UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
JÚLIO DE MESQUITA FILHO - UNESP
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DO ÁCIDO FÓLICO EM PREVENIR O APARECIMENTO DE FENDA PALATINA TERATOGENICAMENTE INDUZIDA PELA DEXAMETASONA EM RATOS

ODILON GUARIZA FILHO

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Odontológicas – área de Ortodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista, para obtenção do título de Doutor em Ortodontia.

Orientador: Lizeti Toledo de Oliveira Ramalho

ARARAQUARA

2006

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DO ÁCIDO FÓLICO EM PREVENIR O APARECIMENTO DE FENDA PALATINA TERATOGENICAMENTE INDUZIDA PELA DEXAMETASONA EM RATOS.

ODILON GUARIZA FILHO

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista UNESP – Araraquara, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Odontologia (Ortodontia).

Comissão Examinadora:

Presidente: Prof[a]. Dr[a]. Lizeti Toledo de Oliveira Ramalho.

2º Examinador: Prof. Dr. Dirceu Barnabé Raveli.

3º Examinador: Prof. Dr. Paulo Sergio Cerri.

4º Examinador: Prof[a] Dr[a]. Ana Maria Trindade Grégio.

5º Examinador: Prof. Dr. Gerson Luiz Ulema Ribeiro.

Suplentes:

1º suplente: Prof[a]. Dr[a]. Lídia Parsekian Martins.

2º suplente: Prof. Dr. Luiz Gonzaga Gandini Junior.

Araraquara, 28 de agosto de 2006.

DADOS CURRICULARES

ODILON GUARIZA FILHO

Nascimento	10 de dezembro de 1966
Filiação	Odilon Guariza Maria Lúcia Kantor Guariza
1987 – 1991	Curso de Graduação em Odontologia pela Pontifícia Universidade Católica do Paraná – PUCPR
1992 – 1997	Curso de Pós-graduação em Ciências Odontológicas - Área de Concentração Ortodontia – Nível de Mestrado – Universidade de São Paulo – USP.

"Filho meu, não te esqueças da minha lei, e o teu coração guarde os meus mandamentos.

Porque eles aumentarão os teus dias, e te acrescentarão anos de vida e paz.

Não te desamparem a benignidade e a fidelidade, atam-nas ao teu pescoço, escreve-as na tábua do teu coração.

E acharás graça e bom entendimento aos olhos de Deus e dos homens.

Confia no Senhor de todo o teu coração, e não te estribes no teu próprio entendimento.

Reconhece-o em todos os teus caminhos, e ele endireitará as tuas veredas.

Não seja sábio a teus próprios olhos, teme ao Senhor e aparta-te do mal.

Isto será remédio para o teu umbigo, e medula para teus ossos.

Honra ao Senhor com a tua fazenda, e com as primícias de toda a tua renda;

E se encherão os teus celeiros abundantemente, e transbordarão de mosto os teus lagares.

Filho meu, não rejeitas a correção do Senhor, nem te enojes da sua repreensão.

Porque o Senhor repreende aquele a quem ama, assim como o pai ao filho a quem quer bem"

Provérbio de Salomão, Filho de Davi, Rei de Israel (Cap. 3, 1-12)

DEDICATÓRIA

À DEUS

Senhor Meu Deus, eu Te amo de todo o meu coração, de toda a minha alma, de todo o meu entendimento e com todas as minhas forças.

AOS MEUS PAIS

Pai e Mãe, obrigado pelo amor incondicional que me deram, por terem me ensinado a viver com dignidade e por me incentivarem a sempre buscar meus sonhos. Obrigado pela formação que me proporcionaram e por estarem junto a mim.

AO MEU FILHO

Guilherme, meu filho, o teu nascimento foi o evento mais importante na minha vida. A tua presença nestes três anos tem sido maravilhosa. Te amo.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Professora Lizeti Toledo de Oliveira Ramalho, pelo amor à arte e à ciência, aliado, este, ao dom inato para transmitir com sabedoria os seus conhecimentos com segurança, franqueza e honestidade. Pelo apoio familiar nas horas mais difíceis de minha vida, pela confiança em mim depositada, pela orientação firme e segura, sobretudo, pela oportunidade concedida, fatores que permitiram a realização deste trabalho.

Obrigado.

Muito obrigado, Doutora Lizeti.

AGRADECIMENTOS

Aos Docentes do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista (FOAR-UNESP): Ary dos Santos Pinto, Dirceu Barnabé Raveli, João Roberto Gonçalves, Lídia Parsekian Martins, Luiz Gonzaga Gandini Júnior, Maurício Tatsuei Sakima e Tatsuko Sakima. Pelo apoio, amizade e profundos ensinamentos a nós transmitidos.

Aos Professores do Departamento da Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista (FOAR-UNESP): Lourdes dos Santos Pinto e Rita de Cássia Loiola Cordeiro, pelo exemplo de dedicação ao ensino e a pesquisa.

Aos colegas do Doutorado, Evandro da Silva Bronzi, Gustavo Mattos Barreto, Halissa Simplício, Karina Santos Mundstock, Luciane Hahn, Luciane Quadros Closs, Patrícia Panizzi Gimenes, Ricardo Lombardi de Farias, Sérgio Milton Martins de Oliveira Penido, Thais Cristina dos Santos Dinelli Esperança, pela agradável convivência.

Ao amigo Hermes Pretel, pela sua colaboração na hora que mais precisei.

À professora Ana Maria Trindade Grégio, por colaborar intensamente neste trabalho.

Ao Pedro Sérgio Simões (Pedrinho), pelo carinho e profissionalismo demonstrados durante a realização da parte experimental e da tramitação laboratorial.

Ao professor Sergio Aparecido Ignácio, pelo auxílio na elaboração da análise estatística.

Aos funcionários do Serviço de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAR-UNESP), Flávia Sousa de Jesus, José Alexandre Garcia, Rosângela Silva dos Santos e Mara Cândida Munhoz do Amaral, pelo modo especial como sempre me trataram.

Aos Funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araraquara – Unesp: Maria Helena Matsumoto Komasti Leves, Ceres Maria Carvalho Galvão de Freitas, Marley Cristina Chiusoli Montagnoli e Odete Aparecido Camilo, pela amizade e auxílios prestados.

Aos professores de Ortodontia da PUCPR, Orlando Tanaka, Hiroshi Maruo, Elisa Souza Camargo e José Henrique Gonzaga de Oliveira, pelo apoio, a amizade e compreensão.

Aos professores Monir Tacla, Diretor do Curso de Odontologia da PUCPR e Sergio Roberto Vieira, Decano Adjunto do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da PUCPR, por estimular e apoiar a minha formação acadêmica.

Aos professores Gerson Luiz Ulema Ribeiro e Arno Locks pelo apoio e a amizade.

À todos aqueles que tem sido exemplos vivos do verdadeiro significado da palavra amigo, em todos os momentos.

Aos animais utilizados neste trabalho, meu profundo respeito e gratidão.

SUMÁRIO

Lista de figuras.....10
Lista de gráficos.....13
Lista de abreviaturas.....14
1 INTRODUÇÃO.....15
2 REVISÃO DA LITERATURA.....18
2.1 Corticosteróides.....44
2.2 Agentes Anti-teratogênicos.....64
3 PROPOSIÇÃO.....88
4 MATERIAL E MÉTODO.....90
4.1 Material permanente.....90
4.2 Drogas e reagentes.....90
4.2.1 Preparação da solução do corticosteróides.....91
4.2.2 Preparação da solução do ácido fólico.....92
4.3 Metodologia.....92
4.3.1 Aprovação do protocolo de pesquisa.....92
4.3.2 População.....92
4.3.3 Amostra.....93
4.3.3.1 Grupo I.....93
4.3.3.2 Grupo II.....93
4.3.3.3 Grupo III.....94
4.3.3.4 Grupo IV.....94
4.3.4 Método de concepção.....94
4.3.5 Obtenção dos espécimes para observação.....97
4.3.6 Avaliação dos resultados obtidos.....100
4.3.7 Análise estatística.....100
5 RESULTADO.....102
5.1. Resultados clínicos.....102
5.1.1 Peso total, comprimento total, comprimento da cabeça do feto.....103
5.1.2 Ação preventiva do ácido fólico nas fendas palatinas.....106
5.1.3 Presença de fenda palatina completa e incompleta.....108
5.2 Resultados histológicos.....110
5.2.1 Grupo I.....110
5.2.2 Grupo II.....114
5.2.3 Grupo III.....118
5.2.4 Grupo IV.....123
6 DISCUSSÃO.....127
7 CONCLUSÃO.....140
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....144
ANEXOS.....141
RESUMO.....142
ABSTRACT.....143

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Dexametasona administrada via intramuscular.....91.

FIGURA 2. Ácido Fólico administrado por gavagem.....92.

FIGURA 3. Ratos do tipo Holtzmam.....93

FIGURA 4. Presença de espermatozóide.....96

FIGURA 5. Laparotomia das gestantes.....97

FIGURA 6. Extremidade cefálica separada do resto do corpo.....98

FIGURA 7. Palato sem fenda palatina.....99

FIGURA 8. Palato com fenda palatina.....99

FIGURA 9. Fotografias de fetos em vista de perfil do GRUPO I, com 19 dias de idade. Alterações anatômicas ocorridas na face e nas patas dianteiras e traseiras. 103

FIIGURA 10. Fotografias oclusais dos fetos com 19 dias de idade. a) e b) ausência de fenda palatina; c) e d) presença de fenda palatina completa; e) e f) presença de fenda palatina incompleta.....109

FIGURA 11. Fina e reduzida formação óssea com aspecto de rede....110

FIGURA 12. Ausência de formação glandular e muscular.....110

FIGURA 13. Fenda labial bilateral com união entre os epitélios.....111

FIGURA 14. Epitélio íntegro e ausência de mesodermização.....111

FIGURA 15. Processo de fechamento das cristas palatinas.....111

FIGURA 16. Cristas em posição horizontal muito distantes uma da outra.....112

FIGURA 17. Condensação das células mesenquimais junto ao epitélio.....112

FIGURA 18. Comunicação entre as cavidades oral e nasal.....113

FIGURA 19. Vascularização reduzida.....113

FIGURA 20. Sulco nasolabial bilateral.....114

FIGURA 21. Ausência de formação óssea.....114

FIGURA 22. Palato fechado com restos epiteliais no mesênquima.....115

FIGURA 23. Falta de fusão na porção medial, corte horizontal.....115

FIGURA 24. Fenda na região anterior do palato.....115.

FIGURA 25. Fenda labial bilateral com epitélio recoberto por queratina.....116

FIGURA 26. Poucos capilares e ausência de formação óssea.....116

FIGURA 27. Fenda labial bilateral.....117

FIGURA 28. Cristas palatinas posicionadas obliquamente.....118

FIGURA 29. Epitélio íntegro, sem queratina e não há sinais de mesodermização.....119

FIGURA 30. Células mesenquimais e não há sinais de início de diferenciação.....119

FIGURA 31. Fenda labial bilateral – lábio leporino.....120

FIGURA 32. Mesodermização e ausência de formação óssea.....120

FIGURA 33. Início de formação óssea.....120

FIGURA 34. Abertura nasal anterior e manutenção do sulco naso-lacrimal local.....121

FIGURA 35. Processo fronto-nasal interposto entre as cristas.....122

FIGURA 36. Cristas palatinas Encurtadas com ausência de formação óssea.....122

FIGURA 37. Falta de migração das cristas palatinas em direção medial..... 123

FIGURA 38. Processo fronto-nasal entre as cristas palatinas.....124

FIGURA 39. Tecido epitelial estratificado.....124

FIGURA 40. Delicada malha óssea no mesenquima da crista palatina.124

FIGURA 41. Ausência de formação da abertura nasal anterior.....125

FIGURA 42. Tecido ósseo contornando o septo nasal.....126

FIGURA 43. Processo fronto-nasal separado das cristas palatinas.....126

FIGURA 44. Cristas palatinas separadas e horizontalizadas.....126

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1. Peso médio dos fetos segundo grupos.....104.

GRÁFICO 2. Comprimento total médio dos fetos segundo grupos.....105

GRÁFICO 3. Comprimento médio da cabeça dos fetos segundo grupos.....105

GRÁFICO 4. Comportamento da variável fenda segundo os grupos....107

LISTA DE ABREVIATURAS

Dexa – dexametasona.

A.F. – ácido fólico.

V.i.u. – vida intra – uterina.

D.T.N. – defeitos no tubo neural.

1 INTRODUÇÃO

As más formações de lábio e ou palato situam-se entre as mais freqüentes no complexo cabeça e pescoço. Em média apresentam uma incidência na população em geral de 1 para cada 650 nascidos vivos no Brasil além de poder estar presente em 154 síndromes conhecidas (COHEN, 1978). Especificamente a fenda isolada de palato ocorre em média em 1 para cada 2000 nascidos vivos (HABIB, 1978). Esta incidência varia de modo crescente de indivíduos melanodermas para os xantodermas, passando pelos leucodermas. O grau de envolvimento das estruturas do lábio e palato pode variar bastante de acordo com o tipo de fissura presente.

Assim pode-se ter desde uma fibrose cicatricial na região do lábio até a completa falta de fusão entre a pré-maxila, os processos palatinos e o processo vomerino. Partindo deste fato percebe-se que igualmente a amplo leque de seqüelas poderá estar relacionado à presença desta deformidade. Problemas relacionados ao crescimento facial, desenvolvimento da oclusão, fonação, mastigação, estética facial, além do trauma psicológico poderão estar presentes.

As fendas são de etiologia mutifatorial, tendo sido constatado que cerca de 80% dos casos de fenda palatina isolada, resultam de fatores ambientais. Portanto, o conhecimento do processo normal de

palatogênese e dos mecanismos pelos quais a fenda palatina pode ser experimentalmente induzida evidencia o pré-requisito necessário para a compreensão da etiologia desta alteração.

Contudo, a pesquisa de qualquer processo, ou deformidade, de desenvolvimento no homem, em geral, é severamente limitada pela falta de material, ou ainda, de informações relevantes sobre o material disponível. Além disto, há muitas situações onde a ética, moral e considerações legais tornam esses estudos científicos impossíveis. Nesse aspecto, é largamente aceitável que o desenvolvimento facial inicial de todos os embriões de vertebrados seja similar (BHASKAR, 1989), ocorrendo inúmeros eventos que conduzem a todos eles, à uma maturação progressiva das estruturas. Assim sendo, o desenvolvimento embrionário da face do rato é essencialmente semelhante ao da face humana. (FERGUSON, 1977)

O rato é o animal de laboratório comumente empregado, cerca de 20% dos experimentos com propósitos científicos (CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE, 1980), possuindo características anatômicas e fisiológicas que o tornam de particular valor como modelo animal de pesquisa, especialmente em estudos toxicológicos, teratológicos, cardiovasculares, dentários, assim como oncologia experimental, gerontologia experimental, imunologia, imunogenética e parasitologia.

As pesquisas sobre os possíveis mecanismos dos defeitos induzidos por corticóides já estão bem definidas. Em estudos sobre a

palatogênese normal e teratogenicamente alterada pela dexametasona em ratos *wistar* fêmeas grávidas (BITTENCOURT e BOLOGNESE 2000), a sua ação teratogênica foi verificada em 100% dos animais, não provocando diminuição no número de fetos da prole nem efeito eletivo quanto ao sexo.

O ácido fólico é usado profilaticamente em indivíduos com risco de desenvolvimento de deficiência de folato como, por exemplo: - gestantes (principalmente quando existe risco de defeitos congênitos); - crianças prematuras e pacientes com anemias hemolíticas crônicas graves, inclusive hemoglobinopatias (anemia falciforme). Apesar do uso bastante difundido do ácido fólico em mulheres grávidas, no começo da gestação, essa aplicabilidade é bastante empírica sem embasamento científico.(SCHUBERT, 2002).

Neste sentido, propõe-se a investigar os mecanismos do ácido fólico na prevenção do aparecimento de fenda palatina teratogenicamente induzida pela dexametasona em ratos *Holtzman*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Blandau e Money, em 1944, estudou cinqüenta e oito ratas fêmeas após inseminação nos intervalos de 15, 30, 45 e 60 minutos respectivamente e e relacionou a presença de espermatozóides com as áreas reprodutivas. Os espermatozóides tinham migrado para os segmentos uterinos em 42% dos 24 ovidutos examinados 15 minutos depois da ejaculação. Depois de 30 minutos da ejaculação, os espermatozóides foram encontrados no segmento uterino em 88% dos 42 ovidutos examinados. Em 62% dos 42 ovidutos, os espermatozóides tinham chegado nos segmentos ovarianos. Após 45 minutos da ejaculação, os espermatozóides tinham migrado para os segmentos ovarianos em 86% dos ovidutos examinados. Os vinte ovidutos examinados 1 hora depois da ejaculação apresentaram-se completos de espermatozóides.

Em 1952, **McEvitt** estudou a correlação das idades dos pais com a formação das fendas labiais e deformidades palatinas. Ele citou que a maioria das perguntas feitas pelos futuros pais são: a) Uma mãe jovem que já tem um bebê com fenda labial, pode atrever-se em ter outro filho?; b) Esta deformidade é a punição por ter me casado com um homem com o dobro da minha idade?; c) A presença de fenda palatina em um primo de terceiro grau é motivo de preocupação?; d)O que devo fazer no futuro quando a minha filha com fenda labial/palatina chegar na idade de casar? O referido autor menciona que no Hospital de Chicago, um número

bastante grande de crianças com deformidades de palato e fendas labiais foram nascidas de mães “mais velhas”. Entretanto, quando foi averiguado em Hospital da Dinamarca, não foi encontrado diferença significativa. O autor ainda observa que dentro da sua clínica, nos últimos 3 anos, as crianças que nasceram de pais (pai e mãe) com mais de 35 anos de idade, houve a porcentagem de 45% de incidência da presença de deformidades palatinas e fendas labiais.

Sabendo-se que o acasalamento de ratos não acontece com uma freqüência igual durante as 4 primeiras noites depois de colocá-los em contato, **Whitten,** em 1956, apresentou um método novo com o objetivo de maximizar este processo de acasalamento. O autor descobriu que o acasalamento ocorre mais freqüentemente já na primeira noite depois de colocá-los juntos, o macho e a fêmea, isto se o macho for colocado no recipiente de acasalamento 2 dias antes pois o ciclo estral da fêmea é modificado pela presença do macho ou de suas excreções. Contudo, a incidência de procriação é alterada colocando as fêmeas no recipiente recentemente contaminado pelos machos.

Strean e Peer, em 1956, investigaram 228 mães de crianças com fendas labiais e palatinas, através de questionário, com o objetivo de determinar qualquer relacionamento entre os seus históricos médicos, particularmente no primeiro trimestre de gravidez, com a incidência de anormalidades congênitas.

O estresse, caracterizado por um conjunto de reações fisiopatológicas resultantes de estímulos externos, e que convergem para o aumento da secreção de hormônios da supra-renal pode se associar com malformação do terço médio da face, sobretudo, com fendas labiopalatinas.

Mazaheri, em 1958, analisou 661 pacientes da *Lancaster Cleft Palate Clinic*, e demonstrou a tendência de maior proporção de nascimentos de crianças com fissura de lábio / palato conforme aumenta a idade da mãe. Com relação à idade do pai não foi encontrada nenhuma alteração. Na avaliação da incidência com relação ao sexo, foi relatado um maior número de casos no sexo masculino, mas as fissuras mais severas apareceram em maior número no sexo feminino. Verificando os dados referentes à hereditariedade, os casos de fissura de lábio e ou palato em filhos de pais fissurados foram freqüentes. Quanto à ordem de nascimento o estudo demonstrou o maior número de casos de fissura de lábio / palato em nascimentos mais tardios na família.

Töndury, em 1958, apresentou trabalho sobre o desenvolvimento da face humana que continha a origem de fendas labiais e palatinas. Ele afirmou que a alteração de desenvolvimento de cavidade nasal no lado da fenda é comum mantendo lábio leporino ou fenda de lábio. Sua origem está relacionada com a substituição da parede epitelial por mesênquima. A fenda labial completa surge se a fusão epitelial do aumento limitado da bolsa nasal não acontece. A parede epitelial não é formada, a qual é

observada no 12º dia de prenhez em embriões de camundongos. A formação de fenda primária tem origem do crescimento defeituoso do aumento lateral nasal. Entretanto, a formação de fenda secundária tem origem da ruptura do cisto da fenda labial o qual repousa na parede epitelial. Uma fenda labial simples é desenvolvida se houve interrupção precoce da fusão dos processos epiteliais, e a parede epitelial entram na cavidade oral muito curta. A maxila e a protuberância medial nasal possui uma separação na região anterior com diferentes graus de intensidade.

Em estudo morfológico sobre fechamento e fusão do palato em ratos do tipo Sprague-Dawler, **Zeiler et al.** em 1964, demonstraram que a idade cronológica não pode ser considerada preceptor do estado de fechamento do palato. Dos aspectos morfológicos investigados, as medidas do desenvolvimento da pata dianteira apresentaram vantagens sobre a idade cronológica na predição do desenvolvimento do palato. Outro resultado importante deste estudo, a mandíbula sofreu surto de crescimento diferencial antes do fechamento e fusão do palato.

Ingalls et al., em 1964, realizaram estudo epidemiológico das características de 99 mães que deram à luz a 100 bebês com fenda labial e palatal ou ambas. Avaliaram os nascimentos ocorridos durante 2 anos e 10 meses. Não encontraram diferença nos 3 tipos de malformação devido a alterações sazonais. As fendas de lábio ou palato e combinadas foram encontradas em 30% e 54% dos casos respectivamente. As de lábio e combinadas ocorreram mais em indivíduos do sexo masculino e as de

palato no sexo feminino. A incidência de lábio e palato fissurado foi maior na raça leucoderma (84 indivíduos) que na melanoderma (16 indivíduos); anomalias associadas ocorreram com mais frequência nos casos com palato fissurado (50%) que nos demais. O peso dos bebês recém-nascidos não variou, comparando-os com o de crianças normais, bem como a porcentagem de prematuridade.

Conway e Wagner (1965), analisaram os dados do Departamento de Saúde de Nova York, onde foram registradas todas as anomalias das crianças nascidas em Nova York desde 1950. Os dados encontrados mostraram a fenda de lábio e palato como a terceira anomalia mais freqüente, e o sexo masculino possuiu a maior representatividade dos casos. A ocorrência dos casos de fenda de lábio e palato foi duas vezes maior em indivíduos leucodermas quando comparados aos melanodermas. Verificou-se também que as mães muito novas, antes dos 20 anos de idade, e mães com idade acima de 35 anos de idade mostraram grande incidência de anomalias congênitas em seus filhos.

A prevalência da fenda palatina isoladamente pode variar de 1 em 2500 nascimentos vivos nas populações caucasianas, sendo um pouco maior nos orientais e um pouco menor nos negros. No Brasil, acredita-se que 1 em cada 650 nascimentos vivos apresentam o problema. Estimativas da mortalidade pré e pós-natal de indivíduos portadores de fendas faciais variam entre 17 a 25 % (Drillien et al., 1966).

A fenda palatina e lábio leporino ocorrem na proporção de 1 para cada 1000 nascimentos vivos. Fendas do lábio e da região anterior do palato são mais comuns no sexo masculino na proporção 2:1. Todavia, fendas isoladas do palato são mais freqüentes no sexo feminino. O tratamento destas anormalidades de desenvolvimento facial tem sido realizados por métodos cirúrgicos apropriados que se tornaram freqüente envolvendo multi-disciplinaridade entre dentista, médico e fonoaudiólogos. Tem sido demonstrado que crianças filhas de mães acima de 40 anos são três vezes mais susceptíveis à estas anormalidades de desenvolvimento que as crianças nascidas de mães com menos de 30 anos (Scott, 1966).

