

# **EFEITOS DA AÇÃO DA CICLOFOSFAMIDA ADMINISTRADA DURANTE A PREENHEZ NO DESENVOLVIMENTO DE MOLARES DE FETOS DE CAMUNDONGOS**

Maria Tereza Giroto MATHEUS\*  
Sebastião HETEM\*\*  
Oswaldo Marques GUIMARÃES NETO\*\*\*  
Zuleice Viana da SILVEIRA\*

- **RESUMO:** Com a finalidade de se verificar a ação transplacentária da ciclofosfamida, camundongos fêmeas prenhes foram injetadas com 30 mg ou com 50 mg/kg de peso corporal, no 12º dia de gestação. Os animais foram sacrificados 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a injeção ou os filhotes, 3 dias após o nascimento. Os resultados mostraram que a ciclofosfamida retarda o desenvolvimento dos germes dentais de forma reversível na dose de 30 mg, porém, com a dose de 50 mg, produz efeitos irreversíveis, levando inclusive à morte dos filhotes. Confirma-se que seus efeitos são proporcionais à dose empregada.
- **PALAVRAS-CHAVE:** Germe de dente; molar; ciclofosfamida, ação transplacentária.

## **Introdução**

A administração de ciclofosfamida em camundongos fêmeas prenhes produz alteração de morfologia dos dentes incisivos nos fetos, levando à formação de germes dentais hipodesenvolvidos em função tanto da idade fetal quanto da dose empregada.<sup>15</sup> Administrada em ratas grávidas, provoca alterações histomorfológicas que, embora já descritas em animais adultos, são mais intensas e freqüentes nos filhotes.<sup>11</sup> Quando administrada em camundongos hospedeiros, que receberam implantes intra-oculares de germes dentais de molares de fetos da mesma espécie, determina alterações na morfogênese dental e formação de órgãos dentais hipodesenvolvidos, na proporção direta da idade fetal e da dose empregada.<sup>16</sup> O propósito deste trabalho

---

\* Departamento de Morfologia – Faculdade de Odontologia UNESP – 16015-050 – Araçatuba – SP.

\*\* Departamento de Morfologia – Faculdade de Odontologia UNESP – 14801-903 – Araraquara – SP.

\*\*\* Estagiário do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP. Bolsista FAPESP – Proc. nº 84/1681-7.

é verificar, histologicamente, a influência da administração de ciclofosfamida, na dose de 30 e 50 mg/kg de peso durante o período de gestação, sobre o desenvolvimento do germe dental de molares de camundongos.

## Material e método

Neste trabalho foram utilizados 36 camundongos-fêmeas, prenhes, (*Mus musculus* - var. albino Swiss) que com aproximadamente 60 dias de idade foram acasaladas na proporção de duas fêmeas para um macho, durante 14 horas. No 12º dia de prenhez, as fêmeas foram divididas em três grupos, assim distribuídos: animais que receberam uma única injeção intraperitoneal, de 0,2 ml de água destilada (controle); animais que receberam, intraperitonealmente, uma única dose de 30 mg ou 50 mg/kg de peso corporal de ciclofosfamida\* diluída em 0,2 ml de água destilada (tratados).

Após 24, 48, 72, 96 e 120 horas da administração da droga, 30 fêmeas, prenhes, foram sacrificadas por deslocamento cervical, sendo em número de 6 fêmeas por período: duas controle, duas que receberam 30 mg e duas que receberam 50 mg/por kg de peso corporal de ciclofosfamida (tratadas). Após o sacrifício, retirou-se o útero, os fetos foram removidos e efetuou-se a confirmação da idade com base em critérios morfológicos descritos por Gruneberg.<sup>9</sup>

Os filhotes de 6 camundongos-fêmeas, sendo 2 controle e 4 tratados - 2 com 30 mg e 2 com 50 mg/Kg de peso corporal de ciclofosfamida - foram sacrificados com 3 dias de idade, por deslocamento cervical. Tanto os fetos quanto os filhotes tiveram suas cabeças fixadas em formalina neutra a 10%, descalcificadas em solução de citrato de sódio a 20% e ácido fórmico a 50%, em partes iguais.<sup>17</sup>

Para a análise histológica dos molares, as cabeças foram incluídas em parafina, de modo a fornecerem cortes frontais, e foram obtidos cortes seriados, com 6 micrometros de espessura, corados pela hematoxilina-eosina.

