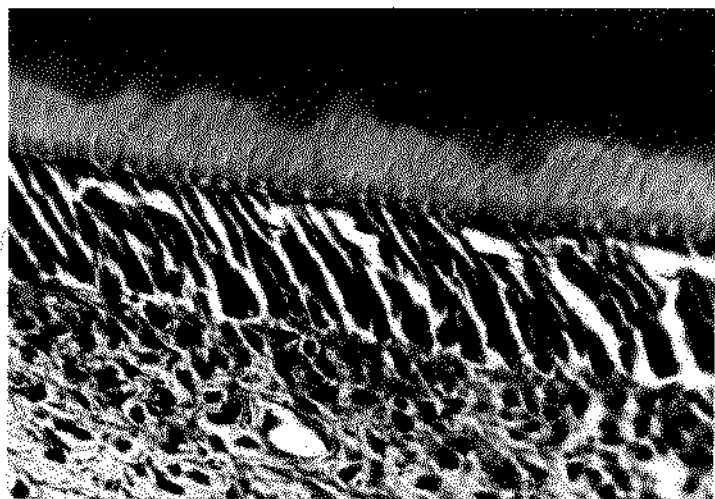


FIGURA 4 - Cortes de incisivos de dentes de ratos não tratados com colchicina - Odontoblastos e dentina.

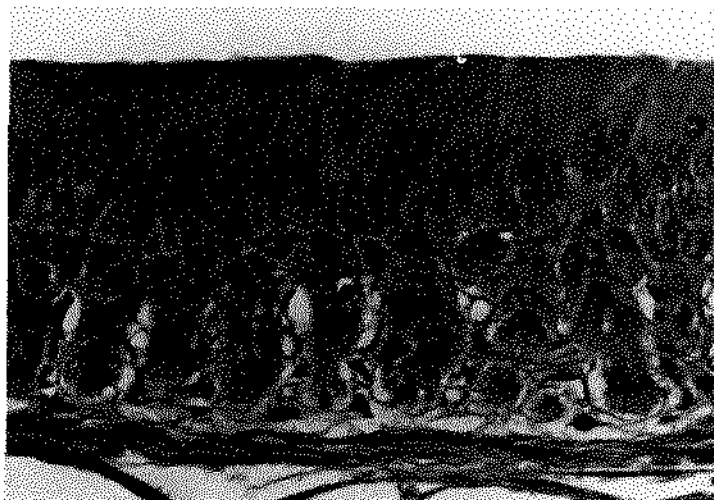


FIGURA 5 - Cortes de incisivos de dentes de ratos tratados com colchicina - Ameloblastos e pós-secretores.

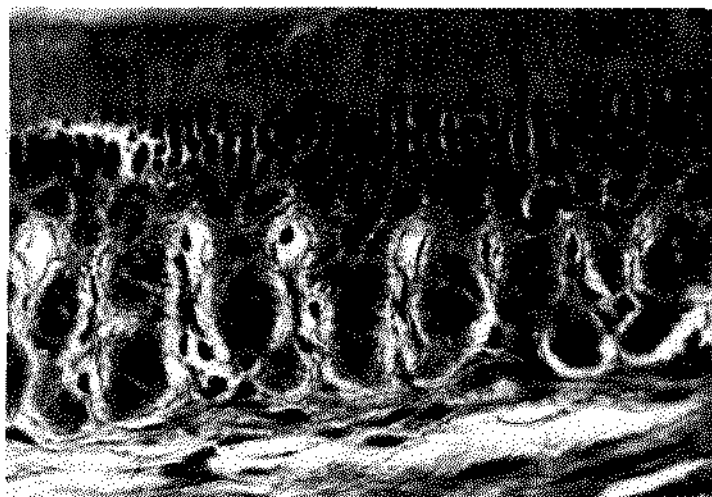


FIGURA 6 - Cortes de incisivos de dentes de ratos não tratados - controle - Ameloblastos e pós-secretores.

V - D I S C U S S Ã O

Enquanto grande parte da anatomia e função do incisivo dos roedores é conhecida, muito se discute a respeito de como se processa seu contínuo crescimento, e quais as células responsáveis por tal crescimento.

Foram assinalados porém, a distribuição de mitoses dos vários tecidos do dente e os locais de proliferação celular nos incisivos do coelho (NESS & SMALE, 1959) e do rato (CHIBA, 1966).

A significativa diferença encontrada entre o crescimento dos incisivos inferiores de ratos do grupo controle e de grupos tratados com colchicina, no presente trabalho, vem constatar a atividade inibitória da droga na velocidade de crescimento dos tecidos dentários, por sua capacidade de bloquear a divisão celular.