Com o intuito de esclarecer o crescimento pré-natal do palato de ratos, **Hughes et al.,** em 1967, estudaram as cabeças de fetos com 16, 17, 18, 19 e 21 dias de vida intra-uterina.i.u. de 7 fêmeas da raça *Holtzman*. Os autores observaram que: as cristas palatinas de fetos com 16 dias de v.i.u. apresentaram-se em posição vertical em cada lado da língua. A elevação e fusão destas cristas palatinas foram completadas no 17^{o} dia de v.i.u. e a degeneração da lâmina epitelial da linha média palatina começou logo após a fusão. Alguns remanescentes epiteliais foram observados somente em um feto no 18^{o} dia, e nenhum remanescente epitelial foi encontrado em fetos no 19^{o} dia. Osteogênese intra-membranosa começou nas superfícies laterais do palato no 17^{o} dia e alcançou a região média do palato no 21^{o} dia de v.i.u..

Asling e Wagenen, em 1967, descreveram sucintamente o desenvolvimento do palato secundário em macacos *Rhesus*. Este estudo foi realizado com 5 embriões de macacos com 40, 46, 65, 74 e 85 dias de v.i.u., os quais se mostravam todas as evidências externas de normalidade. O estágio de formação do palato aconteceu a partir do 40º dia. O embrião do *rhesus* mostrou claramente que os processos palatinos estão dispostos numa direção ventro-medial, com a presença da língua entre eles. Esta fase é muito parecida com a fase de 41º dia de v.i.u. no humano normal. No 46º dia, os processos palatinos se horizontalizaram em forma de bico e se fusionaram na região média. Este evento mostra também uma fusão posterior incompleta, bem parecida num embrião humano normal de 48-54 dias de v.i.u.. No 65º dia de concepção, a fusão palatina está completa em toda sua extensão, e as rugas proeminentes se estendendo lateralmente partindo da sutura. Os fetos no 74º e 85º dia de v.i.u. também mostraram esta união palatina. Esta condição é também apresentada em embriões humanos a partir do 54º dia de v.i.u.. Os autores finalizam sugerindo estudos sobre fenda labiais e palatinas em embriões de macacos *rhesus* com idade aproximada de 5 semanas de v.i.u..

Em 1968**, Nagen Filho et al.** propuseram-se a investigar a prevalência das lesões lábio-palatais na população escolar da Bauru e procurar, também, testar a influência de alguns fatores no aparecimento destas lesões. Foram examinados 13.249 alunos de 31 grupos escolares

situados no Município de Bauru, no interior de São Paulo. O método foi de exame visual direto de todos os alunos presentes no dia do levantamento. Registrou os casos encontrados em fichas específicas onde os resultados foram os seguintes: Nos grupos escolares estudados, somente 20 alunos apresentaram anomalias congênitas lábio-palatais nos seus diversos tipos. Analisando mais profundamente os resultados, os autores chegaram às algumas conclusões:

a) a prevalência encontrada nos escolares examinados foi de 1:650 crianças; b) do total de casos, observou-se que as anomalias ocorreram com freqüência de ¼ na relação branco / não branco; c) as lesões lábio-palatais de maior gravidade foram significativamente mais freqüentes no sexo feminino; d) não houve diferença significante entre o grupo branco e o negro, quanto à prevalência; e) a raça amarela apresentou proporção significantemente menor do que as outras raças reunidas; f) as fendas labiais unilaterais esquerdas predominaram no sexo masculino e foram mais comuns do que as fendas unilaterais direitas ou as fendas bilaterais e g) com relação à idade da mãe, a maior freqüência de anomalias ocorreu em gestações estabelecidas após o 25^{o} aniversário da mãe.

Usando embriões de camundongos albinos do tipo CD1 com 15,5 dias de v.i.u. de ratos do tipo Holtzman com 16,5 dias de v.i.u., **Deangelis e Nalbadian,** em 1968, estudaram a formação do palato secundário durante o crescimento craniofacial. Afirmaram que a formação do palato secundário pela união dos dois processos palatinos ou projeções envolve

uma série de rápidas mudanças nos componentes epiteliais e mesenquimais das cristas palatinas. As cristas palatinas exibem uma irregular plasmalema epitelial externo que se torna mais regular um pouco antes do contato. Forma desmossomos na superfície de contato da projeção e aparece para unir os dois processos até que a união mesenquimal aconteça. A mais nova parede epitelial estabelecida gradualmente começa a ser destruída, provavelmente por um processo auto-lítico. Estruturas parecidas com lisossomos são evidentes dentro do citoplasma da célula epitelial. A lâmina basal separando o epitélio do mesenquima intacto remanescente e as células mesenquimais fundamentais estão imutáveis até a desintegração final da célula epitelial. A fusão é evidente em algumas áreas da parede epitelial, particularmente na região do palato mole, que após o desaparecimento da parede epitelial, acontece o reparo da lâmina basal transversalmente, deixando nas projeções uma depressão no jovem palato secundário. Concomitantemente hemi-desmossomos aparecem na lâmina basal formada.

Borden, em 1969, publicou artigo sobre um estudo que realizou em relação ao desenvolvimento do controle neural e função motora na musculatura fetal da língua de ratos. Realizou-se estudo histológico do aspecto e diferenciação do 12^{o} nervo da língua e também sobre a função de respostas da musculatura da língua. Todos os resultados foram associados ao fechamento do palato secundário. As ratas prenhes

(*Holtzman*) produziram 16 ninhadas de 120 fetos; com a idade de 14 a 21 dias. Verificou-se que: histologicamente, os nervos lingual e hipoglosso já estavam bem representados na língua dos fetos com 14 dias de vida. Finas mio-fibrilas não estriadas também foram encontradas nestes fetos na área dos músculos hioglosso e genioglosso. As línguas dos fetos foram estimuladas eletricamente com eletrodos, e verificaram que já nos fetos com 14 dias de idade, produziram respostas rápidas, indicando retorno sensorial e atividade motora dos neurônios do músculo hipoglosso. Portanto o autor concluiu que o músculo da língua tem a capacidade motora antes do fechamento do palato secundário. Estes achados fortalecem a teoria que a língua é um componente ativo no mecanismo de fechamento do palato secundário.

Com um estudo sobre morfogênese do palato em coelhos, **Walker,** em 1971a, afirmou que a mudança de posição das cristas palatinas da posição vertical para a horizontal é a fase crítica do desenvolvimento do palato. Foi observado também que a porção final das cristas palatinas estavam numa posição horizontal, enquanto que a porção mais caudal ainda estava vertical e lateral à língua, portanto, isto suporta a hipótese de que a retração ativa da língua ajuda no mecanismo do fechamento palatal. O autor também não encontrou nenhuma diferença entre os embriões de machos e fêmeas no desenvolvimento palatino.

Com um método de determinação de síntese de colágeno no palato de ratos **Pratt e King** em 1971, concluíram que o colágeno está

presente e é ativamente sintetizado no palato de ratos antes e durante o tempo de fechamento do palato. A quantidade relativa de colágeno no palato entre o 14^{o} e 16^{o} dia foi aproximadamente a mesma que observada em todo o feto. Este aumento inicial foi seguido de um rápido aumento entre o 16^{o} e 19^{o} dia, o qual provavelmente reflete a formação de osso das cristas palatinas, que começa logo após o fechamento do palato do rato.

Com o objetivo de fazer uma revisão da literatura sobre a formação do palato secundário, **Smiley** em 1972, comentou que os tipos mais comuns de fenda do palato secundário são: 1) fenda completa e parcial dos palatos duro e mole; 2) fenda parcial do palato mole e 3) fenda submucosa. As fendas atípicas do palato secundário podem também acontecer enquanto o palato primário permanece intacto. O autor ilustrou neste artigo a fenda atípica do palato secundário de um cachorro, a qual seções histológicas do palato primário e do palato mole demonstraram a morfologia normal. Com exceção da presença de fenda palatina na região anterior, o palato duro estava normal. Este tipo de fenda pode ser devido a ruptura do cisto palatino ou à reabertura das cristas palatinas já fechadas. Isto pode ter ocorrido pela presença de células programadas para morrer as quais normalmente estão ao longo da margem medial do processo palatino. A adesão epitelial é um dos primeiros estágios que deve ocorrer após ter acontecido o contato epitelial, portanto a degeneração celular pode acontecer antes deste contato epitelial e assim

inibir a aderência epitelial. O autor também comentou sobre o elemento tempo, citando o estudo cefalométrico em ratos de Smiley, Vanek e Dixon, que mostrou que existe platô no crescimento de largura do arco maxilar na época do fechamento palatino – enquanto a largura do arco maxilar continua aumentando durante esta mesma época nos fetos com presença de fendas formadas espontaneamente. Indubitavelmente, a presença deste platô pode ser crítica na época da aderência e do contato epitelial normal.

Saxén, em 1974, estudou 590 crianças com fenda labial/palatina, registradas num período entre os anos de 1967 e 1971 na Finlândia, que foram analisadas com o objetivo de encontrar os efeitos etiológicos da fenda lábio-palatal. Diversos fatores foram correlacionados, entretanto os que foram significantemente associados ao nascimento destas crianças com defeitos lábio palatinos foram: idade dos pais; posição sócia econômica; gravidez com presença de ameaças de abortos espontâneos; exames radiográficos na região pélvica durante a gravidez e fatores emocionais. O autor concluiu que os fatores são etiologicamente variados tanto para a formação de fenda labial e fenda palatina.

Goss, em 1975, investigou a fusão palatal estudando fetos humanos. Os fetos foram obtidos através de aborto terapêutico do Hospital de Adelaide, no Sul da Austrália. Os fetos foram mantidos em meio de cultura, que possibilitou a estimulação da fusão palatina *in vitro*, formação de pérola epitelial *in vitro*, e investigar alguns aspectos da

ruptura pós-fusão. O autor descreveu 5 casos de fetos mantidos com sucesso em cultura. Caso I - demonstrou que fusão do palato humano *in vitro* realmente ocorre. A área fusionada mostrou rápida penetração mesenquimal, isto é contrário aos achados em roedores. No desenvolvimento normal humano, a junção epitelial persiste por algumas semanas. Caso II – A morfologia geral do palato foi mantida. A quantidade de epitélio vista foi menor que o normal. Caso III e IV demonstraram que se o palato intacto é rompido, então o restabelecimento é através de cobertura epitelial de mesenquima exposto. O caso V mostra que é possível estudar os restos epiteliais na região mediana.

Melsen, em 1975, estudou o crescimento pós-natal do palato duro com histologia convencional e micro-radiografia em material de autópsia de 22 meninos e 27 meninas com idade de 0 a 18 anos.

Os achados indicaram que o crescimento em comprimento do palato duro até os 13 e 15 anos foi devido ao crescimento da sutura transversa e de aposição da margem posterior do palato. Depois desta idade, o crescimento sutural foi interrompido, considerando que a aposição pareceu continuar por alguns anos. Durante o crescimento pós-natal, a morfologia da sutura transversa mudou. No nascimento, a sutura estava ampla e levemente sinuosa, depois é desenvolvida numa típica sutura escamosa, parte do palato cobrindo parte da maxila. Durante a puberdade, a sutura voltou a ficar levemente sinuosa. A importância desta mudança no crescimento vertical do palato duro foi discutida. Foi

chamada a atenção para abaixamento da parte posterior do palato. O crescimento transversal da sutura palatina mediana continuou até os 16 anos nas meninas e até os 18 anos nos meninos. Baseando-se na morfologia, o desenvolvimento da sutura mediana pôde ser dividido em três estágios: no primeiro estágio a sutura é curta, larga e em forma de Y; no segundo estágio a sutura está mais sinuosa e no terceiro, a inter-digitação estava tão forte que a separação das duas cristas palatinas poderia não acontecer numa fratura dos processos inter-digitados.

Com o objetivo de aplicar o método analítico para avaliar dimensões e padrões de crescimento regionais na cavidade oronasal, **Diewert,** em 1979, estudou embriões de ratos Sprague-Dawley. Das ninhadas de 8 ou mais embriões foram coletadas em cada uma das 5 seguintes idades: 15 dias e 5 horas; 16 dias e 0, 4 e 8 horas; 17 dias e 5 horas. Das 9 ninhadas coletadas até o 16^0 dia de gestação e 0 horas, todos os fetos tinham o palato aberto. Das 3 ninhadas coletadas com 16 dias e 4 horas, produziram 32 fetos com ambos os estágios, palato aberto ou fechado (41% com os processos palatinos vertical, 24% com um processo palatino vertical e o outro horizontal, e 34% com os processos palatinos horizontais). Com 16 dias e 8 horas, 80% dos fetos tinham ambos os processos palatinos elevados na região do palato duro. Os fetos com 17 dias de idade, os processos palatinos estendiam-se medialmente da base do processo maxilar na região do palato duro, e ventralmente na região do palato mole. Nos estágios mais avançados do

desenvolvimento do palato, o local de fixação da língua se tornou mais anteriorizada em relação ao palato. Em todos os estágios, incluindo nos estágios de abertura, a superfície dorsal da língua estava em contato com o palato primário nas regiões anteriores do palato secundário. A autora concluiu que antes da elevação, houve um rápido aumento de volume na cavidade oro-nasal e dos processos palato-maxilares que ocorreram simultaneamente. A posição anterior da língua e da mandíbula relativa ao palato primário sugeriu que o rápido aumento do volume da cavidade oro-nasal é provavelmente o resultado do deslocamento da língua e mandíbula. A posição dos processos palatinos lateralmente à língua sugeriu que os processos não empurraram pra baixo a língua, mas pressionou medialmente a língua que contribuiu para seu deslocamento. Nos embriões de ratos e camundongos, a capacidade intrínseca de direcionar verticalmente os processos para alcançar a posição horizontal é maior que nas outras espécies.

Em 1978, **Taylor** estudou o crescimento crânio-facial pré-natal de embriões de hamster. Foram estudados 170 embriões os quais foram pesados individualmente e suas cabeças foram preparadas para estudos histológicos. No hamster, a elevação dos processos palatinos aconteceu entre o 11^{o} dia e o 12^{o} dia de prenhez. Esta elevação aconteceu rapidamente, envolvendo a movimentação das bases dos processos palatinos em direção à linha média. O relacionamento entre a mandíbula e base craniana posterior mantiveram-se constante durante a referida

elevação. Os comprimentos da língua, da mandíbula e da região naso-basal cresceram completamente durante todo o tempo estudado.

Beaudoin, em 1980, mencionou que o início do estro na fêmea de ratos pode ser determinado pela demonstração de lordose característica em resposta ao estímulo manual. Isto é um sinal de predisposição para a cópula e marca o início da atração sexual que dura em média 13 horas. A ovulação ocorreu aproximadamente 10 horas após o início do aquecimento.

No ano seguinte, **Bertholet** (1981) aperfeiçoou o método de acasalamento, que produz a avaliação exata do tempo de procriação dos ratos, colocando machos e fêmeas somente por duas horas em contato na manhã do dia do estro. A referida avaliação é determinada com observação da presença de espermatozóide no material coletado na vagina das fêmeas com microscopia ótica. A porcentagem de prenhez obtida pelo método foi igual ao método tradicional o qual deixa o casal de ratos em contato durante a noite inteira.

Moore, em 1986 descreveu que o palato forma-se a partir de dois primórdios: o palato primário e o palato secundário. Embora a palatogênese se inicie no fim da 5ª semana de v.i.u., seu desenvolvimento só vai se completar na 12ª semana. Seu período crítico de desenvolvimento nos seres humanos está compreendido entre o fim da 6ª e o começo da 9ª semana. O palato primário ou processo palatino mediano começa a se desenvolver no início da 6ª semana a partir da

parte profunda do segmento inter-maxilar. O palato primário forma a parte pré-maxilar da maxila. Ele representa apenas a pequena parte do palato duro adulto (a parte anterior ao forame incisivo que aloja os dentes incisivos). O palato secundário é o que se forma primeiro dos pares duro e mole do palato que se estendem posteriormente desde o forame incisivo. O palato secundário começa a desenvolver-se na sexta semana, a partir de duas projeções mesenquimais que se estendem na porção interna das proeminências maxilares. Inicialmente, estas estruturas em forma de cristas, chamadas processos laterais do palato, projetam-se ínfero-medialmente de ambos os lados da língua. Com o desenvolvimento dos maxilares, a língua fica relativamente menor e se desloca inferiormente. Com o prosseguimento da palatogênese ao longo da sétima e oitava semanas, os processos laterais do palato alongam-se e se movem para a posição superior à língua. Gradualmente, estes processos aproximam-se um do outro e se fundem no plano médio. Eles também se fundem com o septo nasal e a parte posterior do palato primário. O tecido ósseo surge de forma gradual no palato primário, constituindo a parte pré-maxilar, que aloja os dentes incisivos. Ao mesmo tempo, ocorrem extensões ósseas, partindo dos ossos maxilares e palatinos para os processos laterais do palato, formando o palato duro. As partes posteriores destes processos não chegam a se ossificar. Elas estendem-se em sentido posterior para além do septo nasal e fundem-se para formar o palato mole e sua projeção cônica, denominada úvula. A rafe do palato indica, de modo

permanente, a linha de fusão dos processos laterais do palato durante o período compreendido entre a sexta e a décima segunda semana de v.i.u.. Um pequeno canal naso-palatino persiste na linha média do palato entre a parte pré-maxilar e os processos palatinos dos maxilares. Este canal é representado no palato duro do adulto pelo forame dos incisivos. Sutura irregular corre do forame dos incisivos até o processo alveolar da maxila, entre os dentes incisivos e caninos de ambos os lados, o que é visível na região anterior do palato de pessoas jovens. Esta sutura indica onde os palatos primário e secundário embrionários se fundiram e onde as fendas do palato anterior ocorrem. A base embriológica da fenda do palato é a falta de união das massas mesenquimais dos processos palatinos laterais e de uma com a outra, com o septo nasal e/ou com a margem posterior do processo medial do palato. Fendas do palato anterior ou primário (fendas anteriores ao forame incisivo) decorrem do não encontro das massas mesenquimais dos processos palatinos laterais e da ausência da fusão com o mesênquima do palato primário. Fendas do palato posterior ou secundário (fendas posteriores ao forame incisivo) resultam da falta de união e de fusão das massas mesenquimais dos processos laterais do palato com o mesênquima do palato primário e com o septo nasal. Fendas das partes anterior e posterior do palato (fendas envolvendo os palatos primário e secundário) resultam da não-união e da não-fusão das massas mesenquimais dos processos palatinos laterais entre si, com o mesênquima do palato primário com o septo nasal.

Young et al., em 1991, fizeram estudo com o objetivo de examinar se a língua tinha papel determinante no desenvolvimento fundamental das cristas palatinas na direção vertical em Hamster *Golden Syrian*. Eles dividiram o estudo em dois grupos, que são: controle e o grupo em que os embriões foram tratados com 6-mercaptopurina, os quais foram examinados com microscopia eletrônica e técnicas histológicas para averiguar o relacionamento espaço-temporal do desenvolvimento do palato, língua e mandíbula. A síntese de DNA, medida pela incorporação H-Timidina, foi usada como um índice de crescimento. Os resultados indicaram que no grupo controle, o desenvolvimento vertical do palato começou na metade anterior do teto da cavidade oro-nasal, e os abaulamentos da língua e o processo mandibular se desenvolveram na metade posterior da cavidade oro-nasal. Houve o surto de síntese de DNA que ocorreu no palato e na mandíbula, mas não na língua. Já no grupo em que os fetos foram tratados com 6-mercaptopurina, apesar da aparência cronológica inicial de todas as três estruturas, a síntese de DNA foi inibida em todas as três estruturas. A recuperação da síntese de DNA, embora parcial, foi mais rápida no palato e na mandíbula do que na língua. Portanto, baseando-se nas observações deste estudo, os autores sugeriram que o desenvolvimento da língua pode não desenvolver papel determinante na direção de desenvolvimento palatal.

Com o objetivo de explorar os possíveis mecanismos de formação de fendas tanto em humanos como também em animais, **Kitamura,** em

1991, examinou fendas labiais e palatinas de 19 embriões humanos, 152 embriões de camundongos. Também estudou como grupo controle 60 embriões humanos e 440 de embriões de camundongos sem fendas. O autor chegou à conclusão que algumas fendas de palato e de lábio aparecem a partir de uma ruptura depois da fusão. Ele descobriu que na 18^{o} semana de v.i.u., as cristas palatinas dos embriões humanos foram encontradas verticais, mas os remanescentes epiteliais foram encontrados consistentemente em somente uma das cristas palatinas. A ruptura começou na região posterior à junção do palato primário com o secundário e estendeu-se posteriormente ao final do palato mole. O ducto naso-palatino foi formado, sugerindo que a fusão palatina ocorreu, e o palato rompeu mais tarde, e as cristas palatinas afetadas desprenderam-se. Se a fenda foi o resultado da falha de elevação das cristas palatinas, nem os remanescentes epiteliais e nem os ductos naso-palatinos deveriam estar formados. Foram administradas testosterona e cortisona durante as prenhes de ratas, com o objetivo de avaliar a capacidade destes hormônios de causar mudanças nos fetos. O hormônio foi administrado durante a última semana de prenhez, na qual o stress maternal altera a secreção de testosterona nos fetos.

Kjaer, em 1992, investigou o estágio de maturação esquelético na base do crânio na época do fechamento palatino. O material que ele estudou consistiu de 62 embriões humanos que pertenciam ao Hospital Universidade de Copenhagen, do Departamento de Medicina Legal.

Todos os espécimes não tinham nenhum tipo de má-formação. O registro da maturação esquelética da maxila e da base do crânio foi realizado na exposição de radiografias de acordo com o método já descrito pelo próprio autor em 1989. O estágio de desenvolvimento ósseo da maxila foi estimado pela radiografia axial, e o estágio de desenvolvimento da base do crânio pela radiografia lateral. Concluiu-se que a elevação e fusão dos processos palatinos aconteceram quando a maturidade esquelética dos ossos da linha média da base do crânio é caracterizada pela ausência de estruturas óssea do occipital, esfenóide, etmóide e frontal. Também encontrou que os estágios de maturação óssea da base do crânio e da maxila foram correlacionados com a maturação das mãos e pés. Concluiu-se que a elevação e fusão das cristas palatinas aconteceram quando os primeiros ossos dos dedos da mão – falange distal – se tornaram visíveis, enquanto que os ossos do pé não tiveram sido ainda reconhecidos radiograficamente.

Segundo **Amwayi** (1993), cerca de 80% das fendas orofaciais são causadas por fatores ambientais. Em países desenvolvidos, os hábitos alimentares têm mudado, verificando-se o aumento do consumo de alimentos industrializados que contém conservantes, alguns dos quais podendo ser teratogênicos quando ingeridos em grande quantidade por indivíduos susceptíveis. Além disso, medicações tomadas em surtos febris e especialmente na gravidez tanto quanto a poluição ambiental podem constituir fatores etiológicos nas anomalias orofaciais. Portanto, é

evidente que o homem é o único modelo morfologicamente adequado para o estudo do palato. Entretanto o uso apropriado de animais de laboratório consiste na construção de modelos teóricos, os quais são válidos para o homem.

Ten Cate, em 1994, salientou a importância de observar o momento crítico no qual os fatores ambientais exercem seus efeitos. Se um agente teratogênico age durante as primeiras quatro semanas de desenvolvimento, quando o embrião está evoluindo rapidamente, ele, geralmente, danifica tantas células que acaba ocorrendo a morte do mesmo. Por outro lado, se apenas algumas células são lesadas, a proliferação normal é suficientemente intensa para eliminar facilmente as pequenas injúrias. Durante o estágio seguinte do desenvolvimento, entre quatro e oito semanas, quando a diferenciação dos tecidos e órgãos está ocorrendo, os agentes teratogênicos são mais efetivos na produção de muitos tipos de malformação, pois é o período no qual está havendo a histodiferenciação e a morfogênese no embrião. A fase subseqüente de crescimento não é suscetível a agentes teratogênicos.