## Resultados

### Molares dos animais sacrificados 24 horas após a injeção

Os germes dentais dos animais-controle (Figura 1) e dos tratados com 30 mg de ciclofosfamida (Figura 2) encontravam-se em fase de botão. As células periféricas da invaginação epitelial eram altas e organizadas. As células centrais dos botões dentais

---

\* Enduxan - Laboratório Pravaz-Recordati.

eram indiferenciadas, uniformemente distribuídas e ao seu redor havia uma condensação de células mesenquimais. Figuras de mitose foram identificadas, tanto nas estruturas epiteliais quanto nas mesenquimais dos animais-controle.

Nos animais tratados com 50 mg de ciclofosfamida (Figura 3), os germes dentais mostravam-se em fase de botão, verificando-se casos em que o desenvolvimento estava um pouco mais atrasado. Verificou-se uma invaginação de tecido epitelial no tecido subjacente e uma condensação maior de células mesenquimais ao seu redor.

### **Molares dos animais sacrificados 48 horas após a injeção**

Os germes dentais dos animais-controle estavam na fase inicial de capuz. Eram constituídos por células altas na periferia e por células indiferenciadas e uniformemente distribuídas na sua porção central. Ao redor do germe dental havia uma condensação maior de células mesenquimais. Figuras de mitose foram identificadas tanto nas estruturas epiteliais quanto nas mesenquimais.

Nos animais tratados com 30 mg de ciclofosfamida, os germes dentais apresentavam-se sob a forma de botão, de modo semelhante ao descrito para os animais sacrificados 24 horas após a administração da droga, ou na fase inicial de capuz. Havia condensação de células mesenquimais nas proximidades do órgão do esmalte, particularmente no interior de sua concavidade.

Nos animais tratados com 50 mg de ciclofosfamida, os germes dentais apresentavam-se em fase de botão que pouco diferia da dos animais sacrificados 24 horas após a administração da droga. Houve variações nesse grupo e puderam ser vistos germes dentais em fase de botão menos evoluída. Os germes compunham-se de uma invaginação de tecido epitelial no tecido subjacente e havia uma concentração de células mesenquimais ao seu redor.

### **Molares dos animais sacrificados 72 horas após a injeção**

Os germes dentais dos animais-controle (Figura 4) apresentavam-se em fase final de capuz. As células das camadas ameloblástica e odontoblástica não estavam totalmente diferenciadas, sendo que a papila dental era ricamente vascularizada. Visualizavam-se porções do saco dental e presença de trabéculas ósseas, em algumas áreas.

Nos animais tratados com 30 mg de ciclofosfamida (Figura 5), os germes dentais apresentavam-se na fase inicial de capuz, de modo semelhante aos animais analisados 48 horas após a administração da droga.

Nos animais tratados com 50 mg de ciclofosfamida (Figura 6), os germes dentais encontravam-se em fase inicial de capuz. As células da papila dental estavam uniformemente distribuídas e sem diferenciação celular.