No grupo controle, o crescimento dentário se encaixou dentro dos padrões de normalidade descritos por FARRIS (1971) e se comparou aqueles encontrados por MASSINI (1976) e RANALI (1976), o que possibilitou uma comparação válida com os animais tratados com o antimitótico. As condições de alimentação e manutenção dos animais, com a mesma idade ao início das experiências, foram padronizadas e rigorosamente mantidas desde o início até o final do experimento, sendo que

tanto os animais controle como os tratados mantiveram - constância de peso.

Como a colchicina demonstrou visível inibição do crescimento dentário, tais resultados vêm contribuir para confirmar as descobertas de CHIBA et alii (1968) o qual registrou a cessação da erupção dentária, mantendo-se a dose de demecolcina por um dia.

É de se acentuar que o método utilizado, embora simples, mostrou-se bastante sensível, podendo-se detectar os efeitos da colchicina com doses bastante inferiores às de demecolcina utilizadas por MAIN & ADAMS (1966), o qual não detectou diminuição significativa da erupção do dente. Resta deixar bem claro porém, que a demecolcina, apesar de possuir a mesma ação antimitótica da colchicina, tem atividade reduzida por ser menos tóxica, permitindo o emprego de doses maiores. Isto porém não invalida nossa comparação, pois mesmo com doses maiores, seus resultados não foram significantes.

A inibição do crescimento dentário causado pela administração da colchicina, parece dar a mesma evidência experimental ao fato de que nas forças que determinam a erupção do dente resultam de uma proliferação celular (e.g. SICHER, 1942).

A colchicina se liga a subunidades proteicas dos microtúbulos, impedindo a sua polimerização para formar microtúbulos. Logo a colchicina suprime a formação do fuso mitótico, bloqueando a divisão celular na metáfase. Isto leva a supor que o antimitótico agiu afetando a secreção funcional dos odontoblastos, por in

terferir com a função dos microtúbulos, confirmando os estudos de KUDO (1975).

Achado interessante e de difícil explicação, e que a atividade inibitória do crescimento dentário demonstrada pela colchicina, (a não ser no grupo tratado por 18 dias, ao 79 dia de observação do crescimento dentário). As doses utilizadas foram extremamente reduzidas, não provocando o aparecimento de sinais de intoxicação ou perda do peso. Sabe-se, efeitos adversos podem ocorrer no homem com doses de 1 mg ao dia.

O exame histológico realizado em macroscopia óptica não permitiu a observação de qualquer alteração citomorfológica na região embriológica, diferenciação e secreção e pós secreção do incisivo do rato, comparando-se destes tratados com dentes controle. Este fato leva à suposição de que a colchicina inibiu o crescimento dentário por atuar em níveis mais precoces do desenvolvimento tissular.

VI - CONCLUSÕES

O crescimento dentário dos ratos tratados com colchicina, nas doses diárias de 25, 50, 100, 200 ug/kg, durante 10 e 18 dias foi significativamente menor quando comparado com os ratos do grupo controle. Não houve diferença significativa de crescimento entre tratamento de 10 e o de 18 dias, e nem entre as diferentes doses de colchicina, com exceção das respostas obtidas, no 7º dia de tratamento durante 18 dias.

Houve concomitantemente, queda significativa (1% e 5%) de peso, tanto nos animais tratados com colchicina durante 10 dias como durante 18 dias, quando comparados com o controle, com exames da dose de 50 mg/kg durante 10 dias quando foi significativa somente a 5%. O tratamento durante 18 dias provocou queda mais acentuada no peso dos animais.

VII - R E F E R Ê N C I A S B I B L I O G R Á F I
C A S

ADELMAN, M.R.; BORISY, G.O.; SHELANSKI, M.L.; WEISEM-
BERG, R.C.; TAYLOR, E.W. Cytoplasmic filaments and
tubules. End. Proc., 27:1186-1193, 1968.

AMOROSO, E.C. Colchicine and tumor growth. Nature,
135:266-267, 1935.

BORISY, G.G.; TAYLOR, E.W. The mechanism of action of
colchicine: Binding of colchicine-³H to cellular -
protein. J. Cell. Biol., 34:525-533, 1967a.

BORISY, G.G.; TAYLOR, E.W. The mechanism of action of
colchicine: Colchicine binding to sea urchin eggs
and the mitotic apparatus. J. Cell. Biol., 34:535
-548, 1967b.

CALADRESE, P.; WELCH, A.D. Chemotherapy of neoplastic
diseases. Ann. Rev. Med., 13:147, 1962.

CHIBA, M. Cellular proliferation in the tooth germ
of the rat incisor. Arch. Oral Biol., 10:707-718,
1965.

CHIBA, M.; NAKAGAWA, K.; MIMURA, T. Estimation of
mitotic rate and mitotic duration in the internal
enamel epithelium of the rat maxillary incisor -
using a colchicine technique. Arch. Oral Biol., -

11(9):803-814, 1966.