Proffit e Fields, em 1995, comentam que o defeito congênito mais comum envolvendo a face e os maxilares, é a fenda do lábio, palato e, menos comumente, outras estruturas faciais. Os autores citam também que elas surgem durante o 4^{o} estágio de desenvolvimento exatamente no local determinado onde a fusão de vários processos faciais não ocorreu, e isto, por sua vez, é influenciado durante o tempo de vida embrionário

quando ocorreu alguma interferência com o desenvolvimento. Em relação ao fechamento do palato secundário, Proffit e Fields afirmaram que é acompanhada pelo palato primário em aproximadamente 2 semanas, o que significa que a interferência com a formação do lábio que ainda está presente pode afetar o palato. Cerca de 60% dos indivíduos com fenda no lábio também tem uma fenda palatal. A fenda isolada do palato secundário é o resultado do problema que surge depois que a formação do lábio está completa. A incompleta fusão do palato secundário que produz o sulco na sua extensão posterior indica o aparecimento tardio da interferência com a fusão.

Carreirão et al., em 1995, relataram que a embriogênese pode ser alterada por agentes físicos, químicos e biológicos. A combinação da ação deletéria destes fatores ou a intensificação da atividade de um deles pode trazer modificações irreversíveis no comportamento das células da crista neural e, por conseguinte, no mesênquima facial, trazendo como resultado final o nascimento do indivíduo portador de fenda labiopalatina. As alterações da morfogênese que culminam com uma fenda labiopalatina têm o mecanismo etiopatogênico ligado a herança multifatorial. Na verdade identificou-se o fator genético em 35% dos portadores da malformação. Nos demais, 65% apresentaram a patologia em associação aos chamados fatores ambientais. Estes fatores foram identificados por informação familiar e alguns deles, comprovaram sua eficaz ação deletéria em teratologia laboratorial. Estes fatores são:

Materno fetais: estudos conduzidos em mães diabéticas que tiveram filhos com fendas atestaram a presença de um fator anti insulina no soro destas mulheres. Tal fator diminui o aporte nutricional das células que tem por via de conseqüência, seu comportamento modificado, determinando alterações na morfogênese. O hipotiroidismo é outro fator endocrinológico associado ao nascimento de portadores de fendas labiopalatinas. Estudos reproduziram o cretinismo em ratas, que, uma vez prenhes, tiveram crias portadoras de deformidades. Os mesmos animais em gestações subseqüentes, porém sob terapêutica com tiroxina, tiveram crias normais.

O autores também citaram que algumas viroses com neutrofismo podem atacar a placa neural comprometendo o desenvolvimento do mesênquima e a conseqüente alteração da embriogênese. A rubéola, se contraída pela mulher no início da gravidez, pode acometer o embrião. Parece que o vírus da gripe teria ação sobre o desenvolvimento embrionário, podendo determinar o aparecimento de portador de fissura.

Rodriguez-Pinilla e Martinez-Frias, em 1998, apresentaram os resultados de estudo de controle de caso, sobre o relacionamento do uso de corticosteróides durante a gravidez e fendas orofaciais em recém-nascidos. Os dados vieram do Spanish Collaborativa Study of Congenital Malformation. A amostra continha 1184 recém nascidos com fendas orofaciais. Nesta amostra foram retirados casos de grávidas fumantes, mães submetidas a tratamentos com antiepiléticos, benzodiazepínicos, metronidazol ou hormônios sexuais durante o primeiro trimestre de

gravidez. Os resultados mostraram o relacionamento bastante grande entre a exposição de corticosteróides durante o primeiro trimestre da gravidez e aumento do risco de aparecimento de fenda orofacial nos recém nascidos.

2.1 CORTICOSTERÓIDES

Com o objetivo de descrever o crescimento craniofacial pré-natal e o aparecimento das anomalias anatômicas do feto de camundongo durante o desenvolvimento, **Reed** em 1933, fez a investigação profunda embriológica e concluiu:

a) As fendas palatinas não produzem dentes supranumerários, pois no momento em que a fenda aparece pela primeira vez, as estruturas relacionadas não são afetadas pelo número de dentes os quais vão aparecer mais tarde;

b) Falha no abaixamento da língua que está posicionada entre as cristas palatinas, e isto pode ser a causa de fendas palatinas.

c) Nutrição deficiente pode ser um dos motivos da formação de fendas palatinas e labiais.

e) A principal causa da falha na união dos processos palatinos é o atraso do crescimento da região dos processos maxilares, que pode ser o resultado de uma formação genética.

Sabendo-se que a freqüência da presença de fendas palatinas em fetos, quando a cortisona é administrada em ratas prenhes depende de alguns fatores que são: a) da composição genética do animal tratado; b) dose do hormônio, pois se for pequena, será ineficiente na produção de anomalias, entretanto se for em excesso, poderá causar a eliminação de toda a ninhada e c) o tempo de duração da administração da droga

durante a prenhez, **Kalter,** em 1954 estudou a relação da composição genética e a susceptibilidade de ratos, com efeitos teratogênicos da cortisona. Os animais usados foram do tipo A/Jax e C57BL/6Jax. Sabia-se previamente que a raça do tipo C57BL/Jax é resistente à cortisona. As ratas prenhes foram submetidas à cortisona durante 5 dias suscetíveis desde o 15^{o} dia de prenhes. Os resultados mostraram que a cortisona realmente induziu às fendas palatinas nos dois grupos, entretanto, a incidência de anomalias foi maior no grupo de ratas do tipo A/Jax quando comparado com as do grupo do tipo C57BL/Jax. Quando houve o cruzamento de animais entre os dois tipos referidos, formando um terceiro grupo, a incidência do defeito palatino, ficou intermediado entre as duas raças, ou seja, o número de fetos com defeito foi igual quando a mãe era da família da raça mais suscetível. Entretanto, a incidência foi menor no grupo em que a mãe era originada da raça resistente.

Walker e Fraser (1957) comentaram que a forma pela qual o tratamento com a cortisona interfere nos movimentos das cristas palatinas tem sido questionada. Sugeriram que poderia haver a inibição direta na força intrínseca das cristas ou o aumento na resistência da língua em ser deslocada, porém experimentos realizados mostraram a reduzida potencialidade no movimento das cristas, mesmo quando a língua foi removida. Há possibilidade da diminuição no tamanho das cristas, com redução do conteúdo da matriz extracelular e do número de células, além da redução na extensão do contato entre as cristas.

É conhecida a capacidade da cortisona em reduzir a produção das fibras elásticas e a fibrilogênese no tecido conjuntivo durante a cicatrização de ferimentos e, já que o tecido conjuntivo das cristas palatinas sofre metacromasia e reage com o corante de Gomori para tecido elástico, parece que a cortisona inibe o crescimento das fibras ou a consistência da substância fundamental.

Peer et al., em 1958, estudaram a indução de fendas palatinas em fetos de camundongos durante o crescimento pré-natal com a administração de cortisona e a diminuição do aparecimento das referidas fendas através do uso de Vitaminas. As fêmeas prenhes receberam tratamento diário a partir do décimo primeiro dia de prenhez com administração via intramuscular. O estudo foi dividido nos seguintes grupos: a) solução salina (0,2 ml) e cortisona (2,5mg); b) solução salina e vitamina B6 (10mg); c) cortisona e vitamina B6; d) solução salina e ácido fólico (10mg); e) cortisona e ácido fólico e f) cortisona, vitamina B6 e ácido fólico.

Os achados foram surpreendentes na época:

1) Não foram encontrados fetos com fendas palatinas nos grupos que as mães foram tratadas com solução salina e ácido fólico (grupo d) e solução salina e vitamina B6 (grupo b);

2) O grupo com solução salina e cortisona (grupo a) causou 85% de fendas palatinas;

3) A incidência de fenda palatina diminuiu em 43% quando foi administrada vitamina B6 juntamente com cortisona;

4) Diminuiu para 26% quando o ácido fólico foi administrado com a cortisona e

5) Quando a vitamina B6 e o ácido fólico foram combinadas com o tratamento com a cortisona, houve redução para 15% de ocorrências de fendas palatinas.

Larsson, no ano de 1962, estudou a ação teratogênica da Cortisona em camundongos. O autor usou 97 ratas grávidas, divididas em 7 grupos experimentais:

1) Acetato de Cortisona (1,25 mg/Kg);

2) Acetato de Cortisona (1,25 mg/Kg) + Metil androstenediol (1,25mg/Kg)

3) Metil androstenediol (1,25mg/Kg);

4) Metil androstenediol (2,5mg/Kg);

5) Metil androstenediol free vehicle (0,1mg/Kg);

6) Acetato de Cortisona (1,25 mg/Kg) + Vitamina B6 (0,1 mg/Kg) e

7) Acetato de Cortisona (1,25 mg/Kg) + Vitamina B12 (0,025 mg/Kg).

Todas as soluções foram administradas entre o 11^{o} e 14^{o} dia de gestação, e foi interrompida a gravidez no 18^{o} dia de gestação. Os

resultados mostraram o seguinte: no grupo 1) ocorreu incidência de 100% de fenda palatina sem fenda labial; no grupo 2) todos os embriões foram reabsorvidos; nos grupos 3) e 4) somente 8 embriões do total de 130, tiveram fenda palatina sem fenda labial; no grupo 5) houve incidência de 8,1% embriões reabsorvidos; no grupo 6) somente 1 embrião do total de 240 embriões, tinha palato fechado e (estatisticamente igual ao grupo 1) e no grupo 7) fenda palatina foi induzida em 100% dos embriões com índice de 19,6% de embriões reabsorvidos.

Com o objetivo de examinar o efeito teratogênico do glicocorticóide em relação aos outros agentes teratogênicos, na produção de fendas palatinas. **Nanda et al.,** em 1970 dividiram o experimento com ratos *Wistar* em 4 grupos, que foram formados assim: 1^{o} grupo controle com 8 ratas prenhes formando 71 embriões; 2^{o} grupo formado por 10 ratas prenhes, nas quais foram administrados 5 mg de acetato de cortisona entre o 8^{o} dia e 13^{o} de prenhes, formando 86 embriões; 3^{0} grupo que foi formado por 10 ratas prenhes, nas quais foram administrados 0,5 mg de (dexa) também entre o 8^{o} e 13^{o} dia de gravidez, formando 79 embriões e o 4^{o} grupo que continha 10 ratas prenhes, nas quais foram administrados 40.000 UI de vitamina A, entre o 9^{o} e 12^{o} dia de gravidez, formando 77 embriões. Os resultados foram os seguintes: No grupo controle e no grupo que foi utilizado o acetato de cortisona não nasceu nenhum embrião com deformidades de fendas labial e palatal. Já no grupo que foi utilizado a (dexa) apareceu uma incidência de 82% de

fendas palatinas, e no grupo da vitamina A aconteceu 77% de fendas palatinas. Portanto os autores concluíram que a diferença de resultados entre os grupos da cortisona e (dexa), mostrou o alto efeito teratogênico da (dexa) em produzir defeitos de fendas labiais e palatinas.

Walker, em 1971b empregou o método injetando drogas anti-inflamatórias por via subcutânea em ratas prenhez Holtzman, do 12^0 ao 15^0 dia de gestação. A utilização de 0,1mg a 0,8mg por dia de triancinolona, betametasona e dexametasona produziu uma significante freqüência de fenda palatina. Porém, a utilização de metilprednisolona, prednisolona e cortisona, com doses diárias entre 8 mg e 75 mg, não levou à indução de fenda palatina.

Com o intuito de estudar a morfogênese do palato em fetos de hamster normais e tratados com hidrocortisona, **Shah e Travill,** em 1975 determinaram 8 estágios de desenvolvimento normal, e os estágios de desenvolvimento nos fetos tratados com cortisona, confirmados com observações histológicas. Os estágios de desenvolvimento normal encontrados foram:

Estágio I. As cristas palatinas secundárias projetaram-se verticalmente à lateral da língua. A região inferior da língua estava alargada dentro da cavidade oral.

Estágio II. As cristas palatinas mudaram da posição vertical para horizontal acima da língua. Esta reorientação começou aproximadamente

no terço intermediário do palato duro secundário e a partir daí prosseguiu posteriormente e anteriormente. A reorientação das cristas palatinas começou quando a protuberância mesenquimal horizontal apareceu na superfície medial da projeção vertical. A língua recolheu-se da sua posição entre as projeções para próximo do assoalho da cavidade bucal.

Estágio III. As cristas palatinas estenderam-se horizontalmente acima da língua.

Estágio IV. As cristas palatinas opostas aproximaram-se para formar o terço médio do palato duro secundário.

Estágio V. As cristas palatinas opostas fusionaram-se no terço médio do palato duro secundário. A fusão deixou uma abertura triangular no terço anterior do palato secundário. A abertura ficou limitada anteriormente pelo palato primário e posteriormente pelas projeções do palato secundário.

Estágio VI. A aproximação e fusão das cristas palatinas foram completadas no terço posterior do palato duro secundário. Esta fusão resultou uma formação numa abertura na região posterior em forma de diamante, o qual foi formado pelas duas projeções do palato mole com a parede posterior da faringe.

Estágio VII. A abertura posterior em forma de diamante foi obliterada pela fusão das projeções do palato mole.

Estágio VIII. A abertura triangular anterior foi fechada pela movimentação no sentido oposto das cristas palatinas juntamente com o crescimento do septo nasal. No final deste estágio o palato secundário ficou formado. O desenvolvimento do palato secundário seguido com tratamento com hidrocortisona apresentou estas características: Com a administração de hidrocortisona os estágios de I – IV da palatogênese não demonstraram diferenças do desenvolvimento normal, ou seja, inicialmente as cristas palatinas estavam verticalizadas com a língua se interpondo entre elas. No *Estágio II* as cristas palatinas mudaram para a posição mais horizontalizada e a língua já desceu para o assoalho da cavidade bucal, e conseqüentemente as projeções se estenderam por cima da língua. O *Estágio IV* foi reconhecido com a aproximação das cristas palatinas opostas. Entretanto, depois disto, não houve fusão das projeções do palato secundário. Em relação aos pesos corporais dos fetos, os autores tentaram relacionar o peso dos fetos com o estágio de desenvolvimento palatal. No grupo com desenvolvimento normal, pôde-se observar que nos *Estágios II e III* de desenvolvimento palatal os fetos apresentaram um peso médio de 300 mg. No *Estágio IV* a maioria chegou nos 350 mg. Nos *Estágios V, VI* e *VII* quase todos chegaram a pesar 400 mg e finalmente no *Estágio VIII* os fetos apresentaram 500 mg.

Já no grupo tratado com Hidrocortisona, a maioria dos fetos pesou 300 mg nos *Estágios II* e *III*, entretanto somente 40% dos fetos pesaram

350 mg no *Estágio IV* e os pesos maiores aconteceram nos Estágios III e IV.

Shah e Travill, em 1976, descreveram que o componente genético faz parte da susceptibilidade à fenda palatina induzida por glicocorticóides, pois diferentes espécies de camundongos exibiram diferentes graus de resposta ao tratamento com o mesmo. Vários mecanismos têm sido propostos para explicar essas diferentes respostas à ação teratogênica dos corticóides, sugerindo-se a relação com o momento de elevação das projeções. As cristas palatinas, durante o desenvolvimento normal, se tornam horizontais mais tardiamente em uma espécie que na outra e esta diferença parece tornar a primeira mais susceptível à cortisona que a última. Outras explicações possíveis são as diferenças de metabolismo, diferenças no nível de esteróides endógenos, distribuição diferencial de esteróides nos tecidos maternos e fetais e diferenças na sensibilidade das células constituintes das estruturas faciais embrionárias. Os corticóides podem atravessar a barreira placentária sem serem metabolizados. Quando administrados em doses farmacológicas nas ratas prenhez, uma fração alcança o embrião e parecem funcionar como agente teratogênico ativo.

Estudos morfológicos sobre indução de fenda palatina com cortisona, mostraram um atraso na rotação das cristas palatinas do plano sagital para o plano transversal. A cortisona também reduz os movimentos musculares fetais, o que pode explicar o porquê do

deslocamento da língua entre as cristas palatinas se torna atrasada. Alguns trabalhos sobre desenvolvimento extra-uterino de fetos de ratos demonstraram que os maiores obstáculos da rotação das cristas palatinas são as membranas fetais e a língua. Sabendo-se disto **Walker e Patterson,** em 1978, resolveram avaliar o desenvolvimento do palato após a remoção da língua e liberação das membranas fetais num procedimento extra-uterino de fetos de ratos da raça CD-1. Este trabalho consistia de 2 grupos de estudos de fetos tratados com dose diária de 2,5 mg de acetato de cortisona durante 3 dias a partir do décimo primeiro dia de prenhez. O primeiro grupo tinha 10 ninhadas com 114 fetos coletados no décimo sétimo dia de gravidez com o objetivo de avaliar a freqüência de fenda palatina produzida com a referida dose. E o segundo grupo com os fetos tratados com a mesma dose diária, mas com a remoção das membranas fetais e da língua no décimo terceiro dia de gravidez. Os resultados indicaram o seguinte: No grupo que as mães foram tratadas com acetato de cortisona e os fetos foram coletados no décimo sétimo dia de gravidez a porcentagem de palato fusionado foi de 4 %; no grupo de fetos que foram retirados das membranas fetais a fusão palatal foi de 21% e no grupo que a língua foi removida durante o desenvolvimento extra-uterino, a freqüência de fusão palatal aumentou em 61%. Portanto os autores concluíram que as fendas palatinas induzidas pela cortisona houve interferência na rotação das cristas palatinas.

Com o objetivo de entender o mecanismo de indução da fenda palatina, crescimento crânio-facial e desenvolvimento palatal, **Diewert** em 1979 estudou em ratos (Sprague-Dawley) depois de tratamento com 6-aminonicotinamida no 15^{o} dia de gestação. A menor dose teratogênica (8mg/Kg), produziu pequena retrognatismo mandibular no dia 16^{0} dia da gestação com uma pequena fenda no palato secundário. Com a dose média (8mg/Kg) com FASTING, produziu retrognatismo mandibular mais severo e resultou em 37% de fendas palatinas completas e 63% de fendas palatinas parciais. E por fim, com a maior dose teratogênica (16mg/Kg), produziu retrognatismo mandibular severo com 100% de fendas palatinas completas. O autor concluiu que o tratamento com 6-Aminonicotinamida produz anormalidade nas células epiteliais do palato, dos germes dentários e no septo nasal. Os germes dentários dos molares e incisivos eram pequenos e malformados, e as superfícies epiteliais do palato e do tecido mole do septo nasal não se fusionaram.

Diewert e Pratt, em 1981, realizaram uma análise morfométrica do desenvolvimento palatal de 2 grupos de fetos de ratos. O primeiro grupo era o controle e, o segundo, proveniente de ratas nas quais foi administrada cortisona do 11^{o} ao 14^{o} dias de gestação. Os fetos do grupo tratado com cortisona tinham dimensões verticais menores na região anterior da cavidade oronasal, cristas palatinas menores e no décimo quinto dia, antes da elevação completa da crista, apresentavam a maxila mais larga que o grupo controle. O potencial de contato entre as cristas

palatinas nos fetos com cortisona foi de 4% em relação ao grupo controle. Pode-se concluir que a não elevação das cristas palatinas e a falta de contato extenso entre elas foi o principal fator que causou a fenda nos ratos, e não a falta de fusão das mesmas após o contato, uma vez que o epitélio era semelhante nos dois, e que em um dos fetos tratados com cortisona no décimo sexto dia ocorreu a fusão palatal.

Com dúvida de qual tecido é primeiramente afetado por um agente teratogênico, o tecido epitelial ou mesenquimal, **Shah,** 1986, estudou os aspectos celulares da fendas palatinas induzidas teratogenicamente e correlaciona as anormalidades morfológicas, celulares e bioquímicas.

O autor teve como objetivo, estudar três agentes teratogênicos: 1) *hadacin*, que afeta o desenvolvimento vertical das cristas palatinas e impede sua reorientação; 2) *5-fluorouracil (5-FU)*, o qual retarda a reorientação e 3) *hidrocortisona*, que impede a fusão.

O hadacin foi injetado antes do aparecimento inicial do palato, porque num momento anterior a droga não é efetiva na formação de fenda palatina. Já a *hidrocortisona* e o 5-*fluorouracil*, foram injetados no décimo primeiro dia de gestação quando as cristas palatinas verticais já estariam desenvolvidas.

No tratamento com hadacin, mudanças apareceram primeiramente nas células mesenquimais. Em algumas dessas células mesenquimais, 12 horas depois do tratamento, a membrana nuclear estava inchada e

acumulada com cromatina o qual foi espalhado por todo o nucleoplasma. Outras células mesenquimais estavam com aparência normal. Dezoito horas depois, estas células mesenquimais mostraram desenvolvimento de lisossomas. O aparecimento de lisossomos nas células mesenquimais é anormal nesta hora.

Depois, alterações foram vistas na lâmina basal. Em algumas áreas do espaço da lâmina lúcida estava aumentada, e a lâmina densa estava separada do epitélio. Em outras áreas, a lâmina densa apareceu duplicada ou multiplicada. Entretanto, a lâmina densa sempre esteve contínua.

Subseqüentemente, a atividade dos lisossomos foi gradualmente desaparecendo, primeiro do epitélio, e depois das células mesenquimais. A lâmina basal recuperou a sua forma normal.

Estas observações indicam que o efeito do hadacin foi observado primeiro no mesenquima, antes do aparecimento das cristas palatinas. Parece que o aparecimento cronologicamente anormal dos lisossomos nas células mesenquimais pode ter afetado na proliferação celular e/ou no comportamento migratório antes da formação das projeções. Conseqüentemente, quando as cristas palatinas desenvolvem-se, o número de células mesenquimais do início do palato eram insuficientes ou sua diferenciação foi afetada. Uma interrupção tão precoce pode afetar a massa crítica de tecido necessária para sustentar o desenvolvimento vertical das projeções.

Em contraste com a *hadacin*, *5-FU* retarda a reorientação das cristas palatinas. Logo após o tratamento da 5-FU, mudanças foram vistas primeiramente nas células precursoras MEE das cristas palatinas. Seis horas depois, pela primeira vez, os lisossomos apareceram nas células epiteliais, e depois nas mesenquimais. Com o passar do tempo, a maioria das células epiteliais mostraram atividade dos lisossomos, mas esta atividade é predominante no mesenquima. Dezoito horas depois, as atividades dos lisossomos diminuíram. A lâmina basal perdeu-se ou fragmentou-se. Trinta horas depois, tanto as células epiteliais como as mesenquimais, e a lâmina basal, tornaram-se normais na posição vertical das projeções verticais. Estas observações indicam que os danos nas células epiteliais e mesenquimais foram tão severas que alteraram o padrão de diferenciação. Em comparação com o grupo de animais controle, as cristas palatinas estavam ou horizontais ou fusionadas. A presença de lisossomo depois do tratamento 5-FU tem diferentes implicações que as observadas depois do tratamento de hadacin.

Diferentemente do hadacin e 5-FU, a hidrocortisona impede a fusão das cristas palatinas. O efeito inicial da hidrocortisona foi no núcleo das células epiteliais basais do desenvolvimento vertical das projeções e foi caracterizado pelo acúmulo de cromatina e redução de densidade de elétrons no nucleoplasma. Tudo isto seguido por alterações citoplasmáticas caracterizadas por redução de polirribossomos e inchaço de RER e mitocôndria. Estas alterações foram interpretadas como

mudanças degenerativas irreversíveis. As mudanças epiteliais basais, foram seguidas por destruição de lâmina basal das projeções verticais. Quando a projeção palatina se torna horizontal, mais células basais mostram-se degeneradas.