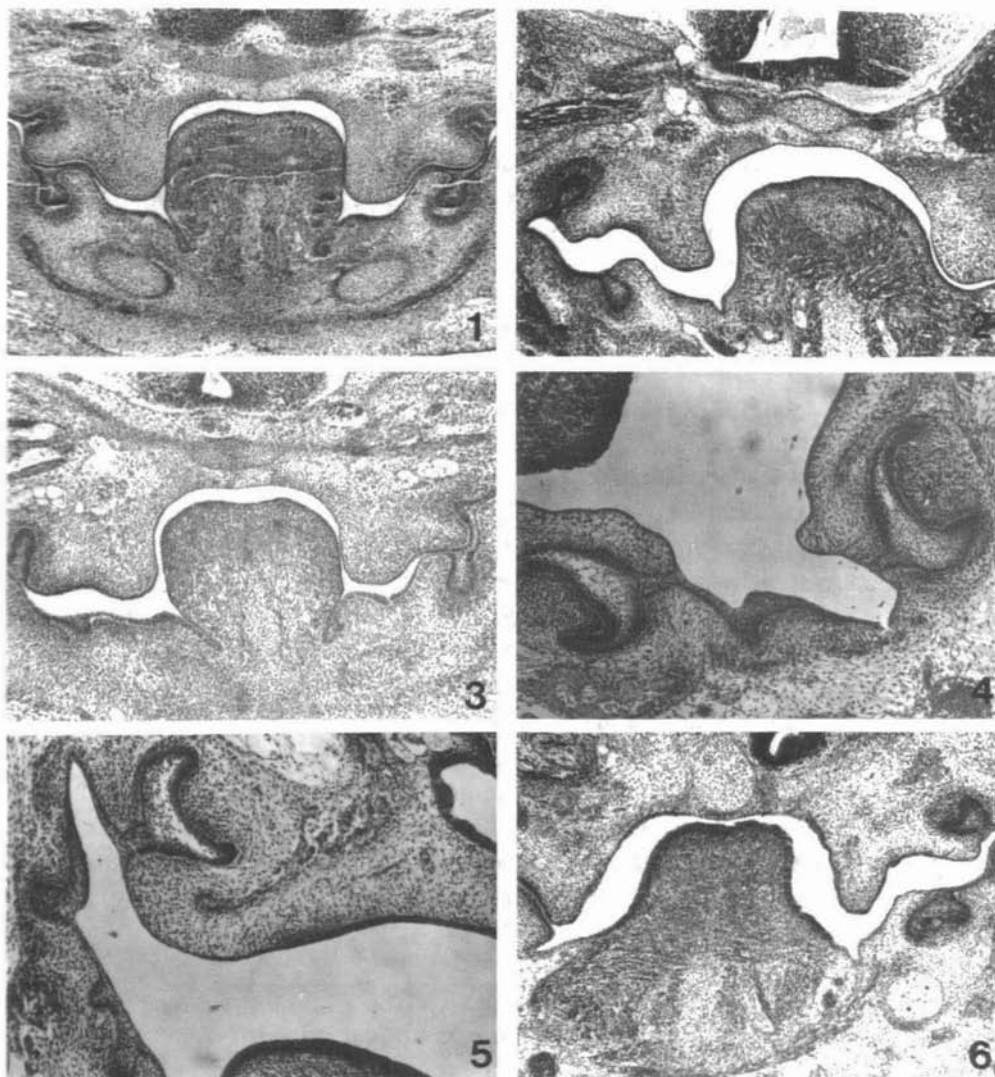


FIGURA 1 - Animal-controle - sacrifício 24 horas após a injeção de água destilada. HE. 32X.

FIGURA 2 - Animal tratado - injetado com 30 mg/kg de ciclofosfamida e sacrificado 24 horas após a injeção. HE. 32X.

FIGURA 3 - Animal tratado - injetado com 50 mg/kg de ciclofosfamida e sacrificado 24 horas após a injeção. HE. 32X.

FIGURA 4 - Animal-controle - sacrifício 72 horas após a injeção de água destilada. HE. 63X.

FIGURA 5 - Animal tratado - injetado com 30 mg/kg de ciclofosfamida e sacrificado 72 horas após a injeção. HE. 63X.

FIGURA 6 - Animal tratado - injetado com 50 mg/kg de ciclofosfamida e sacrificado 72 horas após a injeção. HE. 32X.

## **Molares dos animais sacrificados 96 horas após a injeção**

Os germes dentais dos animais-controle encontravam-se em fase de campânula. Os ameloblastos eram células altas com núcleos alongados. Os odontoblastos eram células cilíndricas baixas e com núcleos irregularmente distribuídos. O saco dental apresentava células achatadas dispostas paralelamente entre si e ao redor do germe dental. Trabéculas ósseas estavam presentes a alguma distância dos germes dentais. Figuras de mitose foram identificadas tanto no tecido conjuntivo quanto no epitelial.

Nos animais tratados com 30 mg de ciclofosfamida, os germes dentais apresentavam-se em fase de campânula. Eram distintas as estruturas do órgão do esmalte. O epitélio interno possuía células altas com núcleos alongados; a papila dental não mostrava elementos diferenciados. Ao redor do órgão do esmalte, células achatadas formavam um esboço do saco dental. A alguma distância do germe dental, havia trabéculas ósseas dispostas irregularmente.

Nos animais tratados com 50 mg de ciclofosfamida os germes dentais estavam em fase inicial de campânula. As células do epitélio interno eram altas e com núcleos em diferentes posições; os odontoblastos possuíam núcleos de forma irregular e situados em diferentes níveis. Perifericamente à papila e ao órgão do esmalte, havia uma camada formada por células achatadas, além de algumas trabéculas ósseas. Figuras de mitose foram identificadas tanto nas estruturas epiteliais quanto nas conjuntivas.