CHIBA, M.; NARRAWAY, J.M.; NESS, A.R. Impeded and -
unimpeded eruption of the mandibular incisor of
the adult rat and its stoppage by demecolcine. J.
Dant. Res., 47:986, 1968. IN: Berkovitz, B.K.B.
The effect of demecolcine and of triethanamelamine
on the unimpeded eruption rate of normal and root
resected incisor teeth in rods. Archs. Oral Biol.,
17:937-947, 1972.

CORBETT, C.E. Farmacodinâmica. Quinta edição - Rio
de Janeiro - Guanabara - Koogan, 1977.

DIEGELMANN, R.F.; PETERKOESKY, B. Inhibition of col-
lagen secretion from bone and cultured fibroblasts
by microtubular disruptive drugs. Proc. Nat. Acad.
Sci., 69:892-896, 1972.

EIOSTI, O.J.; DUSTIN, P.JR. Colchicine in Agricultu-
re, Medicine, Biology and Chemistry. Iowa State -
College Press, Ames, Iowa, 1955. IN: New aspects
of the pharmacology of antimitotic agents. Pharma
cology Rev., 15:449-480, 1963.

FARRIS, E.J. & CRIFFITH, JR.J.Q. The rat in laborato
ry investigation. New York, Hafner, 1971. 542 p.

GILLESBIE, E.; LEVIME, R.J.; MALAWISTA, S.E. Histami
ne release from rat peritoneal mast cells: Inhibi-
tion by colchicine and potentiation by deuterium -
oxide. J. Pharmacol. exp. Ther., 164:158-165, 1968.

- GOODMAN, L.S. & GILMAN, A., eds. As bases farmacológicas da terapêutica. 4. ed. - Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 1973. 1596 p.
- KUDO, N. Effect of Colchicin on the Secretion of matrices of Dostine and Examel in the Rat Incisor: An Autoradiographic Study Using (^3H)-Proline. Calcif. Tiss. Res., 18:37-46, 1975.
- LACY, P.E.; WALKER, M.M. FINK, C.J. Perifusion of isolated rat islets in vitro: Participation of the microtubular system in the biphasic release of insulin. Diabetes, 21:987-998, 1972.
- LITS, F.J. Contribution à l'étude des réactions cellulaires provoquées par la colchicine. C.r. Séanc. Soc. Biol., 115:1421-1423, 1934.
- MASSINI, N. Estudo do crescimento dentário em ratos tratados com Ciclofosfamida (Enduxan^(R)). Piracicaba, 1976, Tese (Mestrado) F.O.P.
- MAIN, J.H.P.; ADAMSON, D. Experiments on the rat incisor into the cellular proliferation and blood-pressure theories of tooth eruption. Arch. Oral. Biol. 11:163-178, 1966.
- NEES, A.R.; SMALE, D.E. The distribution of mitoses and cells in the tissues bounded by the socket wall of the rabbit mandibular incisor. Proc. roy. Soc. p. 151: 106-128, 1959.

- OGURA, H. Studies on inhibitory action of drugs on development of dentine. Hard Tissue Research. p. 561-591, 1969.
- OBRIEN, C.; BHASKAR, S.H.; BRODIE, A.G. Eruptive mechanism and movement in the first molar of the rat. J. Dent. Res., 37:467-484, 1958.
- PERNICE, IN: Goodman, L.S. As bases farmacológicas da terapêutica. 4ª edição. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 1973. 1596 p.
- RANALI, J. Influência da Ametopterina (methotrexato^(R)), sobre o crescimento dentário dos incisivos inferiores de ratos. Tese para obtenção do grau de mestre em Farmacologia na Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP - 1976.
- RUCH, J.V.; KARCHER-DJURICIC, V.; STAURLI, A.; FABRE, M. Effects de la Cytochalasine P et de la Colchicine sur les cytodifférenciations dentaires in vitro. Archivos d'Anatomie microscopique, 64:113-134, 1975.
- SCOTT, J.H. How teeth erupt. Dent. Practit, 3:345-350, 1953.
- SICHER, H. Tooth eruption: The axial movement of continuously growing teeth. Dent. Res., 21: 201-210, 1942.
- STURMAN, G.D. A study of the eruption rate mandibular incisor. Yale Journal of Biology and Medicina, 30:

137-148, 1957.

TJIO JOE HIN; LEVAN, A. The chromossome number of man. Hereditas, 42: 1-6, 1956.

WARSHAWISKY, H. A light and electron microscopic study of the nearly mature enamel of rat incisors. The Anatomical Record., 159:559-584, 1971.

WILLIAMS, J.A.; WOLFF, J. Possible role of microtubules in thyroid secretion. Proc. nat. Acad. Sci., 67:1901-1908, 1970

WISNIEWSK, H.; SHELANSKI, M.L.; TERRY, R.D. Effect of mitotic spindle inhibitors on neurotubules and neurofilaments in anterior horn cells. J. Cell. Biol. 38:224-229, 1968.