Com o objetivo de estudar as diferenças entre os gêneros masculino e feminino de embriões de ratos, considerando a velocidade e ritmo da formação do palato durante a prenhez, **Watanabe e Endo,** em 1989 avaliaram os embriões no 14^{o} dia de v.i.u.. Foi encontrado que o peso corporal médio dos fetos masculinos era maior que os femininos e a formação do palato nos fetos femininos foram encontrados mais adiantados que dos masculinos quando comparados com o peso corporal. Portanto, concluíram que as mães quando expostas à algum agente teratogênico, pode produzir diferenças quanto ao gênero na incidência de defeitos na formação do palato.

Haynes (1991) cita que análogos sintéticos biologicamente ativos dos adrenocorticosteróides são substâncias capazes de alterar o padrão de secreção do córtex supra-renal através da inibição de algumas reações de biossíntese. Comenta também que há conceitos de dois tipos de hormônios córtico-supra-renais: os mineralocorticóides, regulando primariamente a homeostasia dos eletrólitos e os glicocorticóides, que são hormônios envolvidos no metabolismo dos carboidratos.

Os efeitos dos corticosteróides são numerosos e disseminados. Aparecem como importantes reguladores do metabolismo dos

carboidratos, das proteínas e lipídios, do equilíbrio eletrolítico e das funções do sistema cardiovascular, rins, músculos esqueléticos, sistema nervoso e outros órgãos e tecidos. Além disso, os corticosteróides conferem ao organismo a capacidade de resistir a numerosos tipos de estímulos nocivos e a alterações ambientais.

Os corticosteróides, como outros hormônios esteróides, participam da síntese das proteínas. Eles reagem com proteínas receptoras no citoplasma das células sensíveis, formando um complexo esteróide-receptor.

São observadas duas categorias de efeitos tóxicos no uso terapêutico dos corticósteróides: os resultantes da suspensão do fármaco e os oriundos do uso contínuo de grandes doses. A miopatia, caracterizada por fraqueza da musculatura proximal dos braços e das pernas e dos músculos associados dos ombros e músculos pélvicos, ocorre ocasionalmente em pacientes que recebem grandes doses. Trata-se de uma complicação grave e de uma indicação para a suspensão do tratamento. Os distúrbios comportamentais podem assumir várias formas, incluindo nervosismo, insônia, alterações do humor ou da psique e psicopatias do tipo maníaco-depressiva ou esquizofrênica. Foi relatado a ocorrência de cataratas subcapsulares posteriores em crianças submetidas à terapia com costicosteróides.

McCoy e Shirley (1992) descobriram que a administração de testosterona foi mais perniciosa no desenvolvimento e subseqüentemente

na função reprodutiva na prole do que a administração da cortisona. Sugere o autor também que as mudanças que ocorrem em respostas ao stress materno ou à administração de hormônio adrenocorticotrópico durante a prenhez, são mais pelo resultado de aumento de testosterona do que aumento de secreção de glicocorticóides.

Melby, em 1974**,** relacionou as indicações clínicas principais e mais comuns de uso dos corticosteróides que são:

Na Reumatologia: artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico, doença reumática, esclerodermia, vasculites, polimiosite;

Na Neurologia: esclerose múlitpla, edema cerebral, miastemia gravis, coréia, convulsão, tumor cerebral ou metastático, neurite;

Pneumologia: asma, bronquite, bronquiolite, aspergilose pulmonar, hemossiderose, sacoidose;

Alergia – Imunologia: rinite, anafilaxia, urticária, dermatites, edema angioneurótico, reações medicamentosas, picada de insetos;

Endocrinologia: insuficiência adrenal, hiperplasia adrenal congênita, crise tireotóxica, tireoidite subaguda, hipoglicemias, hipercalcemias;

Hematologia: púrpura trombocitopênica idiopática, anemia hemolítica auto-imune, anemia aplástica, neutropenia auto- imune, trombocitopenia, reações transfusionais;

Oncologia: linfomas, leucemias; na Gastroenterologia: retocolite ulcerativa, hepatite crônica, necrose hepática subaguda, hepatite alcoólica; na Infectologia: meningite bacteriana, tuberculose;

Nefrologia: síndrome nefrótica, nefrite;

Cardiovascular: cardite reumática, miocardite, pericardite, hemagioma, choque hemodinâmico, choque endotóxico, artrite temporal;

Dermatologia: eczema, dermatite, neurodermite, pênfigo, alopecia areata, líquem plano, micose fungóide, necrose epidérmica tóxica, psoríase, lúpus discóide, granuloma anular;

Oftalmologia: conjuntivite, uveíte, discinesia ocular, endoftalmite, ceratie, úlcera marginal, coroidite, oftalmia, retinite, irite, iridociclite;

Otorrinolaringologia: rinite, otite, sinusite, epiglote, laringite, estenose traqueal, polipose;

Ortopedia: bursite, sinovite, tendinite, osteartrite, osteartorse, espondilite anquilosante, coccidínea, lumbago, torcicolo, ciática, fascite, exostose, artrite;

Transplantes: de rim, fígado, coração, pulmão, medula óssea e outros;

Ginecologia – Obstetrícia: prevenção da síndrome de angústia respiratória.

Bittencourt e Bolognese, em 2000, estudaram o mecanismo normal e anormal da formação do palato em ratos da linhagem *Wistar*. Os embriões e fetos dos grupos controle e experimental foram avaliados macroscopicamente e através da microscopia ótica, eletrônica de varredura e de transmissão. Foi também estabelecida uma correlação entre a incidência de fenda palatina e o sexo do embrião. No grupo controle, antes de assumirem a posição horizontal, as cristas palatinas se apresentavam cobertas por epitélio com várias camadas de células cubóides, especialmente na crista medial, que aparecia separado do mesênquima subjacente por uma lâmina basal contínua. À medida que as cristas cresciam em direção à linha média, o epitélio mais fino e a crista medial passaram a ser coberta por apenas uma camada de células, a qual se uniu com sua contraparte anatômica por meio de desmossomos. Não foi verificada nenhuma evidência de morte ou transformação das células epiteliais.

No grupo experimental, houve um retardo na mudança de posição das cristas para a direção horizontal, as quais apareciam cobertas por uma fina camada de células epiteliais, separadas do mesênquima subjacente por uma membrana basal descontínua. As cristas horizontais não entraram em contato uma com a outra e as células epiteliais da crista medial sofreram estratificação e queratinização. A fenda palatina induzida experimentalmente ocorreu em todos os fetos, machos e fêmeas, obtendo-se uma incidência de 100%. Deste modo, tornou-se impossível

evidenciar qualquer tipo de imunidade conferida pelo sexo na determinação desta malformação congênita.

2.2 AGENTES ANTI-TERATOGÊNICOS

Com o propósito de verificar se a Vitamina B6 previne fendas palatinas induzidas pela cortisona em fetos de camundongos SWR/NIH, **Yoneda e Pratt,** em 1982, administraram 125 mg/kg de acetato de cortisona via subcutânea no décimo primeiro dia de gestação nas fêmeas. Neste grupo foi induzido 68% de fendas palatinas nos fetos formados.

No outro grupo a incidência de fenda palatina diminuiu para 26% quando as ratas prenhes receberam água com 100*u*g/ml de Vitamina B_6.

Com o objetivo de averiguar a eficiência do uso durante a gravidez do ácido fólico em relação a prevenção de D.T.N., **Milunsky et al.,** em 1989**,** entrevistaram 23.491 grávidas. As entrevistas foram feitas com questionário sobre dieta alimentar realizada durante o 1^0 trimestre de gravidez. Os resultados mostraram que prevalência de DTN foi de 3,5% entre as mulheres que nunca usaram suplementação multivitamínica nem antes da concepção nem durante os 3 primeiros meses de gestação. Já no grupo de mulheres que fizeram uso de suplementação multivitamínica incluindo o ácido fólico durante a primeiras 6 semanas de gravidez, a prevalência caiu para 0,9% de DTN.

Entretanto, nas mulheres que fizeram uso de suplementação multivitamínica sem a presença do ácido fólico, durante as 6 primeiras semanas de gravidez e mulheres que começaram a fazer uso da suplementação multivitamínica com ácido fólico a partir da 7^a semana de

gravidez ou mais tarde, a prevalência foi igual das não usuárias de suplementação multivitamínica com (A. F.) nas primeiras 6 semanas de gravidez.

Em 1991, **Hansen e Grafton** estudaram o potencial do (A. F.) em prevenir o aparecimento de defeitos primários do tubo neural induzida teratogenicamente pelo Ácido Valpróico em fetos de ratos. Este estudo foi conduzido de tal maneira que foi testado várias concentrações tanto do (A. F.) como também do Ácido Valpróico

Os autores concluíram que o acréscimo de (A. F.): a) não alterou a circulação sanguínea no cordão umbilical; b) não houve diferença significante em relação ao crescimento e desenvolvimento pré-natal e c) não diminuiu as ocorrências de alterações no tubo neural.

Com o objetivo de determinar se a ingestão de complemento vitamínico antes da concepção, pode reduzir o incidência da primeira ocorrência dos D.T.N., **Czeizel e Dudás** (1992) estudaram 4753 mulheres que estavam programando as suas gestações. Elas receberam dois tipos de complementos vitamínicos: grupo 1, Complemento vitamínico (12 vitaminas, incluindo 0,8mg de (A. F.), 4 minerais, e 3 “traces” elementos) e o 2^{o} grupo Trace-elemento complemento (cobre, magnésio, zinco e uma dose bem pequena de vitamina C) diariamente durante pelo menos um mês antes da concepção até a data do segundo mês sem menstruação.

Os resultados mostraram que: foram confirmadas as gestações de 2104 mulheres que receberam o complemento vitamínico e 2052 que receberam o *trace-element* complemento. O número de mal-formações congênitas foram significantemente maior no grupo que recebeu somente o *trace-element* complemento. Houve seis casos de defeitos do Tubo-Neural no grupo que recebeu o complemento trace-element, comparado com nenhum caso do grupo que recebeu o complemento vitamínico completo. A incidência de fenda labial com ou sem fenda palatina não foi reduzida com o complemento vitamínico pré-concepção. Os autores concluíram que a ingestão de complemento vitamínico pré-concepção reduz a incidência da primeira ocorrência de D.T.N..

Sabe-se que a droga antiepilética (ácido valpróico) está associada com um aumento de incidência de problemas com mal formação do tubo neural, quando é administrada no começo de gravidez. **Sato et al**. (1995) estudaram a ação do ácido pantotênico na diminuição da indução teratogênica desta droga. Injetaram via subcutânea no 8^{o} dia de gestação de camundongos solução de 5 mL/Kg de ácido valpróico. O ácido pantotênico foi dissolvido em água e injetado intra-peritoneal (10m/Kg). Concluíram que o ácido pantotênico não foi capaz de diminuir a incidência de defeitos de formação do tubo neural quando induzidos pela ação do ácido valpróico. Afirmaram também que a suplementação do ácido pantotênico com folato, durante a gravidez pode determinar uma proteção adicional contra mal formações congênitas induzidas pelo ácido valpróico.

Com o objetivo de estudar os efeitos da suplementação multi-vitamínica e do (A. F.) durante a concepção, em relação a recorrência a fenda labial com ou sem fenda palatina, **Talarova e Harris** (1995) avaliaram 221 grávidas com riscos de ter uma crianças com fenda labial e palatina. O protocolo de suplementação vitamínica incluiu vitaminas (A, B1, B2, B6, C, D3, E, nicotinamida, cálcio pantotênico) e (A. F.) com dose de 10mg/dia, começando 2 meses antes da concepção, continuando até o terceiro mês de gravidez. Este grupo foi comparado com o grupo controle que tinha 1901 mulheres que não receberam nenhuma suplementação vitamínica durante a gravidez e que deram a luz no mesmo período que o grupo teste.

No grupo teste que possuía 221, apareceram somente 3 casos de crianças com fendas labiais e palatinas. Dos 3 casos, uma menina teve fenda completa bilateral labial e palatina. Ela era a segunda filha da mãe que tem fenda completa bilateral labial e palatina. Esta mãe tinha tido febre e tomou anti histamínico junto com a suplementação multi-vitamínica. Outra menina, a qual teve fenda labial e palatina unilateral, seu pai tinha fenda labial e palatina bilateral. E no terceiro caso, ocorreu fenda labial unilateral num menino o qual a mãe tinha fenda labial e palatina. Portanto, a freqüência de fenda em recém nascidos foi menor entre as mães que receberam suplementação vitamínica, representando uma diminuição de 65,4%. Quando o grupo teste foi subdivido em sexo, o sexo masculino apresentou grande diferença, ou seja, bem menor

quantidade de fenda em relação ao sexo feminino. Agora quando o grupo teste foi dividido em severidade de fenda (unilateral e bilateral), a fenda unilateral mostrou bem menor quantidade.

Sendo o ácido valpróico uma droga anticonvulsivante conhecida que causa espinha bífida em humanos, **Hansen et al.,** em 1995 resolveram investigar a habilidade do (A. F.) em diminuir a incidência de defeitos neurais causados pela ação do ácido valpróico.

Experimento 1: No 8^{o} dia de gestação, os camundongos foram tratados com ácido folínico dissolvidos em água e aplicado com uma injeção de 4mg/Kg via intraperitoneal. Estas aplicações eram feitas uma hora antes da administração de injeção subctânea de ácido valpróico com dosagem de 600mg/Kg. No 17^{o} dia de gestação os animais eram sacrificados e o conteúdo uterino era examinado.

Experimento 2: No 7^{o} dia de gestação, mini bombas osmóticas contendo ácido folínico dissolvidos em água foram implantados subcutâneamente no dorso dos camundongos. A administração do ácido valpróico era feita 12 horas depois da implantação das mini bombas nos 8^{o} dia de gestação. A dose do ácido valpróico era de 500 mg/Kg. Os animais foram sacrificados no 17^{o} dia de gestação e o conteúdo uterino foi examinado.

Experimento 3: Os camundongos eram alimentados por comida que continha 12 mg/Kg de (A. F.) antes e durante a gravidez. No 8^{o} dia de

gestação, a metade do grupo de camundongos eram tratados com injeções subcutâneas de ácido valpróico com dosagem de 600 mg/Kg. E outra metade do grupo recebia água destilada por injeção subcutânea. Os camundongos eram sacrificados no 12^{o} dia de gestação e o conteúdo uterino era examinado.

Os autores concluíram que o ácido valpróico é um agente embriotóxico nos camundongos e nos embriões. A administração do (A. F.) ou uma dieta acrescentada com (A. F.) não altera a embriotoxicidade do anticonvulsivante.

Estudos sobre a suplementação de (A. F.) antes e durante a gravidez confirmam a redução da ocorrência de defeitos do D.T.N.. Sabendo disto, **Czeizel et al.,** em 1996**,** estudaram 30.663 mulheres grávidas em um Hospital Húngaro entre os anos de 1980 e 1991. Neste período estudado, 54,9% das mães tiveram bebês saudáveis cujas as mães receberam altas doses de (A. F.). Naquelas 17.300 mulheres que tiveram filhos com anormalidades congênitas, a média de uso do ácido fólico foi 50,4%. Estes dados mostram que a suplementação de (A. F.) durante a gravidez mostrou significante proteção no aparecimento de problemas cardíacos, D.T.N. e formação de fendas orofaciais.

Eskes, em 1998**,** afirma que quando há uma suplementação de (A. F.) no período pré-concepção, diminui sensivelmente a ocorrência e recorrência de D.T.N. Ele afirma também que a redução da atividade do ciclo do folato metilado parece ser uma hipótese interessante na etiologia

dos DTN. O autor chegou à algumas conclusões importantes: a) o Folato não é importante somente no tratamento da anemia megaloblástica, ou seja, o A. F. associado ao Ferro ajuda na recuperação de anemias especialmente na gravidez, pois o Folato é necessário na recuperação funcional celular; b) o Tubo Neural do ser humano se fecha na 4ª semana de gravidez, e a maioria dos casos (92%) de casos de D.T.N. tem origem multifatorial. O grupo com síndromes ou múltiplos D.T.N. incluem as aberrações cromossômicas (trissomia 18), mutações genéticas (Síndrome Meckel) e uso de medicações teratogênicas (ácido valproico); c) o (A. F.) é muito importante no metabolismo do carbono; d) o uso de tabletes multivitamínicos com (A. F.) reduz não somente a taxa de ocorrência de D.T.N., mas também a maioria das anomalias congênitas sindrômicas não genéticas. e) o consumo extra de alimentos que contém folato é muito menos efetivo do que realizar um tratamento suplementar com A. F..

O mesmo autor em 1998 comenta sobre a campanha do uso de (A. F.) nos Países Baixos (*Netherlands*). Esta campanha foi estabelecida depois que o Governo consultou o *National Health Council* e *Nutrition Council*. A campanha consistia numa suplementação nutricional diária com o consumo de um tablete de 0,5 mg de (A. F.), desde de 4 semanas antes da concepção até 8 semanas depois, em mulheres que estavam planejando gravidez. O autor salienta ainda que esta suplementação é muito importante, porque a nossa nutrição diária não é ótima e não possui a quantidade mínima necessária de (A. F.), apesar de encontrá-la

facilmente em vegetais não cozidos, pães, leite, derivados do leite, batata e frutas. Também argumenta que o (A. F.) sintético (em tabletes) é muito melhor absorvido. Por fim, o autor comenta que existe uma assistência internacional na prevenção de D.T.N. com (A. F.). Nos USA, Irlanda e Inglaterra existem campanhas para enriquecimento da alimentação diária com (A. F.), como também em outros países tais como: Alemanha, Austrália, Canadá, China, Hungria, Nova Zelândia e África do Sul, acontecem outros tipos de campanhas que contém o (A. F.).

O autor termina o seu artigo citando o pesquisador Oakley em um editorial publicado em 1993 com o título: “Folic Acid - preventable spina bífida and anencephaly.” no J. Am. Méd., que escreve o seguinte: “Uma das mais notáveis descobertas médicas da última parte do século 20 é o ácido fólico. Uma simples, extremamente acessível vitamina hidrossolúvel, que pode prevenir Spina Bífida e anencephaly. Nós podemos comparar esta descoberta com o surgimento da vacina para Rubéola 30 anos atrás, pela oportunidade da prevenção primária e tão fácil de defeitos neonatais sérios”.

Paros e Beck, em 1999, estudaram o efeito do (A. F.) em um grupo de camundongos da raça A/WySn os quais apresentavam fenda labial e palatina espontânea de 25 a 25% com tamanho de ninhada reduzida (aproximadamente seis filhotes). Este estudo foi formado por 3 grupos: 1) controle; 2) administrado 0,9% de NaCl com mini bombas por via osmótica e o grupo 3) (A. F.) em água destilada administrada também

com mini bombas por via osmótica. O (A. F.) começou a ser administrado a partir do oitavo dia de gestação, sendo dissolvido 12mg em água. As mini bombas foram implantadas subcutâneamente na região escapular. Os fetos foram removidos no décimo oitavo dia de gravidez e foram examinados com o objetivo de averiguar o número de mortes, freqüência de fenda labial e outras más formações.

Os resultados mostraram que o grupo tratado com (A. F.) produziu uma quantidade significante menor de fendas labiais/palatinas (10,2%) em relação ao grupo não tratado (40%) e ao grupo tratado com NaCl (28%). Entre os fetos que apresentaram fenda labial, não houve diferença na proporção de animais com fenda palatina.

Em relação ao peso corporal médio dos fetos, não houve diferença estatística entre os grupos, sendo que no grupo 1) o peso corporal médio foi de 9,82 g; no grupo 2) 10,74g e no grupo 3) 10,55g.

Hartridge et al., em 1999, revisaram a literatura com o objetivo de descrever a função da suplementação de (A. F.) durante a gravidez e avaliar o potencial em prevenir as anormalidades no desenvolvimento do tubo neural. Os autores recomendam que toda mulher que planeja uma gravidez, deve acrescentar à sua dieta alimentar uma suplementação de (A. F.) com o objetivo de prevenir anomalias no desenvolvimento do tubo neural, particularmente se já existe alguma história de gravidez conturbada. Existem forte evidências que a suplementação com (A. F.), reduz a incidência de fendas palatinas.

Sabendo-se que uma grande quantidade de D.T.N. podem ser prevenidas com a suplementação de (A. F.) antes da concepção e até os 3 primeiros meses de gestação, **Shin e Shiota,** em 1999, verificaram os efeitos da suplementação de (A. F.) em camundongos fêmeas grávidas onde ocorreu indução de D.T.N. provocada pela hipertemia materna.

Quando as mães grávidas receberam tratamento com dose diária de (A. F.) (3mg/Kg) desde o dia zero de gestação até o décimo dia, e a hipertemia foi provocada no oitavo dia, a prevalência de D.T.N. foi significantemente menor (26,6%) que o grupo de mães que tiveram hipertemia induzida sem tratamento com (A. F.) (38,6%). Portanto os resultados deste trabalho sugere uma suplementação pré-natal de (A. F.) diminui a indução de D.T.N. pela hipertemia em camundongos, ou seja, é recomendado a ingestão de (A. F.) no início da gestação com o objetivo de evitar o nascimento de crianças malformadas.

Num estudo prospectivo, **Czeizel et al.,** em 1999 avaliaram a ocorrência da fenda labial e palatina em recém nascidos de mães que receberam ou não suplementação multivitamínica de (A. F.). As mães que receberam suplementação foram recrutadas entre o dia 1^{o} de maio de 1993 e 30 de abril de 1996. As referidas mães recebiam 1 tablete de Elevit Pronatal que continha: (vit. A – 4000IU; B1 – 1,6mg; B2 – 1,8mg; nicotinamida – 19,0 mg; B6 – 2,6mg; B12 – 4,0mg; vit. C – 100,0mg; vit. D – 500IU; 15,0mg; cálcio pantothenate – 10,0mg; biotin – 0,2 mg; (A. F.) – 0,8mg; cálcio – 125mg; fósforo – 125mg; magnésio – 100mg, ferro –

60mg e zinco – 7,5mg). Esta administração começou 1 mês antes da concepção e foi até o final do terceiro mês de gravidez. No grupo de grávidas que receberam suplementação vitamínica (n=3019), ocorreu 3 fendas labiais / palatinas e 1 fenda palatina isolada. No grupo de grávidas que não recebeu a suplementação vitamínica (n=3432), ocorreu somente 2 fendas labiais e palatinas.

Os autores concluíram que a deficiência de (A. F.) (folato) na gravidez tem um papel importante na origem da fendas labiais e palatinas, e isto pode ser neutralizado com uma suplementação de (A. F.). Entretanto, a suplementação multivitamínica diária com (A. F.) com doses fisiológicas de (> 1mg), pode não reduzir a prevalência de fendas labiais e palatinas. Somente administração de altas doses (6mg / dia) de (A. F.) durante o período crítico que coincide com o desenvolvimento do palato primário e secundário, parece ser efetivo na redução de fendas orofaciais.

Cooper et al., em 2000, estudou as características da incidência de fendas lábio palatinas em crianças não sindrômicas que nasceram na China no período de 1980 a 1989. Foram estudados 528 (308 homens e 220 mulheres. Os resultados mostraram que a incidência de fendas orofaciais foi de 1.2 a cada 1000 nascimentos, concluindo assim que a prevalência de fendas orofaciais é similar com o povo Caucasiano. Houve significante relação com a formação de uma mal formação com a idade da mãe, ou seja quanto mais velha a mãe, aumenta probabilidade de aparecimento de mal formações.