## **Molares dos animais sacrificados 120 horas após a injeção**

Os germes dentais dos animais-controle (Figura 7) apresentavam todos os seus componentes diferenciados, sendo o retículo estrelado mais espesso nas áreas intercuspídicadas. Uma delgada faixa de dentina, seguida de uma de pré-dentina, foi identificada. Os odontoblastos eram células altas, com núcleos basais. Circundando o germe dental havia algumas fileiras de células orientadas paralelamente à superfície e, mais externamente, encontravam-se áreas de tecido ósseo esponjoso.

Nos animais tratados com 30 mg de ciclofosfamida (Figura 8), os germes dentais encontravam-se em fase de campânula. Circundando o germe dental havia algumas fileiras de células organizadas paralelamente à sua superfície e, externamente a estas, identificava-se um trabeculado ósseo.

Nos animais tratados com 50 mg de ciclofosfamida (Figura 9), os germes dentais apresentavam-se em fase de campânula um pouco mais adiantada do que no período anterior. Os ameloblastos apareciam alongados, com núcleos situados em diferentes níveis das células. Os odontoblastos eram células cilíndricas baixas com núcleos arredondados. As estruturas do saco dental, formadas por células e substância intercelular, dispunham-se paralelamente entre si e à superfície do germe dental. Trabé-

culas de tecido ósseo estavam presentes a alguma distância do germe dental. Figuras de mitose foram observadas tanto nas estruturas epiteliais quanto nas conjuntivas.

### **Molares dos filhotes sacrificados 3 dias após o nascimento**

Os germes dentais dos animais-controle (Figura 10) apresentavam-se bem constituídos. A camada odontoblástica mostrava variações na altura das células, conforme a região considerada, sendo baixa nas áreas carentes de esmalte. A camada de esmalte depositada era espessa e, subjacente a ela, havia dentina e pré-dentina. Circundando o órgão dental encontrava-se o saco dental e, externamente a ele, trabéculas ósseas.

Nos animais tratados com 30 mg de ciclofosfamida (Figura 11), os germes dentais apresentavam-se bem constituídos e aproximavam-se da fase de desenvolvimento dos órgãos dentais dos animais-controle, sendo porém menos maduros.

Não foi possível analisar os germes dentais dos molares dos animais tratados com 50 mg de ciclofosfamida, nesse período, uma vez que os mesmos não se tornaram viáveis pela ação da droga.

### **Discussão**

As pesquisas são predominantemente em incisivos pelo fato deste grupo dental possuir uma característica considerada de grande importância, ou seja, são dentes de crescimento contínuo, em razão do que apresentam, em qualquer momento, células em diferentes estágios de desenvolvimento. Nessas circunstâncias é possível observar-se, num mesmo dente, desde estruturas embrionárias até estruturas maduras, o que, evidentemente, traz uma série de vantagens quando raciocinamos em termos de estudos experimentais já que, em curto espaço de tempo, podem ser obtidos resultados.<sup>14</sup>

A nosso ver, se de um lado os fatos mencionados são vantajosos, de outro merecem algumas restrições, pois, se toda pesquisa visa, em última instância, à sua extrapolação para a espécie humana e se não existe no homem grupo dental de crescimento contínuo, seria recomendável também a utilização de grupos dentais que mais se aproximassem daqueles existentes na dentição humana, e os molares, não sendo de crescimento contínuo, constituem-se em modelo biológico que mais se aproxima dos padrões de desenvolvimento dos dentes humanos.

Contudo, apesar dos muitos atributos dos molares de camundongos que os tornam mais adequados para investigações dentais, pouca atenção tem sido dada a eles em comparação àquela dada aos do rato,<sup>7</sup> e, embora alguns estudos tenham sido realizados utilizando germes dentais de camundongos,<sup>10,14,16,22,\*</sup> o rato ainda continua

---

\* Hetem, S. Comunicação pessoal (dados ainda não publicados).

a ter a preferência dos pesquisadores como modelo de estudo para o desenvolvimento de órgãos dentais em várias condições experimentais, inclusive no que diz respeito à análise do efeito de drogas, *in vivo* ou *in vitro*.<sup>3,6,11,18,19,20,25,27</sup>

As drogas usadas sistemicamente, com finalidade terapêutica, podem atuar sobre as estruturas em desenvolvimento, *in vivo*, mesmo que essa não seja a razão de sua administração; da mesma forma, a ação também se faz sentir sobre o desenvolvimento de órgãos *in vitro*, quando adicionadas ao meio de cultura.

No nosso caso específico, foi utilizada a ciclofosfamida, um agente alquilante que age bloqueando a duplicação do DNA.

Dessa forma, podemos admitir que, sendo uma droga que age principalmente sobre as células de grande atividade proliferativa,<sup>1,27</sup> exerça sua ação sobre os germes dentais.

Na fase em que foi administrada a droga no 12º dia de vida intra uterina, os germes dentais de molares estavam em pleno desenvolvimento embrionário, e a fração proliferativa nessa época era, presumivelmente, bastante alta, dada a intensa vascularização da área. Supõe-se que sua ação tenha sido exercida imediatamente. A ciclofosfamida tem ação citotóxica e, após sua injeção, leva 15 minutos para se transferir para os tecidos,<sup>5</sup> e aproximadamente 16 minutos para atingir o feto, após sua administração à mãe.<sup>21</sup> Assim, admite-se que no nosso caso a sua ação tenha sido exercida poucos minutos após sua administração.

Também a via de administração é importante para se averiguar o tempo necessário para se ter uma concentração máxima, que varia de 15 minutos, quando injetada,<sup>5</sup> a 1 hora, quando administrada oralmente, sendo nesse caso sua vida média de 6 a 7 horas, no plasma;<sup>2</sup> por outro lado, aproximadamente 70% de seus metabólitos são excretados 4 horas após a administração intraperitoneal, em dose única.<sup>13</sup>

Assim sendo, a ciclofosfamida é uma droga citotóxica que atua através de seus metabólitos, 30 minutos após a sua administração, com 95% do poder alquilante,<sup>4</sup> durante todo o tempo em que é administrada,<sup>24</sup> agindo sobre células com alta fração proliferativa,<sup>8</sup> bloqueando a duplicação do DNA de forma completa, resultando na morte celular, ou de forma incompleta, possivelmente resultando em mutações<sup>26</sup> e que deve ter agido de imediato sobre os tecidos fetais.

Tais observações justificam plenamente a porcentagem dos germes dentais que não se desenvolveram, tanto para animais tratados com 62,5 mg/kg quanto para tratados com 125 mg/kg de peso corporal de ciclofosfamida.<sup>14</sup> A diferença das porcentagens de germes dentais que se desenvolveram, em função e em ordem inversamente proporcional à dose de ciclofosfamida administrada,<sup>16</sup> pode estar ligada ao fato de que, mesmo em dose única, esta droga tem ação diretamente proporcional à dose administrada<sup>12</sup> e causa um efeito danoso sobre os dentes em desenvolvimento, de forma temporária.<sup>23</sup>