Loffredo et al., em 2001 fizeram um estudo que tinha como objetivo específico de chamar a atenção, sobre a hipótese de que fendas labiais, palatinas ou ambas serem inversamente associadas com uma dieta materna, e complemento vitamínico durante os quatro primeiros meses de gravidez. O grupo teste possuía 450 crianças, com menos de 1 ano de idade não sindrômicas com Fendas Palatinas e Fendas Labiais (o Hospital de pesquisa e reabilitação de Lesões Lábio-Palatinas, Bauru-SP, USP). Das 450 crianças, 354 (78,6%) tinha fenda labial e palatina, e 96 (21,4%) tinha fenda palatina somente.

O grupo controle era de 450 crianças nascidas consecutivamente num hospital no estado de São Paulo.

Os autores elaboraram uma entrevista com 50 questões para avaliar diretamente a etiologia das fendas palatinas e labiais: existência de fendas palatinas ou labiais na família; doenças dos pais; tinha poluição na região onde a família nos primeiros meses de gravidez; ingeriu drogas no começo da gravidez; ingeriu complementos vitamínicos, se fumou (quantos cigarros) durante gravidez.

Concluíram que o uso de suplementação vitamínica nos 4 primeiros meses de gravidez mostrou-se ter proteção efetiva tanto para fendas palatinas e fendas labiais e palatinas.

Itikala et al., no ano de 2001**,** estudaram a incidência de fendas labiais / fendas palatinas e fendas palatinas, que acontece em 1 criança

para cada 1000 crianças e 1 para 2.500 crianças, respectivamente. Foi usado como base para seu estudo, uma população de 309 recém-nascidos com fendas orofaciais, destes 222 com fenda labial e palatina e 87 com fenda palatina isolada. Também foram estudado paralelamente 3.029 bebês desde 1968 até 1980 com o objetivo de avaliar a relação do uso regular da suplementação vitamínica e a prevalência de fendas orofaciais. Foi encontrada uma redução de 48% do risco de fendas lábio palatinas entre as mães que fizeram uso de alimentação multivitamínica antes da concepção, ou seja, ou começaram com o uso durante o primeiro mês de gravidez. Não aconteceu a diminuição do risco de formação de fenda lábio palatina ou fenda palatina isolada em mulheres que iniciaram o uso de suplementação vitamínica no segundo ou no terceiro mês após concepção. Os autores concluíram que o mais importante na prevenção de formação de fendas lábios palatinas não é a administração de alta dosagem de suplementação vitamínica, e sim identificar os componentes ótimos para prevenção das mal-formações que são a dose ideal de suplementação vitamínica, da época crítica de administração do antiteratogênico, e conhecer os mecanismos biológicos na pevenção das fendas orofaciais.

Bienengraber et al. (2001), estudaram os efeitos anti teratogênicos do (A. F.), onde fendas palatinas foram induzidas experimentalmente em ratos, pelo uso da procarbazina.

Foi usado rato do tipo LEW 1A pesando em média 250gr, onde foram deixados convencionalmente em um regime de luz artificial 12h claro / 12h escuro. A cópula aconteceu entre 6h e 10h da noite. Para o experimento, foram usadas um total de 14 ratas.

Grupo 1) 4 ratas receberam 200mg/Kg procarbazina pela administração por gavagem no 14^{o} dia de gravidez.

Grupo 2) 7 ratas receberam 200mg/Kg procarbazina pela administração por gavagem no 14^{o} dia de gravidez, com uma dose de 4mg/kg de (A. F.) (subcutâneo) começando no dia 14^{o} até 17^{o} de gravidez.

Grupo 3) 3 ratas. (Grupo controle).

Foram realizados cesarianas em todas as mães, no 20^{0} dia de gestação, Todos os medicamentos foram ministrados entre 11 e 12 horas da manhã (ritmo circadiano). Depois da pesagem, as cabeças foram removidas e cortadas em 35 cortes frontais (melhor técnica para diagnóstico histológico de fenda labial e palatina). Soluções de Hemalaun-eosin ou Goldner foram usadas para coloração. O número e a extensão das fendas palatinas foram associadas à mal formações, especialmente à microgenia e microglossia.

Os resultados foram os seguintes: Procarbazina geralmente causa retardo no desenvolvimento fetal e atrasa a ossificação do esqueleto quando ministrado no dia 14^{0} dia de gestação.

Nos fetos do grupo controle, não houve fenda palatina.

Grupo 1) Ocorreu 27 de 30 casos (90%) de fetos com fenda palatina que foram tratados com procarbazina. Vários graus de fenda palatina foram encontrados no palato secundário situado imediatamente dorsal até o ducto naso-palatino. Ocorreu predominantemente fenda palatina bilateral; 3 casos unilateral, 2 casos de fenda palatina submucosal.

No grupo 2) no qual recebeu a administração conjunta do folato, somente (9%) 4 de 45 não apresentaram fenda palatina. Este resultado não difere estatisticamente do grupo de fetos sem fenda palatina depois de administrado somente procarbazina. Todas as fendas palatinas observadas no grupo com prevenção eram bilaterais. Entretanto, a porcentagem de fenda palatina completa foi estatisticamente significativos menor (4%) no grupo 2 do que no grupo 1 (53%).

Os grupos de fetos que apresentaram fenda palatina parcial, somente a fenda palatina ocorreu no palato duro, visto que o palato mole estava sempre fechado. Como esperada, fenda parcial do palato foi encontrada em 87% no grupo de folato. Esta porcentagem de 30% foi estatisticamente significativa maior que os grupos sem complemento de folato.

O (A. F.), também conhecido como ácido pteroil-glutâmico e folacina, é a denominação genérica de um grupo de substâncias utilizadas com sucesso no tratamento de anemias macrocíticas, anemia megaloblástica infantil, gravídica, e mesmo da anemia perniciosa. O nome

(A. F.) deriva da palavra latina *folium* (folha) pelo fato de a referida substância ter sido isolada originalmente de folhas de espinafre. O (A. F.) é amplamente distribuído nos alimentos, nos quais ocorre principalmente como poliglutamatos e 5-metil-hidrofolato. Pequena parcela, entretanto, ocorre sob forma livre. Feijão, trigo integral, verduras, hortaliças, melão, banana, carne e vísceras, principalmente fígado e rins, constituem fontes de (A. F.) (SILVA, 2002).

Leite et al., em 2002, fizeram uma revisão da literatura sobre os fatores de risco para a ocorrência de fendas orofaciais, destacando a discussão sobre a exposição hormonal materna durante a gravidez. Os trabalhos apontam como fatores de riscos o tabagismo, ingestão de álcool, uso de anticonvulsivantes, e exposições de solventes orgânicos, e como fator de proteção, a administração do (A. F.). O risco associado à exposição hormonal, bem como a outros fatores, ainda é obscuro, embora alguns autores descrevam moderadas magnitudes de risco. Novos estudos, especificamente elaborados para testar esta hipótese, devem ser realizados à medida em que aumenta a população exposta a drogas de ação endócrina.

Gefrides et al. investigaram o potencial do (A. F.) como agente antiteratogênico em camundongos mutantes do tipo Splotch, os quais apresentam uma alta incidência de D.T.N. espontâneo. Os autores dividiram em 2 grupos distintos de camundongos: grupo a) as mães foram tratadas com (A. F.) via intramuscular diariamente entre os dias 6,5 e 10,5

de gravidez; grupo b) foi administrado arsênico nas mães somente em dose única no 8,5^{o} dia de gravidez e o grupo c) foi administrado (A. F.) juntamente com arsênico. As mães foram sacrificadas no 18^{o} dia de gravidez e os fetos foram removidos, pesados e examinados para avaliar a presença de D.T.N..

Os autores chegaram à conclusão que os embriões de camundongos mutantes do tipo Splotch não foram protegidos pela ação do (A. F.) dos D.T.N. pela incidência espontânea como também pela indução pela administração do arsênico.

Malek et al., em 2003, analisaram a freqüência em relação ao sexo, da ocorrência de fendas palatinas em fetos de ratos tratados na fase pré-natal com procarbazina via oral (200 mg/Kg) no 14^{o} dia de gestação (grupo 1). No grupo 2 foi adicionado suplemento de (A. F.) (4 mg/Kg) via subcutâneo entre o 14^{o} e o 17^{o} gestação. A dose de (A. F.) foi administrada 30 minutos antes que o procarbazina.

Os resultados obtidos dos fetos do grupo 1, mostraram que fendas palatinas estavam presentes em todos os fetos do sexo masculino, mas somente em 78,5% nos fetos do sexo feminino. Fendas completas foram encontradas em 69% dos machos e 36% dos fetos fêmeas, enquanto que fendas incompletas ocorreram em 31% dos fetos machos e 43% das fêmeas. No grupo 2 com suplementação de (A. F.), as fendas completas foram encontradas em somente 9% dos fetos machos e em nenhum feto fêmea. Entretanto, o número de fendas incompletas foram

significativamente aumentado para 82% para os machos e 91% para as fêmeas.

Portanto, os autores chegaram à conclusão que suplementação pré-natal de (A. F.), diminuiu o efeito teratogênico da procarbazina. Também concluíram que os fetos machos são mais suscetíveis à ação teratogênica da procarbazina.

Sabe-se que a concentração de zinco plasmático diminui de 20 a 30%, a partir do terceiro mês de gravidez, quando comparada a valores de mulheres não grávidas e que existe a deficiência alimentar de folato entre as mulheres grávidas. A incidência é oito vezes maior em gestações múltiplas, e parece ser aumentada em adolescentes grávidas. Da mesma forma que ocorre com o zinco, a concentração plasmática de (A. F.) cai durante a gravidez, devido à expansão do volume plasmático, e dessa maneira deve-se ser considerada como fisiológica. Portanto, **Nogueira et al.** (2003) avaliaram o estado nutricional do zinco e (A. F.) em 74 adolescentes grávidas, com idade entre 13 e 18 anos, na cidade de Teresina, Piauí, Brasil. Foram divididas em 5 grupos: Grupos I e II receberam quantidades iguais de (A. F.) (250 *m*g) e diferentes concentrações em ferro 120 e 80mg, respectivamente. Os grupos III e IV receberam quantidades iguais de (A. F.) (250 *u*g) associado ao sulfato de zinco (5mg) e ferro nas concentrações de 120 e 80 mg, respectivamente e o grupo V, apenas o ferro, 120 mg. Os resultados quanto ao zinco mostraram uma redução na sua concentração plasmática, sendo esse

declínio significativo nos grupos que não receberam o mineral. Quanto ao uso associado de ferro / (A. F.) e ferro / (A. F.) / zinco, verifica-se excelente resposta no estado nutricional referente ao (A. F.), sendo esse efeito mais expressivo nos grupos que receberam (A. F.) associado ao zinco, sugerindo a possível participação do zinco no aproveitamento da vitamina.

Os autores fazem considerações finais enfatizando que, o (A. F.) é um derivado da vitamina B, essencial para o desenvolvimento do feto. Não aconselham engravidar com o nível desta vitamina abaixo do normal. Pesquisas recentes indicaram que uma suplementação alimentar tomada no período pré-gestacional e até que se completem 12 semanas de gravidez diminui o risco de malformação do sistema nervoso da criança. É detectado um declínio constante da concentração sérica em (A. F.) ao longo da gestação. Essa queda pode ser prevenida pela administração de um suplemento de 100 mg/dia de (A. F.). Finalizam ainda comentando que as mulheres grávidas estão submetidas a vários fatores que concorrem à uma situação de alto risco de carência de (A. F.), uma delas é pela diminuição da ingestão, devido aos problemas digestivos do início da gestação, associados a uma maior excreção urinária. A freqüência da carência varia, segundo os estudos, de 25% a 70%, de acordo com o trimestre observado. A evolução ao longo da gestação mostra uma amplificação, um agravamento global do balanço fólico entre o 6^{o} e o 9^{0}

mês, mesmo para as pessoas que tinham um estado nutricional normal no 6^0 mês.

Com o objetivo de estudar a associação entre o uso de medicamentos durante os primeiros três meses da gravidez e fenda orofacial em recém nascidos, **Kallen,** em 2003, analisou registros de mulheres grávidas na Suécia entre as datas de 1 de julho de 1995 até 31 de dezembro de 2001. Foram analisados 1142 recém nascidos com fendas orofaciais, isoladas ou com outras malformações, excluindo crianças com anomalias cromossômicas.

O resultado encontrado foi de que não há associação de uso de nenhum medicamento com fendas de qualquer tipo. Foi encontrado uso de poli-vitaminas, (A. F.) e B_{12} e não foi associado ao decréscimo de risco de fendas.

Parece ser fortemente ligado à associação entre uso de corticóide e fendas em recém nascidos.

Grillo e Silva, em 2003, cita as anomalias congênitas do sistema nervoso central, os D.T.N. (DTN) e as hidrocefalias, mesmo que não associadas aos DTN, são as mais freqüentes. A prevalência destas duas condições é muito alta, e constituem causas importantes de morbimortalidade. As crianças com DTN podem apresentar paraplegia, bexiga neurogênica, infecções urinárias, insuficiência renal, hidrocefalia e cifoescoliose, apenas para citar as manifestações mais graves ou

freqüentes. As conseqüências das hidrocefalias congênitas não associadas aos DTN são variáveis, dependem diretamente da doença que as gerou e do momento de sua instalação no feto, mas não são menos importantes. Seus portadores têm uma qualidade de vida comprometida por múltiplas complicações e incapacidades, gerando evidentes repercussões a suas famílias e custos elevados para toda a sociedade.

Os autores concluem que as crianças afetadas por DTN, suas famílias e os profissionais envolvidos no seu atendimento são os que sentem a real magnitude deste problema. É responsabilidade destes profissionais e das sociedades que os representam divulgar junto à população a importância da suplementação de (A. F.) para mulheres em idade fértil, e recomendar às autoridades da saúde que se ampliem as medidas que, ainda que tardias, começam a ser implantadas. À luz dos conhecimentos atuais, os DTN devem ser encarados como uma "epidemia" passível de prevenção.

Uma investigação foi conduzida por **Malek et al.,** em 2004, para determinar se a suplementação prenatal de (A. F.) com doses menores de 4 mg/Kg foram capazes de reduzir a incidência de mal-formação de fenda palatina e se existe uma relação dose-efeito com a aplicação de doses de (A. F.). Foram usados ratos do tipo LEW 1K pesando entre 190-210gr, onde foram deixados convencionalmente em um regime de luz artificial 12h claro / 12h escuro, numa temperatura de 21+ 2^0C. A cópula

aconteceu entre 6 e 10 da noite. Quando a cópula foi confirmada pela detecção de espermatozóide no canal vaginal, este dia foi considerado dia 0 da gestação. Todos os fetos foram retirados no dia 19,5 de gestação.

G1) com 6 ratas que foram tratadas com 200mg/Kg procarbazina via gavagem; G2) e G3) receberam doses de 1mg/Kg e 2.5mg/Kg de (A. F.) respectivamente , do dia 13,5 até 16,5 de gestação.

Os resultados foram os seguintes:

Grupo 1) Ocorreu 25 casos (100%) com fenda palatina do sexo masculino e 19 casos (68%) do sexo feminino; Grupo 2) Ocorreu 15 (56%) com fenda palatina do sexo masculino e 11 (42%) do sexo feminino; Grupo 3) Ocorreu 12 (40%) com fenda palatina do sexo masculino e 9 (35%) do sexo feminino.

Os autores concluíram que o efeito protetor do (A. F.) não é somente dependente da dose, mas também depende do sexo. Enquanto que a administração de 1mg/Kg não foi capaz de reduzir o retardo de crescimento intra uterino, entretanto, esta dose, diminuiu a incidência de fenda palatina, mas somente no sexo masculino.

Weingartner et al., em 2004, estudaram a influência do (A. F.) e tiocianato nos distúrbios embrionários no desenvolvimento craniano induzidos pelo procarbazina em ratos.

Foram usado ratas prenhes, e foi aplicado procarbazina no 14º dia de gravidez. Foi dividido e 5 grupos: C (controle); P (procarbazina); TP (Tiocianato e Procarbazina); FP ((A. F.) e Procarbazina) e FTP ((A. F.), Tiocianato e Procarbazina).

Procarbazina foi administrado nas grávidas intraperitonealmente no 14º de gravidez com dose de 20 mg / 100g. Tiocianato foi administrado via subcutâneo com dosagem de 3.2 mg / 100g nos dias 10º e 13º de gravidez, e o (A. F.) foi aplicado subcutâneo nos dias 1º, 4º, 7º, 10º e 13º com dosagem de 0,016mg / 100g. Cada grupo contém 10 ratas prenhes. No 21º dia foi interrompida todas as prenhez, e retirados todos os fetos. Cada grupo contém 20 no grupo C, 20 no grupo P, 20 no TP, 19 no FP e 30 no FTP. Os resultados mostraram que as fendas foram induzidas em todos os grupos (FP, TP, FTP e P). O grupo FTP teve a menor tendência de formação de fendas e o grupo TP teve a maior.

Krapels et al., em 2004 estudaram a ingestão de macro-nutrientes (proteínas, carboidratos, fibras e colesterol), vitaminas (A, caroteno, ácido ascórbico), minerais (cálcio, fósforo, ferro, magnésio e zinco), durante a gestação de um grupo de mulheres, com a intenção de avaliar a capacidade de proteção destes nutrientes em relação à formação de fendas orofaciais. Foi comparado o grupo controle formado por 173 mulheres grávidas com filhos saudáveis, com outro grupo de mulheres que tinham filhos com fendas orofaciais. Os dados sugerem que o desequilíbrio entre ingestão de macro-nutrientes, vitaminas e minerais,

contribuem para patogênese de defeitos congênitos como também fendas orofaciais.

Dado ao exposto na revisão da literatura, procuraremos avaliar o potencial do (A. F.) na prevenção do aparecimento da fenda palatina teratogenicamente induzida pela dexametasona em ratos *Holtzman*.

3 *PROPOSIÇÃO*

Diante do exposto, pretende-se como:

Objetivo Geral:

1) Avaliar o potencial do ácido fólico em prevenir a formação de fenda palatina teratogenicamente induzida pela dexametasona em ratos *Holtzman*.

Objetivos Específicos:

1) Avaliar o potencial da dexametasona em induzir a formação de fenda palatina em ratos *Holtzman*. (Administração da droga entre os dias 14^{o} até 17^{o} de prenhez).

2) Avaliar o potencial do ácido fólico em prevenir a formação de fenda palatina teratogenicamente induzida pela dexametasona em ratos *Holtzman*. (Administração do ácido fólico diariamente desde 5 dias antes da concepção até o dia 19^{o} de prenhez).

3) Avaliar o potencial do ácido fólico em prevenir a formação de fenda palatina teratogenicamente induzida pela dexametasona em ratos *Holtzman*. (Administração do ácido fólico desde o dia zero de gravidez até o dia 19^{o} de prenhez).

4) Avaliar o potencial do ácido fólico em prevenir a formação de fenda palatina teratogenicamente induzida pela dexametasona em

ratos *Holtzman*. (Administração do ácido fólico entre os dias 14^{o} até 17^{o} de prenhez).

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 MATERIAL PERMANENTE

- Cabos pra bisturi;
- Pinças clínicas;
- Pinças pra dissecação;
- Tesouras cirúrgicas;
- Porta-agulhas;
- Caixa metálica tipo inox para guardar instrumental;
- Seringas descartáveis;
- Agulha de gavagem;
- Régua milimitrada;
- Lupa estereoscópica Zeiss modelo Citoval;
- Microscópio óptico Zeiss, modelo Jenaval;
- Balança analítica OWALABOR ((máx. 160g, mín. 0,5g) – (0,1g – 0,01g)).

4.2 DROGAS E REAGENTES

- Fosfato dissódico de dexametasona 2mg / mL, ampola de 1mL, solução injetável, (Demezon). Hipolabor Famacêutica Ltda;
- Solução de xarope de ácido fólico 5mg / mL, frasco 250 mL, ingestão oral; Cosmética Farmácia de Manipulação;
- Água deionizada;
- Formol de Lilly pH 7,4 tamponado;
- Solução descalcificadora de Morse (ácido fórmico, citrato de sódio);
- Sulfato de sódio;
- Álcoois graduados (absoluto – 70%);
- Xilol;
- Parafina;

- Cloridrato de Ketamina 10% (anestésico geral), frasco 10 mL, (Ketamina Agener). União Química Farmacêutica Nacional S/A;
- Cloridrato de tiazina (relaxante muscular), frasco 10 mL, (Rompun). Bayer S.A.

4.2.1 Preparação da Solução do Corticosteróide.

O acetato de dexametasona utilizado proveio do laboratório Pró – Diet Farmacêutico, pertencente ao mesmo lote, porque não houve alterações de biodisponibilidade e bioequivalência, antes mesmo da aplicação. Foi administrada via intramuscular, na região interna da pata traseira da fêmea uma dose de 3 mg/Kg, em quatro aplicações, com um intervalo de 24 horas entre elas, com agulhas de pequeno comprimento e calibre (Ultra-fine), cuidando-se para não realizar uma injeção intravenosa acidental. As aplicações foram feitas procurando-se alcançar uma fase intermediária da formação do palato secundário, com as cristas palatinas já definidas, ou seja, do 14^{o} dia ao 17^{o} dia de gestação (Figura 1).

FIGURA 1 - Dexametasona administrada via intramuscular.

4.2.2 Preparação da Solução de ácido fólico.

Fármaco testado.

A solução oral de (A. F.) foi administrado via oral por meio de gavagem na dose de 5mg/kg (Figura 2).

FIGURA 2 - Ácido Fólico FÓLICO administrado por Gavagem.

4.3 METODOLOGIA

4.3.1 Aprovação do protocolo de pesquisa

Este estudo foi iniciado após seu protocolo ser submetido à apreciação e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais (CEPA–CCBS-PUCPR), número de protocolo 022/04 (Anexo 1).

4.3.2 População

A população, objeto deste estudo, foi constituída de ratos do tipo *Holtzman* que foram obtidos no biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara – Unesp (Figura 3).

FIGURA 3 - Ratos do tipo *Holtzman*

4.3.4 Amostra

Foram empregados 17 (dezessete) ratos da linhagem (*Holtzman*) adultos com peso corporal médio de 250 gramas, sendo 4 (quatro) machos e 13 (treze) fêmeas.

As ratas prenhes foram divididas em 4 grupos experimentais:

4.3.3.1 G1 - Grupo dexametasona

Grupo formado por 3 ratas que receberam 3mg/Kg de dexametasona via intramuscular diariamente do 14^{o} ao 17^{o} dia de prenhez . Neste grupo formaram-se 27 fetos.

4.3.3.2 G2 – Grupo dexametasona + (A. F.)

Grupo formado por 4 ratas que receberam 3mg/Kg de dexametasona via intramuscular, associado a uma dose de 5 mg/Kg de (A. F.) (via oral) ambos administrados diariamente do 14^{o} ao 17^{o} dia de prenhez. Originaram-se 24 fetos.

4.3.3.3 G3 - Grupo dexametasona + (A. F.) (dia zero de prenhez)

Grupo formado por 3 ratas que receberam uma dose diária de 5mg/Kg de (A. F.) (via oral) diariamente começando desde o dia 0 (zero) de prenhez até o final da gravidez, com 3mg/Kg de dexametasona via intramuscular diariamente do dia 14^{o} ao 17^{o} dia de gravidez. Originaram-se 17 fetos.

4.3.3.4 G4 – Grupo dexametasona + (A. F.) (5 dias antes da concepção)

Grupo formado por 3 ratas que receberam uma dose diária de 5mg/Kg de (A. F.) (via oral) começando 5 dias antes da concepção até o final da prenhez, com 3mg/Kg de dexametasona via intramuscular do dia 14^{o} ao 17^{o} dia de prenhez. Originaram-se 31 fetos.