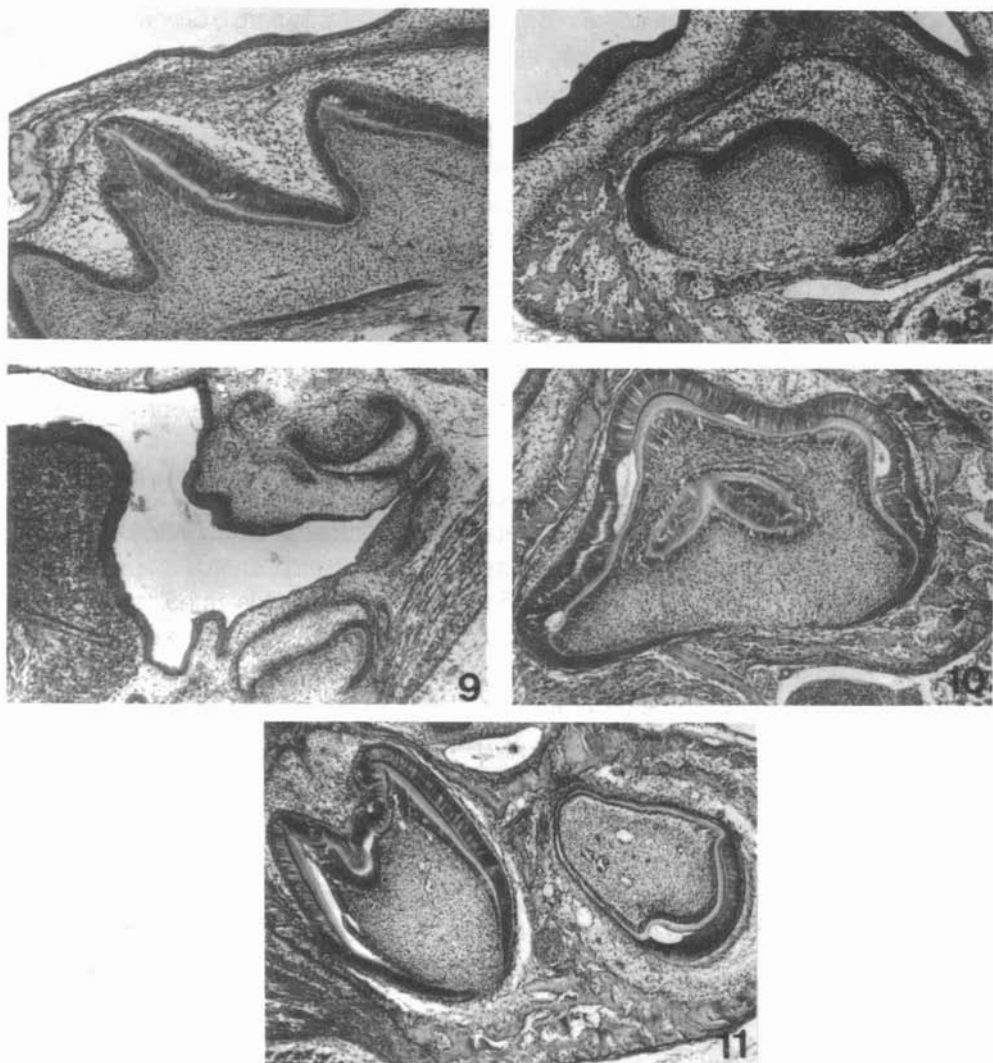


FIGURA 7 - Animal-controle - sacrifício 120 horas após a injeção de água destilada. HE. 100X.

FIGURA 8 - Animal tratado - injetado com 30 mg/Kg de ciclofosfamida e sacrificado 120 horas após a injeção. HE. 100X.

FIGURA 9 - Animal tratado - injetado com 50 mg/kg de ciclofosfamida e sacrificado 120 horas após a injeção. HE. 63X.

FIGURA 10 - Animal-controle - mãe injetada com água destilada e sacrificado 3 dias após o nascimento. HE. 100X.

FIGURA 11 - Animal tratado - mãe injetada com 30 mg/kg de ciclofosfamida e sacrificado 3 dias após o nascimento. HE. 100X.



Nossos resultados corroboram o descrito acima, pois, ao analisar-se o desenvolvimento dos germes dentais de molares, ficou evidente que houve um retardo na maturação das suas estruturas, quando confrontados os resultados dos animais que receberam injeções de 50 mg com os que receberam de 30 mg de ciclofosfamida e destes com os controles. Além do que, sendo uma droga antimetabólica e acíclica, inibe as células em qualquer estágio de diferenciação, e tal fato deve estar relacionado com a própria dosagem, uma vez que há diferenças quando se comparam os resultados obtidos entre animais que receberam doses maiores e menores, e desta forma a ação da droga é diretamente proporcional à dosagem aplicada. Quanto maior a dose, maior a quantidade de células afetadas e maior a extensão do dano.

A extensão pode ser de tal magnitude que chega a não permitir o desenvolvimento de germes implantados.<sup>14</sup> Também podem não ser viáveis os animais que receberam dosagens de 50 mg/kg de peso corporal da droga, o que nos impossibilita completar a análise nos animais 3 dias após o nascimento, uma vez que, ou foram abortados, ou nasceram com vida e devido a malformações generalizadas não foram viáveis.

De acordo com os nossos resultados, os germes dentais dos molares dos animais que receberam 30 mg/kg de peso corporal de ciclofosfamida apresentaram um retardo no desenvolvimento, nos períodos iniciais de 24, 48 e 72 horas entretanto, nos períodos de 96, 120 horas (feto) e 3 dias após o nascimento (filhotes), o desenvolvimento se fez de maneira muito semelhante ao verificado nos animais-controle. Por outro lado, nos animais que receberam 50 mg/kg de peso corporal da droga, o desenvolvimento foi quase que completamente inibido.