4.3.4 Método de Concepção

Foi utilizado o método experimental e todos os procedimentos realizados durante esta pesquisa obedeceram às recomendações éticas e legais especificadas para a experimentação animal.

Os animais passaram por período de 55 (cinqüenta e cinco) dias de aclimatação e amadurecimento a fim de ultrapassar o período da puberdade e atingir-se a idade em que já estão prontos para o acasalamento.

Os animais foram mantidos em gaiolas específicas para a criação de ratos, na proporção de três animais para cada gaiola, evitando-se altas densidades. A gaiola foi constituída por caixa de polipropileno semi-fosco, com dimensões de 42x34x16cm, tampa gradeada de aço inoxidável, adequada às dimensões da caixa e com locais específicos para colocação do alimento e do dispensador de água. Foram utilizados dispensadores de vidro, com capacidade para 500ml e com bico de aço inoxidável, colocados nas gaiolas de modo a garantir suprimento constante de água. Durante todo o experimento, as gaiolas permaneceram forradas com raspas de madeira (maravalha), que promoveu superfície higiênica preenchendo os requisitos físicos e químicos essenciais para a saúde e o bem estar dos animais. Durante todo o período experimental, os animais foram mantidos em boas condições de alimentação, com ração e água *ad libitum,* temperatura controlada, iluminação e higiene adequadas.

Com o objetivo de evitar o acúmulo de gases tóxicos (amônia e sulfito de hidrogênio), resultantes da degradação oxidativa e bacteriana dos excrementos, o que comprometeria a saúde dos animais e os objetos do experimento, a cada 4 dias todas as gaiolas foram limpas pelos tratadores, sendo removida a maravalha antiga e os restos de ração e de água, sendo novamente colocadas novas porções de cada constituinte.

O ambiente em que foram mantidos os animais apresentou uma temperatura constante de $23 \pm 1^{0}C$. Também foi controlado um fotoperíodo

de 12 horas claro e 12 horas escuro (LD 12:12), a fim de se garantir um ciclo correto no metabolismo dos animais.

Os machos foram colocados em gaiolas suplementares, de maneira que cada uma foi ocupada por animal. Um dia depois, os machos foram retirados e as fêmeas foram distribuídas nestas mesmas gaiolas, sem limpá-las, com o intuito de se obter o efeito Whitten (1956), proveniente da ação dos fero hormônios excretados pelos roedores. No dia seguinte, os machos foram colocados em convívio com as fêmeas, às 18:00 h na proporção de um macho para três fêmeas para o acasalamento, permanecendo juntos até as 8:00 h do dia seguinte quando, então, os machos foram removidos e doados para a participação em outros experimentos.

Para a confirmação de que houve realmente a cópula, o material colhido no canal vaginal da fêmea foi colocado em lâminas de vidro e realizado um esfregaço para se verificar, ao microscópio óptico, a presença de espermatozóides (Figura 4). As fêmeas que apresentaram presença de espermatozóide no seu canal vaginal foram consideradas grávidas e este dia foi determinado dia (zero) 0 de prenhez.

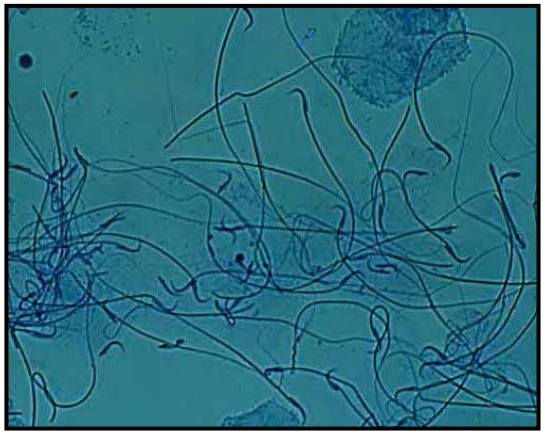

FIGURA 4 - Presença de espermatozóide.

4.3.4 Obtenção dos espécimes para observação

Em todos os grupos, o sacrifício dos animais foi realizado no 19º dia de gestação, uma vez que o período gestacional é de 22 a 23 dias e as mães, freqüentemente, comem os animais que se apresentem malformados. Isto comprometeria os resultados obtidos se fosse observada, também, a gestação a termo (Beaudoin, 1980). Os animais foram sacrificados com dose excessiva de anestésico. Após o sacrifício foi realizada a laparotomia em cada uma das gestantes, para a coleta dos fetos (Figura 5).

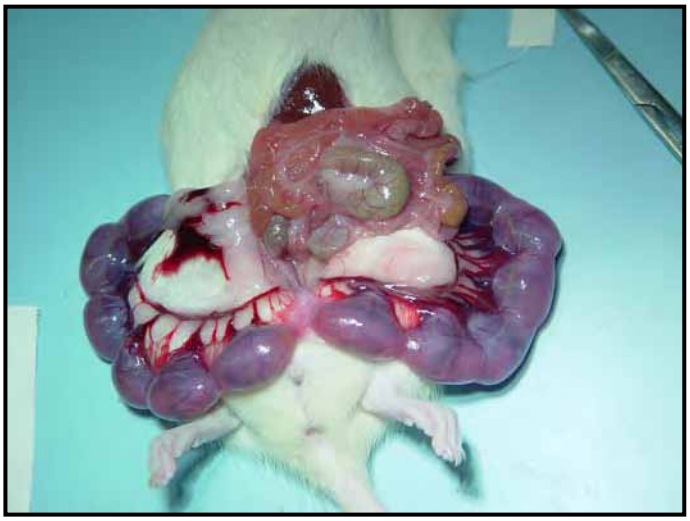

FIGURA 5 - Laparotomia das gestantes

Após a realização da laparotomia, toda a porção da bolsa amniótica e a placenta foram dissecadas e os fetos foram pesados em balança analítica de precisão.

Cada feto teve a extremidade cefálica separada do restante do organismo, visto que a observação somente foi realizada na área do palato. As porções cefálicas, oriundas do conjunto de fetos de cada fêmea, foram colocados em recipientes separados e identificados, de acordo com a gestante de origem (Figura 6).

FIGURA 6 - Extremidade cefálica separada do resto do corpo.

As mandíbulas foram removidas e desprezadas com técnica cirúrgica adequada e as maxilas aproveitadas. Em seguida obtiveram-se fotografias das maxilas (palatos) com o auxílio de uma lupa estereoscópica Zeiss (Citoval) com aumento aproximado de 40 vezes (Figuras 7 e 8).

FIGURA 7 - Palato sem fenda palatina

FIGURA 8 - Palato com fenda palatina

Imediatamente após a obtenção das fotografias sob a lupa, todo o material foi fixado em formol de Lilly tamponado durante 96 horas, em seguida descalcificado em solução de Morse durante 12 dias com troca da solução a cada 3 dias; as peças permaneceram em cassetes a fim de impedir o seu contato com a superfície do frasco, facilitando assim a descalcificação. Após a descalcificação o material foi neutralizado em sulfato de sódio a 5% por 24 horas, lavado em água corrente por 10 minutos e desidratado numa seqüência de álcoois crescentes (70%, 80%, 90% e absoluto), diafanizado em xilol e finalmente embebidos e incluídos em parafina pela metodologia de rotina. Foi utilizado nessas etapas o aparelho Histolab ZX-110 para o processamento laboratorial e para inclusão, o Centro de Inclusão Modular.

O material assim processado foi cortado em micrótomo com cortes semi seriados de 6μm de espessura, utilizando lâminas de aço descartáveis.

Os cortes foram corados pela coloração de Hematoxilina e Eosina (HE), e a análise morfológica foi realizada de todos os espécimes.

4.3.6 Avaliação dos Resultados Obtidos.

Os animais foram avaliados sob lupa estereoscópica Zeiss modelo citoval e estudados através da microscopia óptica.

As lâminas contendo os fragmentos teciduais foram analisadas e fotografadas em fotomicroscópio óptico comum.

4.3.7 Análise Estatística

Para comparar se existia diferença entre os valores médios da variável peso do feto, comprimento total do feto e comprimento da cabeça do feto segundo os grupos (I), (II), (III) e (IV), testou-se inicialmente os pressupostos de normalidade dos dados (Teste de Normalidade de Kolmogorov-Smirnov) e homogeneidade de variâncias entre os grupos (Teste de Levene).

Uma vez que a maioria dos grupos não apresentou normalidade para as três variáveis analisadas (p<0,05), não apresentando ainda homogeneidade de variâncias entre os grupos para as 3 variáveis (p<0,05) utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para avaliar se existia diferença entre os grupos (p<0,05).

Quando o teste indicou existir diferença, aplicou-se em seguida o Teste de Comparações Múltiplas não paramétricas de Kruskal-Wallis (p<0,05) visando identificar quais grupos diferiam entre si para as 3 variáveis.

Para a variável ordinal fenda, utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (p<0,05) seguido do teste de comparações múltiplas não paramétricas de Kruskal-Wallis (p<0,05).

5 RESULTADO

Como foi relatado no capítulo de Material e Método no item (Obtenção dos espécimes para observação), em todos os grupos, o sacrifício dos animais foi feito no 19^{o} dia de gestação. Após o sacrifício foi feita a laparotomia em cada uma das gestantes, para a coleta dos fetos na quantidade especificada abaixo:

GRUPO I	3 fêmeas	17 fetos	1- 07 fetos
			2- 01 feto
			3- 09 fetos
GRUPO II	4 fêmeas	24 fetos	1- 08 fetos
			2- 01 feto
			3- 10 fetos
			4- 05 fetos
GRUPO III	3 fêmeas	17 fetos	1- 04 fetos
			2- 01 feto
			3- 12 fetos
GRUPO IV	3 fêmeas	31 fetos	1- 06 fetos
			2- 12 fetos
			3- 13 fetos
			TOTAL DE 99 FETOS

5.1 RESULTADOS CLÍNICOS (MACROSCOPIA)

Todos os animais foram avaliados sob lupa estereoscópica Zeiss modelo citoval e estudados através da microscopia óptica.

Os animais cujas mães sofreram aplicação da (dexa) (GRUPO I), apresentaram defeitos de formação nas patas dianteiras e traseiras, as quais não foram enfatizadas neste trabalho (Figura 9).

FIGURA 9 - Grupo I - Fetos em vista de perfil do, com 19 dias de idade. alterações anatômicas ocorridas na face e nas patas dianteiras e traseiras.

5.1.1 Peso Total, Comprimento Total e Comprimento da Cabeça do Feto

Com relação às variáveis peso do feto, comprimento total do feto e comprimento da cabeça do feto, o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis indicou existir diferença entre os valores médios segundo grupos para as 3 variáveis (p<0,05).

O teste de comparações múltiplas não paramétricas de Kruskal-Wallis mostrou que o peso médio do grupo IV foi estatisticamente inferior aos grupos II e III e não diferem do grupo I. Os demais grupos não

diferem entre si. O Gráfico 1 a seguir apresenta o comportamento da variável peso médio segundo grupos.

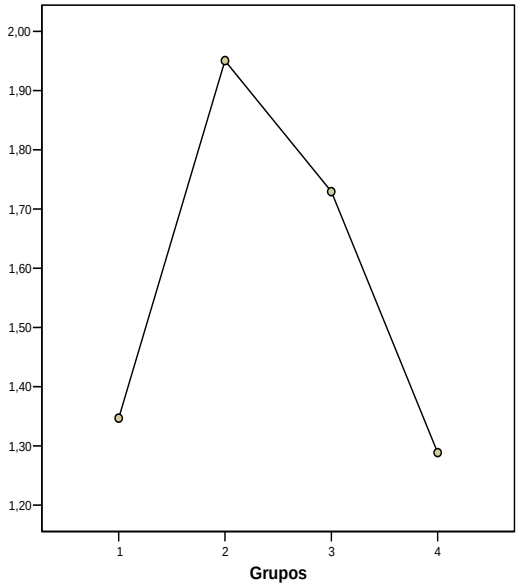

GRÁFICO 1 - Peso médio em gramas dos fetos segundos grupos.

Para o comprimento total do feto observou-se que o grupo II apresentou valor médio superior à todos os demais, não existindo diferença entre os demais (IV – III, IV – I). O Gráfico 2 a seguir apresenta o comportamento da variável comprimento total médio segundos grupos.

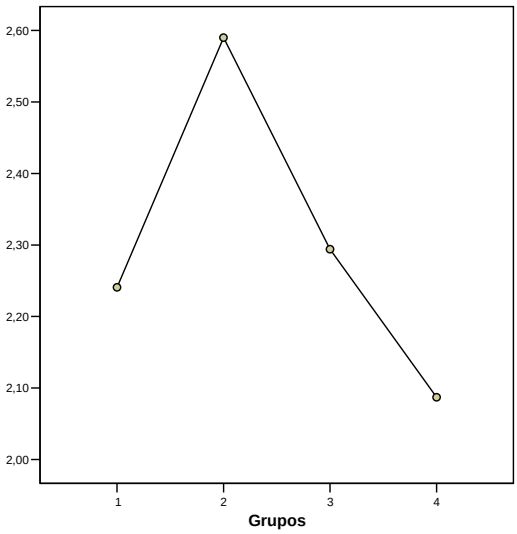

GRÁFICO 2 - Comprimento total médio dos fetos segundos grupos

Com relação ao comprimento da cabeça do feto, observou-se que o grupo I apresentou valor médio inferior aos grupos II e III não diferindo do grupo IV, sendo que os demais não diferiram entre si. O Gráfico 3 a seguir apresenta o comportamento da variável comprimento médio da cabeça segundo grupos.

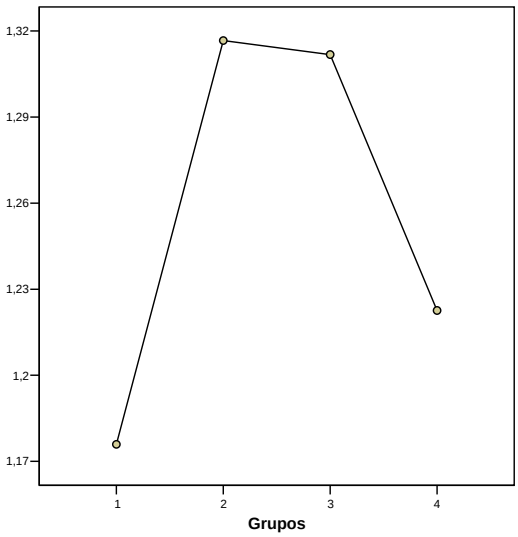

GRÁFICO 3 – Comprimento médio da cabeça do feto segundo grupos

5.1.2 Ação Preventiva do ácido fólico na Formação de Fendas Palatinas Completa e Incompleta.

A aplicação do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis mostrou existir diferença estatística significante entre os escores médios da variável *fenda* segundo *grupos* (p<0,05).

Grupo I. O teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis mostrou que o escore médio deste grupo é maior e estatisticamente diferente dos demais grupos (p<0,05), sendo que os grupos II, III e IV não diferem entre si.

Com base na amostra analisada observou-se que 96,30%, ou seja, 26 dos 27 fetos analisados apresentaram fenda completa, e somente 1 feto (4,70%) apresentou fenda incompleta.

Grupo II. Neste grupo 8,33% (2 em 24) apresentaram fenda completa. Já 10 animais (41,67%) apresentaram ausência da fenda e 12 animais, ou seja, 50% de fenda incompleta.

Grupo III. Observou-se que 88,24% (15 em 17) apresentaram fenda incompleta. E apenas (1 animal em 17) 5,88% apresentaram fenda completa e (1 animal em 17) 5,88% ausência de fenda.

Grupo IV. Dos 31 animais, 17 (54,4%) apresentaram fenda incompleta e 32,26% (10 em 31) apresentaram fenda completa. Somente 4 animais (12,9%) apresentaram ausência de fenda.

O Gráfico 4 a seguir apresenta o comportamento da variável fenda segundo os grupos.

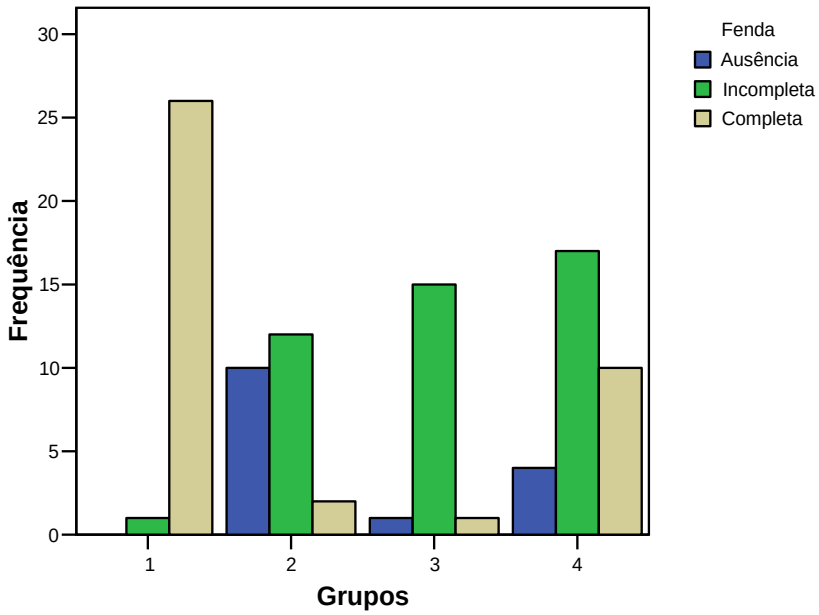

GRÁFICO 4 - Comportamento da variável Fenda segundo os Grupos.

5.1.3 Presença de Fenda Palatina Completa e Incompleta encontradas em todos os grupos estudados

Alguns animais dos grupos II, III e IV, cuja ação do (A. F.) foi efetiva, houve fechamento completo do palato primário e secundário, com a fusão dos processos nasais medianos, permitindo a formação do palato primário. Os processos palatinos laterais que inicialmente cresciam para baixo, após a movimentação da língua no sentido caudal, tornaram-se horizontalizados como duas prateleiras ou cristas e cresceram no sentido horizontal em sentido de um para o outro e se fundiram na linha média atrás do forame incisivo do palato primário e, finalmente formaram o palato secundário (Figuras 10 A e B).

Os fetos que apresentaram fendas palatinas completas, tinham o palato primário fusionado, entretanto as projeções palatinas, que são responsáveis pela formação do palato secundário, estavam horizontais, curtas e bastante afastadas uma das outras ao longo de todo o palato (Figuras 10 C e D).

Já os fetos que apresentaram fendas palatinas incompletas, também tinham o palato primário fusionado, mas as projeções palatinas não estavam fusionadas somente nas regiões anteriores e posteriores do palato. Assim as projeções palatinas fusionaram-se na região média do palato (Figuras 10 E e F).

5.2 RESULTADOS HISTOLÓGICOS

5.2.1 Grupo I ((dexa) diário entre os dias 14º e 17º de idade).

A dexametasona aplicada diariamente entre o 14º e 17º dia de prenhez, promoveu acentuado atraso na diferenciação das células mesenquimais e redução na formação e no desenvolvimento ósseo dos maxilares à uma fina rede junto aos processos fronto-nasais laterais direito e esquerdo (Figura 11). A vascularização é escassa, não apresentando diferenciação nos nichos epiteliais glandulares, e reduzindo a invasão dos músculos mímicos provenientes do 2º arco branquial a finos cordões de células com desenvolvimento incompleto (Figura 12).

FIGURA 11 - Fina e reduzida formação óssea com aspecto de rede ± 150X.

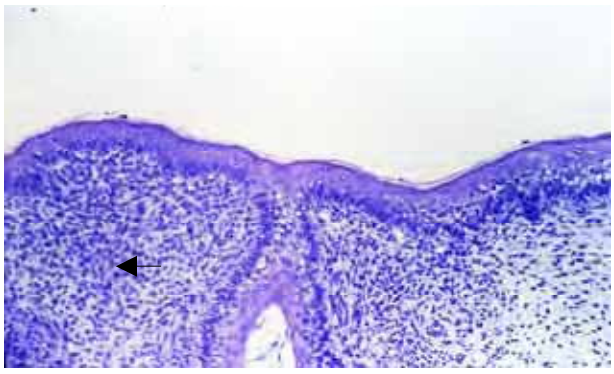

FIGURA 12 - Ausência de formação glandular e muscular ± 300X.

Na região facial anterior, ocorreu a formação de fenda labial bilateral com a união entre os epitélios do processo fronto-nasal medial e projeções maxilares do 1º arco branquial (Figura 13). Tal epitélio encontra-se íntegro com várias camadas, revestido por queratina não havendo sinais de mesodermização (Figura 14).

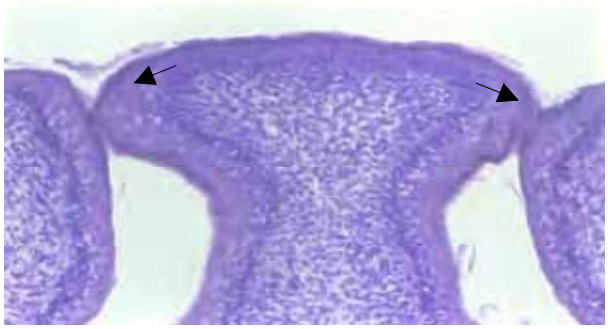

FIGURA 13 - Fenda labial bilateral com união entre os epitélios ± 300X.

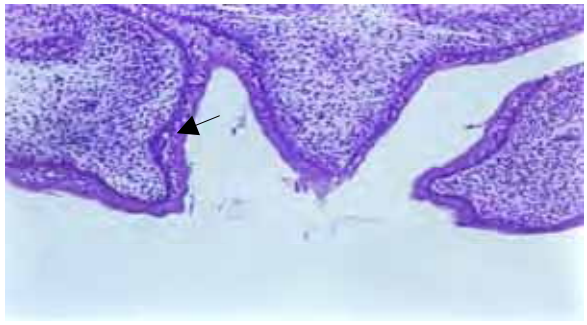

FIGURA 14 - Epitélio íntegro e ausência de mesodermização ± 150X.

Já na região medial do palato, houve o fechamento precoce das cristas palatinas, com os epitélios do septo nasal em contato com os epitélios das cristas palatinas. Não se observaram processos de "mesodermização" (Figura 15).

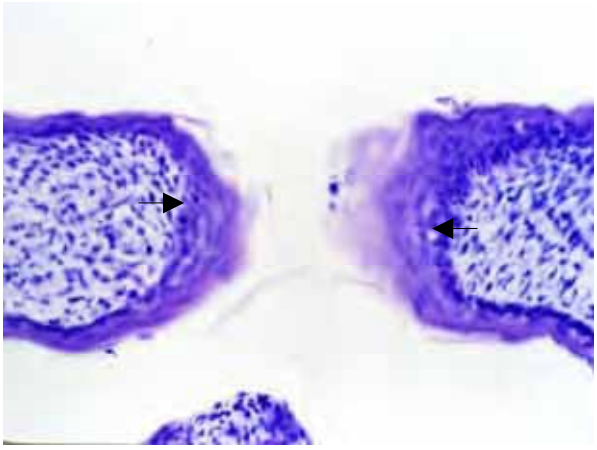

FIGURA 15 - Processo de fechamento das cristas palatinas ± 375X.

Em todos os animais que apresentavam fenda, ou seja 96,30% dos fetos, as cristas palatinas eram volumosas, projetadas em posição horizontal muito distante entre si, recobertas por placas de queratina, com várias camadas epiteliais não mostrando evidências de degeneração (Figura 16). O tecido mesenquimal adjacente apresentou ligeira condensação celular junto ao epitélio, e numa posição mais afastada as células mesenquimais encontraram-se bem esparsas e separadas umas das outras por muita substância amorfa (Figura 17).

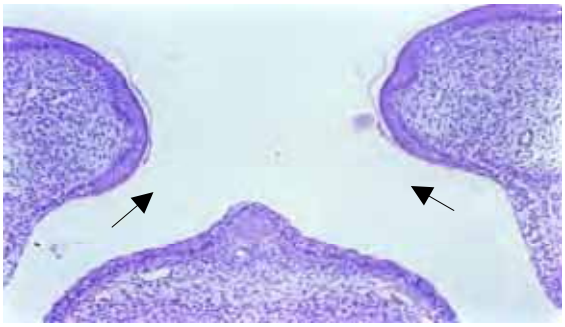

FIGURA 16 - Cristas em posição horizontal muito distantes uma da outra ± 125X.

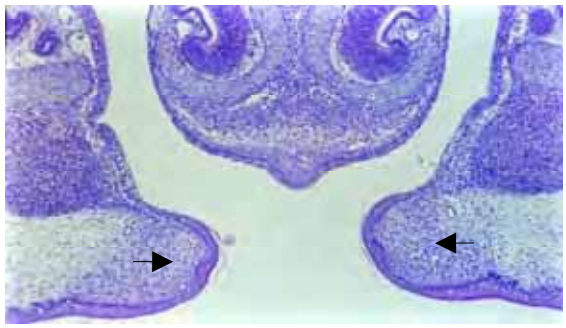

FIGURA 17 - Condensação das células junto ao epitélio ± 150 X.

Em alguns fetos, apareceram projeções palatinas verticais e localizadas a cada lado da língua. Acompanhado da presença de restos celulares epiteliais formando nichos em meio às células mesenquimais.

Entretanto, na maioria dos fetos, as projeções palatinas apareceram horizontais e afastadas umas das outras, localizadas acima da língua, havendo comunicação entre a cavidade oral e nasal (Figura 18). Notou-se uma formação vascular reduzida. Da mesma forma, a invasão celular proveniente do 2^0 arco branquial a fim de formar os músculos mímicos era insignificante. O mesmo ocorreu com a formação glandular, com grande atraso de diferenciação (Figura 19).

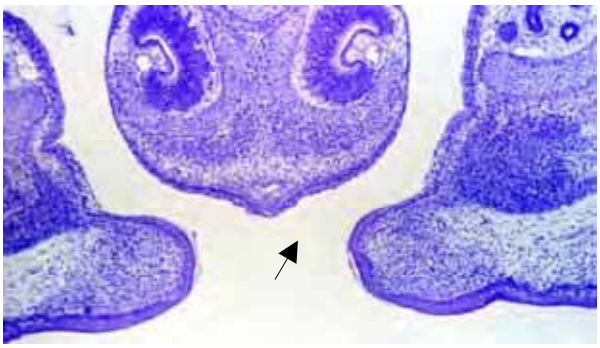

FIGURA 18 - Comunicação entre as cavidades oral e nasal ± 150X.

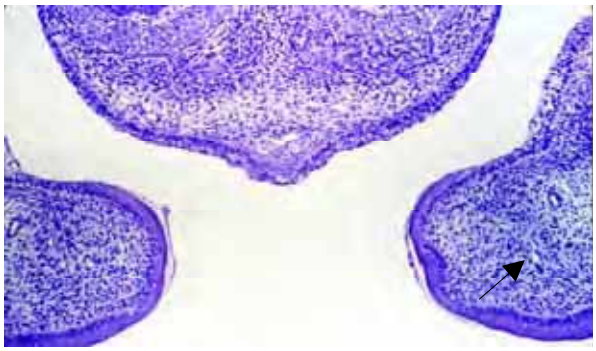

FIGURA 19 - Vascularização Reduzida ± 125X.

5.2.2 Grupo II ((dexa) + Ácido Fólico diário entre 14º – 17º dia)

O ácido fólico administrado conjuntamente à dexametasona durante 4 dias de prenhes no período compreendido entre o 14º e o 17º dia de gestação, conseguiu aumentar a incidência de fetos com ausência de fenda palatina para 41,67% atuando sobre a formação da abertura nasal anterior, promovendo a permanência do sulco naso-labial, com fusão das cristas palatinas. Estas, no entanto não continham formação óssea no interior do mesênquima (Figuras 20 e 21).

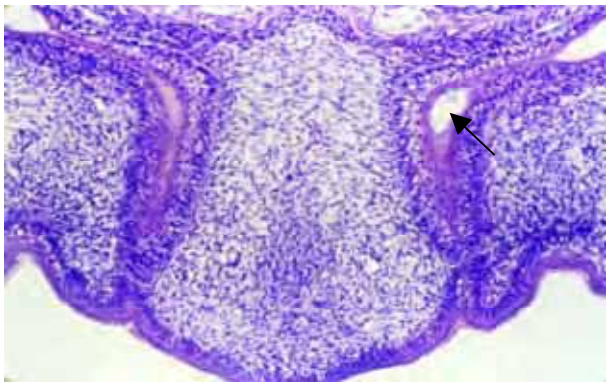

FIGURA 20 - Sulco nasolabial bilateral ± 350X.

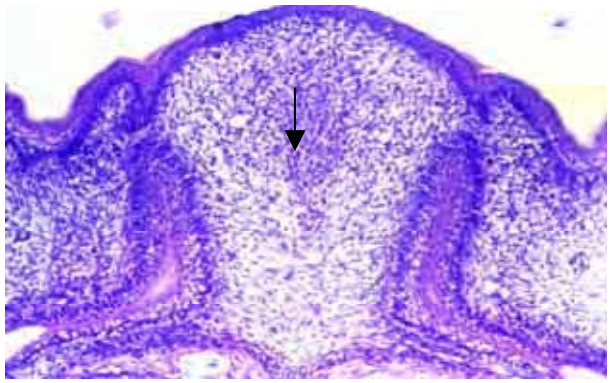

FIGURA 21 - Ausência de formação óssea ± 350X.

Nestes fetos em que houve fechamento do palato, alguns casos deste grupo apresentaram restos epiteliais formando pequenos nichos no interior do mesênquima (Figura 22).

FIGURA 22 - Palato fechado com restos epiteliais no mesênquima ± 125X.

Nos fetos que apresentaram clinicamente fendas incompletas, ou seja 50% do grupo, ocorreu uma falta de fusão na porção medial do palato (Figura 23). Neste mesmo grupo houve fechamento incompleto do palato secundário com a permanência da pequena fenda na região anterior (Figura 24).

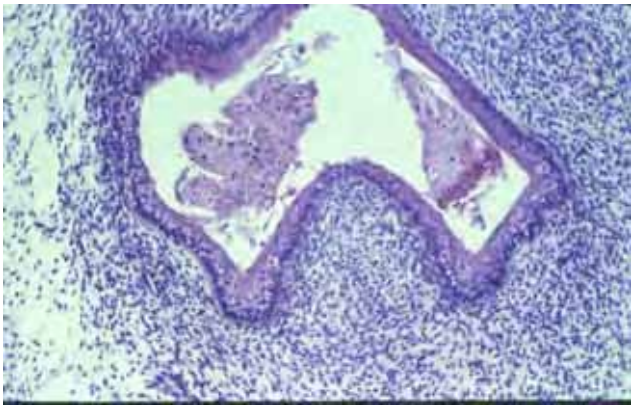

FIGURA 23 - Falta de fusão na porção medial, *corte horizontal* ± 150X.

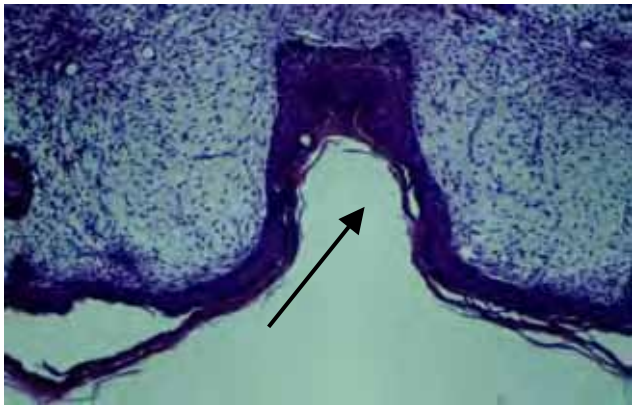

FIGURA 24. Fenda na região anterior do palato ± 150X.

Os fetos que nasceram com fenda completa (8,33%), apresentaram fenda labial bilateral e ausência de tecido ósseo em

formação no interior do mesênquima, cujas células apresentaram ligeira condensação junto ao epitélio, sem, no entanto promover qualquer sinal de fagocitose. Notou-se que havia poucos capilares sanguíneos na região. Da mesma forma, o epitélio apresentou várias camadas ou estratos e encontrava-se recoberto por finas placas de queratina (Figuras 25 e 26).

FIGURA 25 - Fenda labial bilateral com epitélio recoberto por queratina ± 125X.

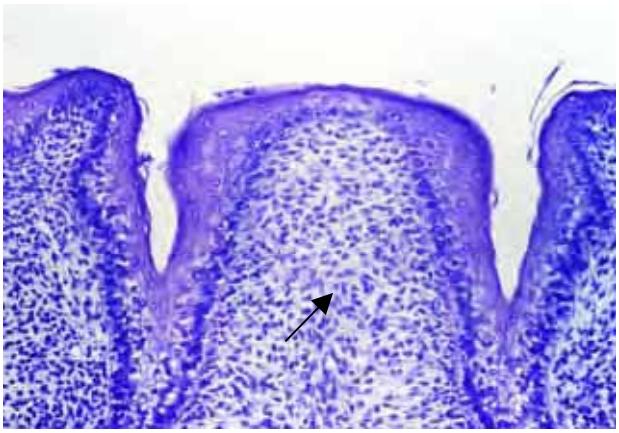

FIGURA 26. Poucos capilares e ausência de formação óssea ± 300X.

Todos os animais que apresentaram clinicamente fenda completa, histologicamente apareceram fenda labial bilateral (Figura 27).

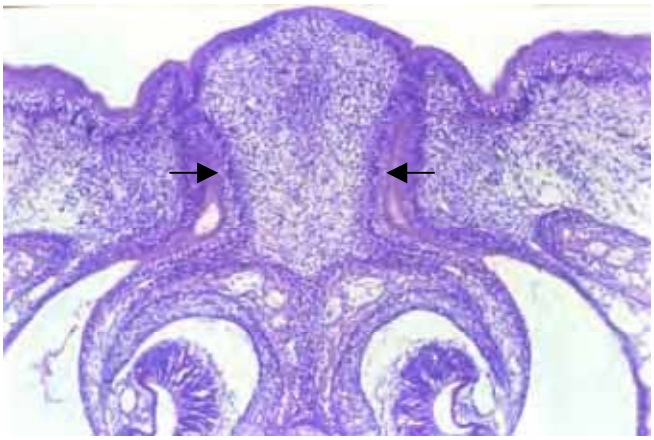

FIGURA 27 - Fenda labial bilateral ± 150X.

5.2.3 Grupo III ((dexa) diário entre os dias 14^0 e 17^0) + (Ácido Fólico a partir do dia zero de prenhez)

De maneira oposta, o (A. F.) neste grupo utilizado durante toda a prenhes, não foi capaz de proteger efetivamente o embrião da ação da Dexametazona administrada no período compreendido entre o 14^o dia e o 17^0 dia, pois somente 1(5,88%) feto apresentou ausência de fenda. Nestes animais, é evidente a falta de fusão das cristas palatinas, não havendo migração no sentido horizontal, elas permanecem obliquas o sentido vertical (Figura 28).

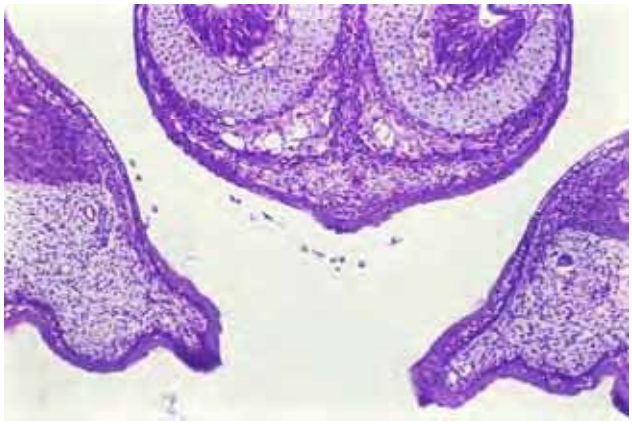

FIGURA 28 - Cristas palatinas posicionadas obliquamente. ± 125X

O epitélio não apresenta queratina na superfície e tampouco a camada granulosa epitelial. Observa-se que há alterações morfológicas nas células epiteliais sem, no entanto, ocorrer o processo de mesodermização sob a responsabilidade das células fagocitárias residentes no tecido conjuntivo (Figura 29).

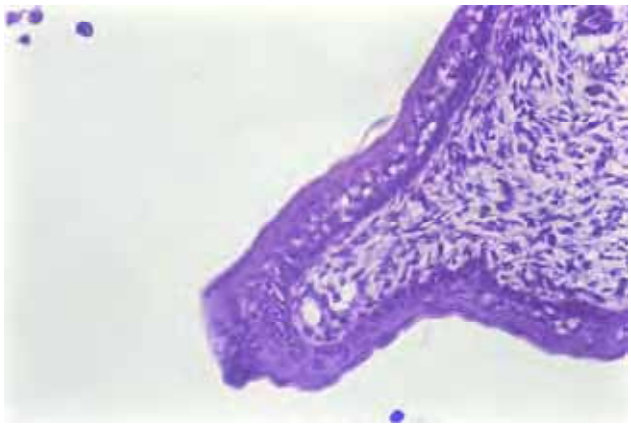

FIGURA 29. Epitélio íntegro, sem queratina e não há sinais de MESODERMIZAÇÃO ± 300X.

O mesênquima que preenche as cristas palatinas não apresenta formação óssea eminente. As células permanecem indiferenciadas afastadas umas das outras e não se observa a formação de vasos sanguíneos (Figura 30).

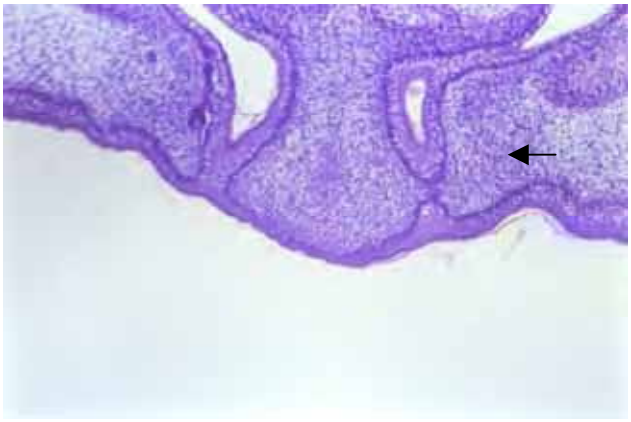

FIGURA 30 - Células mesenquimais e não há sinais de início de diferenciação. ± 150X

Na maioria das vezes, na região anterior, a crista palatina encontra-se totalmente verticalizada e muito distante do seu homólogo.

Em outros fetos, na região anterior, a fenda é bilateral (lábio leporino) uma vez que as células epiteliais de revestimento dos blocos

formadores (cristas palatinas e septo nasal) encontram-se presentes sem sofrerem o processo de “mesodermização” (Figura 31).

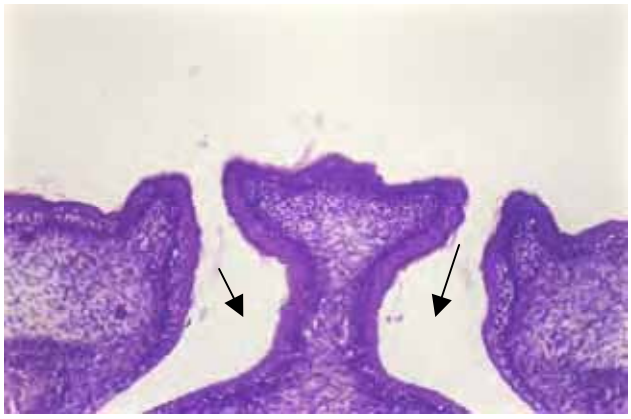

FIGURA 31 - Fenda labial bilateral – lábio leporino ± 150X

Na linha média não há sinais de formação óssea, as células estão condensadas e nas porções para-laterais a formação óssea é eminente com a presença de células osteoprogenitoras, totalmente embrionárias e indiferenciadas, acompanhadas numa porção mais distante de matriz osteóide delicada e estreita formando uma rede de malha esparsa (Figuras 32 e 33).

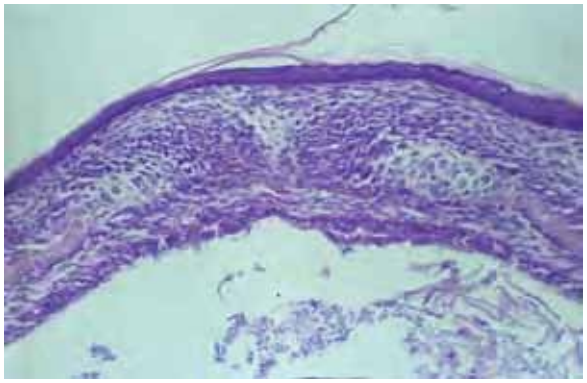

FIGURA 32 - Mesodermização e ausência de formação óssea ± 125X.

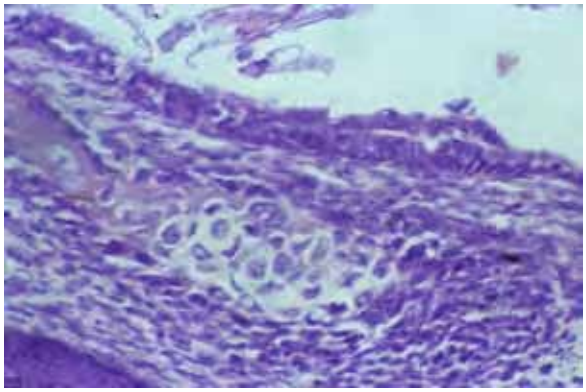

FIGURA 33 - Início de formação óssea ± 400X.

A (dexa) agiu sobre a formação da abertura nasal anterior, promovendo a manutenção do sulco nasolacrimal local, sem no entanto promover a mesodermização, permanecendo desta forma a falta de fusão labial (Figura 34).

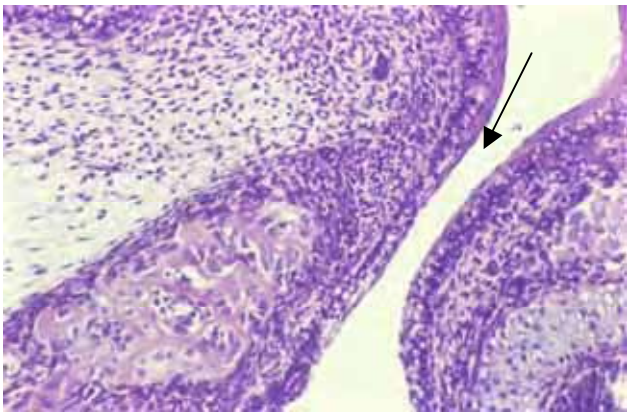

FIGURA 34 - Abertura nasal anterior e manutenção do sulco naso-lacrimal local**.** ± 300X

As cristas palatinas estão na posição horizontal, o processo fronto-nasal está interposto (Figura 35) entre elas e o caminho a ser seguido para o completo fechamento é longo e da mesma forma não há sinais de formação óssea necessária para o desenvolvimento do palato duro (Figura 36).

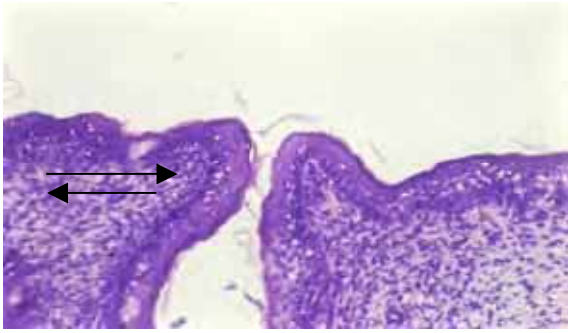

FIGURA 35 - Processo fronto-nasal interposto entre as cristas ± 300X.

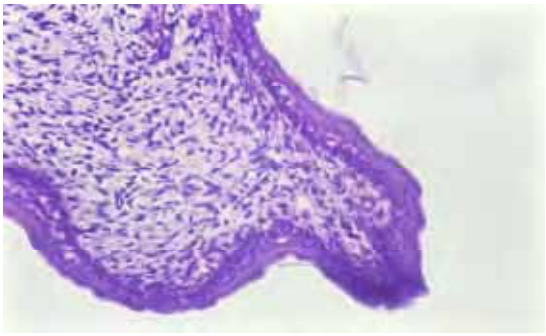

FIGURA 36 - Cristas palatinas encurtadas com ausência de formação óssea ± 300X.

5.2.4. Grupo IV ((dexa) diário entre os dias 14^0 e 17^0) + (Ácido Fólico a partir de 5 dias antes da prenhes)

A ação do (A. F.) como agente protetor administrado anteriormente à prenhes permitiu a migração das cristas palatinas inicialmente oblíquas para baixo, a cada lado da língua, se posicionaram no plano horizontal superior à língua, porém a ação do mesmo não foi totalmente eficiente, uma vez que não houve a migração em direção à linha mediana (Figura 37).

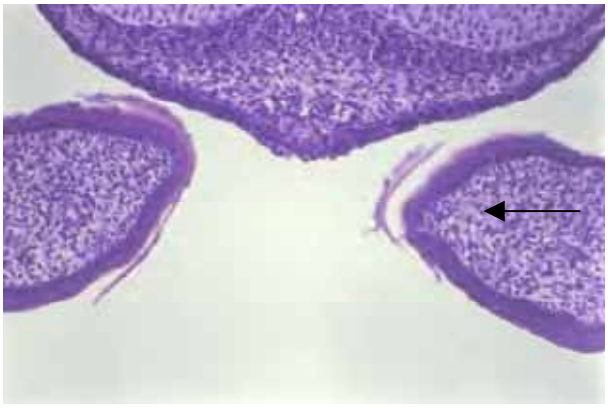

FIGURA 37 - Falta de migração das cristas palatinas em direção medial ± 150X.

Observa-se numa visão geral, as cristas palatinas bem afastadas e leve interposição do processo fronto-nasal-medial na porção central (Figura 38). O tecido epitelial de revestimento das cristas é contínuo e construído por cerca de 4 estratos ou camadas (Figura 39). O tecido ósseo dos maxilares com formação pouco exuberante representado por delicada rede de matriz orgânica rica em osteócitos (Figura 40).

FIGURA 38 - Processo fronto-nasal entre as cristas palatinas ± 150X.

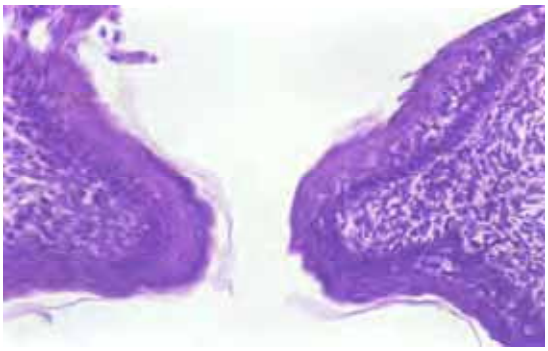

FIGURA 39 - Tecido epitelial estratificado ± 375X.