Os resultados observados neste trabalho confirmam as afirmativas sobre as propriedades citotóxicas da ciclofosfamida, que, apesar de possibilitar um desenvolvimento tardio de algumas estruturas, leva à dedução de que seus efeitos, nas condições utilizadas, são totalmente irreversíveis, quando se utiliza a dosagem de 50 mg/kg. Pode-se inferir também que a administração da droga, em doses sucessivas e com prescrição adequada, deve ocasionar o impedimento total do desenvolvimento de órgãos ou estruturas, devido à ação no nível celular. Como é uma droga que também pode ser utilizada, com reservas, pelas suas propriedades imunossupressoras, necessário se faz que ambas as propriedades sejam analisadas em conjunto, abrindo assim perspectivas para novos estudos que poderão contribuir para o conhecimento dos efeitos orgânicos da ciclofosfamida e minimizar, inclusive, seus efeitos colaterais, para uma melhor tolerância pelo indivíduo que necessite utilizá-la.

## **Conclusão**

A ciclofosfamida administrada em dose única de 50 mg/kg de peso corporal causa efeitos irreversíveis ao desenvolvimento dos germes dentais de molares; na dose

de 30 mg/kg, seus efeitos não são tão drásticos, pois, apesar de causar um retardo nos períodos iniciais de observação, permite uma retomada do desenvolvimento e uma recuperação quase que total do germe dental aos três dias de idade. Nossos resultados comprovam que os efeitos ocasionados são diretamente proporcionais à dose empregada.

## Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp), pelo auxílio concedido, que possibilitou a aquisição de parte do equipamento utilizado neste trabalho (Proc. 89/3958/0 e 84/1681-7), e pela Bolsa de Iniciação Científica (Proc. 85/2972-8); ao CNPq, pela concessão da Bolsa de Pesquisa ao prof. Sebastião Hetem (Proc. nº 301761/85-0(RE)).

Aos funcionários da Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba – UNESP: Sandra A. dos Santos, Marilde N. M. Bento, Ilda A. Teixeira, pelo auxílio na parte técnica, Araci A. dos Santos, pelo auxílio na parte fotográfica e Lúcia S. Esgalha, pelo trabalho datilográfico.

MATHEUS, M. T. G. et al. Effects of cyclophosphamide administered during gestational period on molar tooth germ development. *Rev. Odontol. UNESP*, v. 23, n. 1, p. 9-20, 1994.

- **ABSTRACT:** *With the aim to verify the transplacentally effects of cyclophosphamide, pregnant mouse females were injected with 30 mg or 50 mg/kg body weight of cyclophosphamide, at the 12<sup>th</sup> day of gestation. The animals were sacrificed 24, 48, 72, 96 and 120 hours after the drug administration on the offsprings 3 days after birth. The results showed a reversible delay of tooth germ development with the use of 30 mg/kg of body weight but when 50 mg/kg was used irreversible effects were found producing, also, death of the offsprings. There, the results confirm that the effects found are in direct ratio of the used dose.*
- **KEYWORDS:** *molar; tooth germs; cyclophosphamide.*

## Referências bibliográficas

1. BACH, J. F. et al. Pharmacologie des immunosuppresseurs. *G. M. France*, v. 78, p. 27-44, 1971.
2. BAGLEY JUNIOR, C. M., BOSTECK, F. W., De VITA JR., V. T. Clinical pharmacology of cyclophosphamide. *Cancer Res.*, v. 33, p. 226-33, 1973.

3. BASTOS-RAMOS, W. P. et al. Drogas antimitóticas e desenvolvimento de incisivos inferiores de ratos: estudos com o 5-fluouracil. *Rev. Odontol. UNESP*, v. 21, p. 11-24, 1992.
4. BROCK, N. Pharmacologic characterization of cyclophosphamide and cyclophosphamide metabolites. *Cancer Chem. Rep.*, v. 51, p. 315-25, 1967.
5. BROCK, N. HOHORST, H. J. Metabolism of cyclophosphamide. *Cancer*, v. 20, p. 900-4, 1967.
6. CASSONI, T. et al. Estudo da respiração celular em germes dentários de ratos. *Rev. Odontol. UNESP*, v. 20, p. 63-6, 1991.
7. COHN, S. A. Development of the molar teeth in the albino mouse. *Am. J. Anat.*, v. 101, p. 295-319, 1957.
8. ESTEVEZ, K. A., CHACON, R. D., ESTEVEZ, O. T. Quimioterapia antineoplásica sobre bases citocinéticas. *Quimioterapia Dinâmica*, Buenos Aires, p. 1-30, 1969.
9. GRUNEBERG, H. The development of some external features in mouse embryos. *J. Hered.*, v. 34, p. 89-92, 1943.
10. HAY, M. F. The development *in vivo* and *in vitro* of the lower incisor and molars of the mouse. *Arch. Oral Biol.*, v. 3, p. 86-109, 1961.
11. KOPPANG, H. S. Histomorphologic investigations of dentinogenesis in incisors of offspring of cyclophosphamide-treated pregnant rats. *Scand. J. Dent. Res.*, v. 86, p. 444-58, 1978.
12. KOROLKOVAS, A. Mecanismos de ação dos agentes antineoplásicos. *Rev. Farm. Bioquim. Univ. São Paulo*, v. 9, p. 5-60, 1971.
13. KOSS, L. G. A light and electron microscopic study of the effects of a single dose of cyclophosphamide on various organs in the rat. *Lab. Invest.*, v. 16, p. 44-65, 1967.
14. MATHEUS, M. T. G. *Efeito da ciclofosfamida sobre o desenvolvimento de germes dentais de molares transplantados para a câmara anterior do olho*. Estudo histológico em camundongos (*Mus musculus*). Araçatuba, 1985. Tese (Livre-Docência) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
15. MATHEUS, M. T. G. et al. Efeito da ciclofosfamida sobre o desenvolvimento do germe dental do incisivo do camundongo. *Rev. Odontol. UNESP*, v. 19, p. 41-9, 1990.
16. MATHEUS, M. T. G., HETEM, S. Efeito da ciclofosfamida sobre o desenvolvimento de germes dentais de molares transplantados para a câmara anterior do olho de camundongos. *Rev. Odontol. UNESP*, v. 19, p. 51-61, 1990.
17. MORSE, A. Formic acid-sodium citrate descalcification and butyl alcohol dehydration of teeth and bone for sectioning in paraffin. *J. Dent. Res.*, v. 24, p. 143-53, 1945.
18. NOGUEIRA, T. O., STENE, T., KOPPANG, H. S. Long term effects of colchicine on dentinogenesis in rat incisors. *Scand. J. Dent. Res.*, v. 88, p. 15-21, 1980.
19. \_\_\_\_\_. Colchicine effects on rat incisor odontoblasts and dentinogenesis. *Scand. J. Dent. Res.*, v. 89, p. 48-58, 1981.
20. RAHKAMO, A., TUOMPO, H. Uptake of cadmium in developing rat teeth in organ culture. *Scand. J. Dent. Res.*, v. 93, p. 198-208, 1985.
21. SHORT, R. D. The *in vivo* biosynthesis of DNA, RNA and proteins by mouse embryos after a teratogenic dose of cyclophosphamide. *Teratology*, v. 6, p. 129-38, 1972.
22. SIQUEIRA, E., MATHEUS, M. T. G., HETEM, S. Desenvolvimento intra-ocular de germes dentais irradiados. *Rev. Odontol. UNESP*, v. 10, p. 49-54, 1981.

23. SMITH, C. E., WARSHAWSKY, H. Cellular renewal in the enamel organ and the odontoblast layer of the rat incisor as followed by radioautography using  $^3\text{H}$ -thymidine. *Anat. Rec.*, v. 183, p. 523-61, 1975.
24. STENRAM, U., NORDLINDER, H. Delayed death in rats treated with cyclophosphamide. *Nature*, v. 219, p. 1154-9, 1968.
25. VAHLSING, H. L., et al. Dental abnormalities in rats after a single large dose of cyclophosphamide. *Cancer Res.*, v. 35, p. 2199-202, 1975.
26. VAHLSING, H. L., KIM, S. K., FERINGA, E. R. Cyclophosphamide-induced abnormalities in the incisors of the rat. *J. Dent. Res.*, v. 56, p. 809-16, 1977.
27. VAN PUETEN, L. M., LELIEVELD, P. Factors determining cell killing by chemotherapeutic agents in vivo I. cyclophosphamide. *Eur. J. Cancer*, v. 6, p. 313-21, 1970.

Recebido em 3.5.1993.