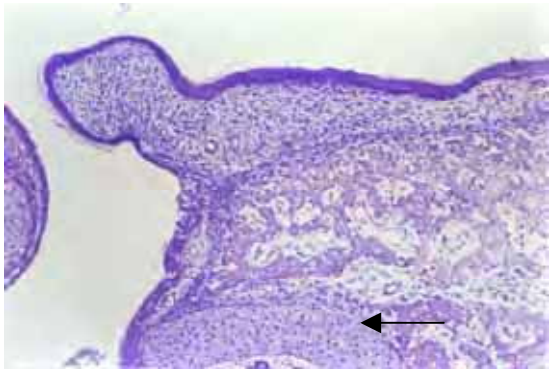

FIGURA 40 - Delicada malha óssea no mesenquima da crista palatina ± 300X.

Este trabeculado ósseo apresenta tamanho e espessura variáveis quando se observa o lado direito e o lado esquerdo do animal.

O epitélio de revestimento das cristas palatinas encontra-se recoberto por finas placas de queratina seguido de espessa camada de células superficiais em cujo citoplasma há muitos grânulos de querato-hialina.

O tecido conjuntivo embrionário subjacente está repleto de células mesenquimais, não se observa formação de tecido ósseo. Na superfície da projeção palatina a concentração celular é grande e à medida que se

distancia da linha mediana há uma acentuada rarefação celular. Junto à linha mediana todas as células mesenquimais são morfologicamente semelhantes e se observa que há pouca formação vascular.

Na região superficial da pele, os processos fronto-nasais laterais apresentam epitélio espesso e não há evidências de formação da abertura nasal (Figura 41).

FIGURA 41 - Ausência de formação da abertura nasal anterior ± 375X.

Na porção anterior, o processo fronto-nasal medial apresenta formação óssea acentuada contornando a cartilagem septal (Figura 42).

FIGURA 42 - Tecido ósseo contornando o septo nasal ± 125X.

Num plano de corte mais profundo, forma-se a cavidade nasal rodeada por cartilagem hialina e pelo osso maxilar da porção média, revestido por tecido conjuntivo embrionário e epitélio. Este processo fronto-nasal medial encontra-se separado das cristas palatinas laterais (Figuras 43 e 44).

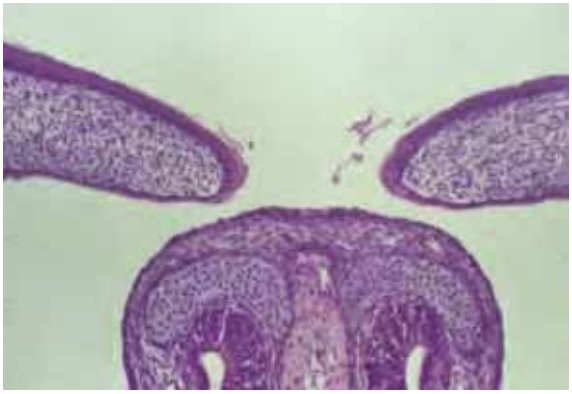

FIGURA 43 - Processo fronto-nasal separado das cristas palatinas ± 125X.

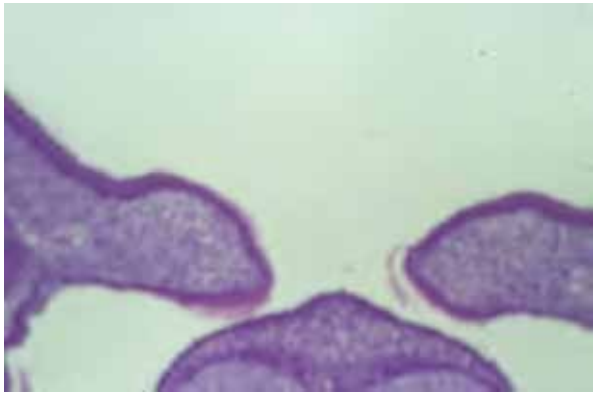

FIGURA 44 - Cristas palatinas separadas e horizontalizadas ± 150X.

6 DISCUSSÃO

O desenvolvimento normal do palato é objeto de estudo em numerosas espécies, como camundongos (TAYLOR, 1978), ratos (ZEILER et al; 1964; HUGHES et al., 1967; DEANGELIS e NALBADIAN, 1968; BORDEN, 1969; PRATT e KING 1971; DIEWERT, 1978; BITTENCOURT e BOLOGNESE, 2000), cachorros (SMILEY, 1972), coelhos (WALKER, 1971a), macacos (ASLING e WAGENEN, 1967) e humanos (GOSS, 1975; MELSEN, 1975; KJAER, 1992; SAXÉN, 1974; TONDURY, 1958).

O rato é o animal de laboratório comumente empregado como modelo experimental para o estudo da biologia e patologia dos tecidos bucais em cerca de 20% dos experimentos com propósitos científicos, possuindo características anatômicas e fisiológicas que o tornam de particular valor como modelo animal de pesquisa, no entendimento dos mecanismos básicos da progressão das doenças bucais, o processo de crescimento normal, assim comO na manutenção da saúde e desenvolvimento de programas preventivos e terapêuticos e especialmente em estudos toxicológicos, teratológicos, cardiovasculares, dentários, assim como na oncologia e gerontologia experimental, imunologia, imunogenética e parasitologia. Apesar de não podermos relacionar diretamente os dados obtidos desses modelos animais para

nós, seres humanos devidos diferenças, porém são úteis e de valor inestimável na compreensão dos mecanismos morfofuncionais (CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE, 1980; AMWAYI, 1993).

Na Teratologia Experimental, o rato apresenta abundantes vantagens, pois tem O ciclo reprodutivo curto e baixa incidência de mal formações espontâneas, e ainda é relativamente resistente a doenças e a procedimentos operatórios. Por isso sua aplicação na teratologia experimental é fundamental (DIEWERT, 1979; McCOY e SHIRLEY, 1992; WALKER, 1971a; BITTENCOURT e BOLOGNESE 2000).

As experiências sofridas pela mãe na infância ou pela manipulação que a mesma tenha recebido quando grávida, podem influenciar no comportamento do animal e também nos resultados dos experimentos teratológicos, conseqüentemente escolheu-se os animais ainda jovens que foram mantidos em condições ideais durante todas as etapas de seu amadurecimento (BEAUDOIN, 1980).

Sabendo-se que a (dexa) é um dos glicocorticóides mais potente que existe, (NANDA et al., 1970; WALKER, 1971b) permitiu-se que o volume de solução administrada aos animais fosse o menor possível, então escolheu-se a (dexa) para estudar-se a sua ação em ratos Holtzman, já que foi bastante usada como método de produção de malformações congênitas em animais (NANDA et al., 1970; WALKER, 1971b; BITTENCOURT e BOLOGNESE, 2000).

A escolha pela (dexa) também foi fundamentada na grande quantidade de indicações clínicas possíveis no ser humano (na Reumatologia, na Neurologia, na Pneumologia, na Alergia, na Endocrinologia, na Hematologia, na Oncologia, na Nefrologia, na Cardiologia, na Dermatologia, na Oftalmologia, a Otorrinolaringologia, na Ortopedia, em Transplantes e na Ginecologia / Obstetrícia), o que torna bastante provável o seu uso durante algum tempo por mulheres sexualmente ativas e com probabilidade de estarem grávidas e assim por uma infelicidade, produzir D.T.N. e conseqüentemente malformações orais em seus bebês já no início das gestações (MELBY, 1974).

As anomalias congênitas do sistema nervoso central, D.T.N. e as hidrocefalias, mesmo que não associadas à aquelas, são as mais freqüentes. A prevalência destas duas condições é muito alta, e constituem causas importantes de morbimortalidade. As crianças com D.T.N. podem apresentar paraplegia, bexiga neurogênica, infecções urinárias, insuficiência renal, hidrocefalia e cifoescoliose, apenas para citar as manifestações mais graves ou freqüentes. As conseqüências das hidrocefalias congênitas não associadas aos DTN são variáveis, dependem diretamente da doença que as gerou e do momento de sua instalação no feto, mas não são menos importantes. Seus portadores têm uma qualidade de vida comprometida por múltiplas complicações e incapacidades, gerando evidentes repercussões a suas famílias e custos elevados para toda a sociedade (GRILLO e SILVA, 2003).

Os corticosteróides podem ser administrados por via oral, parenteral e tópica, por isso, tendo o objetivo de correlacionar os resultados obtidos com o esperado em humanos, optou-se a via intramuscular para a administração da (dexa), já que ela está disponível no comércio sob forma de suspensão injetável.

Em relação à dosagem da (dexa), não podemos esquecer que em teratologia, a dose empregada de teratogênico deve produzir o máximo de malformações com o mínimo de perdas. Os tratamentos agudos produzem maior efeito teratogênico que tratamentos crônicos (BEAUDOIN, 1980). Os valores administrados nos animais foram calculados de acordo com Manual Veterinário de Drogas. Este valor obtido deveria ser utilizado terapeuticamente em um tratamento crônico, logo para obter o máximo de ação no período de tempo curto e conseguir um efeito teratogênico como sendo de tratamento agudo, o valor obtido foi multiplicado por dez (BITTENCOURT e BOLGNESE, 2000).

A administração da (dexa) foi feita entre o 14^{o} e 17^{0} dia de prenhez, coincidindo com a formação do palato secundário constituído pelas cristas palatinas (AMWAYI, 1993; BEAUDOIN, 1980; BITTENCOURT e BOLOGNESE, 2000; DEANGELIS e NALBANDIAN 1968; DIEWERT, 1978; HUGHES et al., 1967; LARSSON, 1962; McCOY e SHIRLEY, 1992; PRATT e KING, 1971; SHAH e TRAVILL, 1975; SHAH, 1989; TAYLOR, 1978; ZEILER et al., 1964).

Os animais cujas mães sofreram aplicação somente da (dexa) apresentaram defeitos de formação nas patas dianteiras e traseiras, também apresentaram alteração no peso médio, no comprimento médio da cabeça e comprimento total médio do embrião e 96,30% destes embriões tiveram a formação de fenda palatina completa, entretanto estas mães conseguiram manter a gestação até o final, não havendo diminuição da prole, resultados semelhantes McCOY e SHIRLEY 1992; LARSSON, 1962 e BITTENCOURT e BOLOGNESE, 2000. Isto prova que os corticosteróides podem atravessar a barreira placentária sem serem metabolizados. Quando administrados em doses farmacológicas em ratas prenhez, uma fração alcança o embrião e parecem funcionar como um agente teratogênico ativo.

Em contrapartida, com o objetivo de diminuir a ação teratogênica da (dexa), lançamos mão do uso de um agente antiteratogênico, bastante estudado, o (A. F.). Este agente atua como protetor durante a formação do tubo neural, diminuindo sensivelmente a ocorrência e recorrência de D.T.N., e conseqüentemente defeitos orais (BIENENGRABER et al. 2001; CZEIZEL e DUDÁS, 1992; CZEIZEL et al., 1996, 1999; ESKES, 1998; GEFRIDES et a., 2002; HANSEN e GRAFTON, 1991; HANSON et al., 1995; HARTRIDGE et al., 1999; ITIKALA et al. 2003, KRAPELS et al. 2004; LOFFREDO et al. 2001; MALEK et al. 2003, 2004; MILUNSKY et al., 1989; NOGUEIRA et al., 2003; PAROS e BECK, 2004; PEER et al.,1958; SCHUBERT e SCHMIDT 2002; TALAROVA e HARRIS, 1995).

Sabendo-se que a concentração de zinco plasmático diminui de 20 a 30%, a partir do terceiro mês de gravidez, quando comparada a valores de mulheres não grávidas e que há a deficiência alimentar de folato entre as mulheres grávidas. A incidência é oito vezes maior em gestações múltiplas, e parece ser aumentada em adolescentes grávidas. Da mesma forma que ocorre com o zinco, a concentração plasmática de (A. F.) cai durante a gravidez, devido à expansão do volume plasmático, e dessa maneira deve-se ser considerada como fisiológica (NOGUEIRA et al., 2003).

Apesar de encontrar o (A. F.) facilmente em vegetais não cozidos, pães, leite, derivados do leite, batata e frutas, a suplementação é muito importante, porque a nossa nutrição diária normal não é ótima e não possui a quantidade mínima necessária de (A. F.). Existem campanhas em muitos países, de suplementação nutricional diária com o consumo de um tablete de 0,5 mg de (A. F.), desde de 4 semanas antes da concepção até 8 semanas depois, em mulheres que estejam planejando gravidez. Nos USA, Irlanda, Alemanha, Austrália, Canadá, China, Hungria, Nova Zelândia, África do Sul e Inglaterra existem campanhas para enriquecimento da alimentação diária com (A. F.) (ESKES, 1998; CZEIZEL et al., 1999).

A via de administração do (A. F.) escolhida foi a gavagem, muito usada em crianças neonatais, que significa “alimentação forçada” e foi feita com agulha própria para o procedimento e especialmente criada para

este projeto, salientando-se que as mesmas também existem no comércio. Usando o mesmo método da (dexa) para a obtenção da dosagem, foi administrado 5 mg/Kg de (A. F.), introduzida na cavidade oral do animal e gentilmente empurrada pelo esôfago até o estômago. Precisou-se tomar muito cuidado para assegurar que a vitamina não tivesse sido introduzido inadvertidamente na traquéia. Este método é utilizado quando se deseja assegurar a quantidade e o momento de ingestão da droga.

A maioria dos pesquisadores recomendam o início da administração do (A. F.) pelo menos 3 meses antes da concepção, indo até o terceiro mês de gestação, quando o tubo neural termina a sua formação (CZEIZEL e DUDÁS, 1992; ESKES, 1998; GEFRIDES et al., 2002; HANSEN et al., 1995; HARTRIDGE et al., 1999; LOFFREDO et al., 2001; MALEK et al., 2003, 2004; MILUNSKY et al., 1989; NOGUEIRA et al., 2003; PEER et al., 1958; SCHUBERT e SCHMIDT, 2002).

Neste trabalho foram definidos três diferentes grupos, nos quais, a dexametasona foi administrada sempre entre o 14º e 17º dia de prenhez, modificando em cada um deles a época de administração do agente antiteratogênico (A. F.), com o objetivo de testar a melhor para a administração do (A. F.). No grupo II administrou-se o (A. F.) conjuntamente com a (dexa) nos quais, a dexametasona foi administrada sempre entre o 14º e 17º dia de prenhez. No grupo III o (A. F.) foi administrado desde o dia zero, de prenhez até o final. Já no quarto grupo

foi iniciado a administração do antiteratogênico 5 dias antes da concepção, e tivemos alguns resultados esclarecedores.

Quando estudou-se mais detalhadamente o comportamento do peso médio e do comprimento médio da cabeça dos embriões, o grupo **IV** foi estatisticamente inferior aos **grupos II e III** e não diferem do **grupo I**, ou seja, o grupo de embriões nascidos de ratas prenhes que receberam a administração somente de (dexa) sem nenhum tratamento com o (A. F.), tiveram o mesmo peso médio e o comprimento médio da cabeça quando comparado ao grupo de embriões nascidos de ratas prenhes que tiveram tratamento com o (A. F.) 5 dias antes da concepção e durante toda a prenhez com a (dexa) sendo administrada somente no período da formação do palato secundário. Portanto a administração do agente antiteratogênico antes e durante toda a prenhez não influenciou de maneira positiva nos pesos e nos comprimentos das cabeças dos embriões.

Em relação ao comprimento total do feto observou-se que o grupo II apresentou valor médio superior a todos os demais, não existindo diferença entre os demais (IV – III, IV – I), deste modo conclue-se que a melhor maneira de administrar o agente antiteratogênico é conjuntamente com a (dexa), ou seja, na época da formação do palato secundário, pois age de maneira eficaz evitando a diminuição e o retardo do crescimento e amadurecimento das estruturas.

Quando se avalia o potencial do (A. F.) em prevenir o aparecimento de fenda palatina teratogenicamente induzida pela (dexa), que é o principal objetivo deste trabalho, somente no grupo II, a ação do (A. F.) foi realmente eficaz, pois neste grupo a quantidade de embriões com ausência de fenda aumentou consideravelmente em 41,67%. Salientando-se que no grupo II, os animais receberam a dexametasona e o (A. F.) entre o 14º e o 17º dia de prenhez. Nossos resultados são discordantes dos resultados da maioria dos pesquisadores, (BIENENGRABER et al., 2001; CZEIZEL e DUDÁS, 1992, CZEIZEL et al., 1999; ESKES, 1998; GEFRIDES et al., 2002; HANSEN e GRAFTON, 1991; HANSEN et al., 1995; HARTRIDGE et al., 1999; KRAPELS et al., 2004; LOFFREDO et al., 2001; MALEK et al., 2003, 2004; MILUNSKY et al., 1989; NOGUEIRA et al., 2003; PAROS e BECK, 1999; PEER et al.,1958; SCHUBERT e SCHMIDT, 2002; TALAROVA e HARRIS, 1995, que recomendam o uso dos antiteratogênicos 3 meses antes da concepção e continuar com o uso durante os 3 primeiros meses de gestação, porém os autores acima referem-se principalmente a formação do tubo neural com pouca referência a deformidades orofaciais.

Em compensação, no grupo III onde os animais receberam (A. F.) durante toda a gestação, e grupo IV com administração do (A. F.) antes e durante a prenhez, a quantidade de embriões com ausência de fenda foi de somente 1 animal (5,88%) e de 4 animais (12,9%) respectivamente. Estes resultados são concordantes com os de Kallen, 2003, que relatou o

uso de (A. F.) e vitamina B_{12} e não encontrou associação ao decréscimo de risco de fendas. Porém quando se trata da diminuição da incidência de mal-formações em humanos por menor que seja, já se trata de um excelente resultado uma vez que uma porcentagem de 5,88% poderá representar um grande diferencial na produção de qualidade de vida.

No humano, os primórdios do Aparelho Branquial e Face já existem no 21ª dia de v.i.u., e conseqüentemente pode-se haver a teratologia induzida. O desenvolvimento da região anterior, o palato primário e o forame incisivo começa no final da 5ª semana. A língua se posiciona interposta nas cristas palatinas ainda verticalizadas no final da 7ª semana, As cristas palatinas horizontalizam-se, crescem e se fundem no final da 10ª semana. As porções mais posteriores (palato mole e úvula) completam a sua formação no final da 20ª semana.

Durante todo o desenvolvimento embrionário ocorre o chamado crescimento diferencial do embrião, que se caracteriza pelo crescimento no sentido horizontal em que todas as estruturas apresentam como resultante da divisão celular, um certo alargamento (extensão) para em seguida ocorrer interrupção e iniciar o crescimento no sentido vertical onde as estruturas crescem após as referidas divisões celulares e se posicionam corretamente próximas à linha mediana.

Quando se considera o desenvolvimento e crescimento do palato duro, aplica-se diretamente o chamado crescimento diferencial: no crescimento horizontal as cristas palatinas estão na posição vertical e a

língua está interposta e recentemente formada. Durante o crescimento vertical, o embrião sofre alongamento (crescimento em altura) acarretando abaixamento da língua permitindo que as cristas palatinas se horizontalizem permitindo que as divisões celulares se movimentem em direção à linha média.

Já nos ratos, o desenvolvimento normal pré-natal do palato acontece assim:

O palato primário é formado entre os dias 11^{o} e 14^{o} de prenhez. No 16^{o} dia a língua ainda não entrou em contato com as projeções palatais. No 17^{o} dia, as projeções palatinas fusionaram-se, separando as cavidades em nasal e oral. No 18^{o} dia, a região palatina estava livre de ninhos epiteliais. No 19^{o} dia, centro ósseo nasofaríngeo situado lateralmente à cavidade nasofaringeana e medialmente ao centro ósseo alveolar estão fusionados, e a formação óssea progrediu em direção à linha média do palato. A aproximação do osso palatino ocorreu no 21^{o} dia. A região da linha média tem a aparência de a sutura e a malha óssea foi separada por acúmulos de células mesenquimais (HUGHES et al., 1967).

A fase embrionária é o palco de um dos mais importantes eventos celulares do desenvolvimento fetal, momento em que as células fazem mitoses para em seguida executarem as informações genéticas contidas em seus núcleos, através da replicação dos cromossomos e duplicação dos genes. Neste momento as células são sensíveis aos agentes teratogênicos que podem afetá-las de modo irrecuperável. Tais agentes

paralisam as atividades celulares no desenvolvimento do neurocrânio e esplancnocrânio. Na palatogênese, evento complexo que freqüentemente é afetado, produz o defeito congênito conhecido como fenda palatina.

Da mesma forma, as cavidades nasais primitivas são separadas da cavidade oral primitiva pelo palato primário. A cavidade nasal e o palato primário são derivados do processo fronto-nasal.

Nesse estágio, o estomódeo apresenta na região anterior as cavidades nasal e oral, separadas entre si pelo palato primário, e na porção posterior ocorre uma grande cavidade atrás do palato primário, assim chamada cavidade oronasal.

Nas porções laterais dessa cavidade nos chamados processos maxilares (1^{o} Arco Branquial) surgem duas pregas laterais posicionadas no sentido vertical, denominadas cristas ou prateleiras palatinas. A língua recentemente formada ocupa todo o espaço dessa cavidade oronasal. É importante salientar que durante a formação das cristas há dois picos de síntese de DNA enquanto as cristas palatinas se formam e durante o alongamento vertical das mesmas.

Com a descida da língua as cristas se movimentam de vertical para horizontal e é necessária uma grande taxa de mitoses e de movimento celular para que essas cristas migrem e se fusionem de maneira correta na linha mediana para formar o palato definitivo. Depois do contato entre elas é necessário que o mesênquima execute o processo de mesodermização a fim de que as células epiteliais de revestimento sejam

fagocitadas permitindo a continuidade mesenquimal tornando o palato secundário horizontal, intacto e íntegro.

Quando ocorre intercorrências, como é o caso de agentes teratogênicos, essas forças intrínsecas não acontecem. (BERKOVITZ et al., 2004)

Antes da formação das cristas palatinas os resultados da exposição pela (dexa) resultam num tecido insuficiente e a falha no contato das cristas palatinas, entretanto no estágio da verticalização das cristas, a (dexa) afeta a elevação e o desenvolvimento das mesmas.

Nossos dados indicam que nos embriões expostos a (dexa) nas doses diárias entre os 14^{o} e o 17^{o} dia de prenhez, os níveis da droga foram suficientes para induzir quase 100% de incidência de fenda que é o resultado na falha das cristas palatinas estabelecerem contato.

Alterações no desenvolvimento do mesênquima e a subseqüente interrupção na elevação das cristas palatinas estão relacionados à exposição da (dexa) neste estágio de desenvolvimento.

A forma pela qual o tratamento com a dexamatasona interfere nos movimentos das projeções palatinas tem sido questionada. Poderia haver uma inibição direta na força intrínseca das projeções ou um aumento na resistência da língua em ser deslocada, porém experimentos realizados mostraram uma reduzida potencialidade no movimento das projeções, mesmo quando a língua foi removida (WALKER e FRASER, 1957).

7 CONCLUSÃO

Enfatizando as condições experimentais específicas deste trabalho e considerando seus resultados e a discussão pertinente, julgou-se válidas as seguintes conclusões:

Conclusão Geral:

1) O ácido fólico é um suplemento vitamínico capaz de diminuir a incidência de fenda palatina em animais cujas mães foram tratadas com dexametasona durante a prenhez.

Conclusões Específicas:

1) A dexametasona possui ação teratogênica formando fendas palatinas completas na grande maioria dos embriões estudados.

2) O ácido fólico induziu a diminuição da incidência de fendas palatinas:

- Pré-prenhez – 12,9%
- Durante a prenhez – 5,8%
- No período entre os dias 14^{o} e 17^{o} de v.i.u. – 41,6%

8 REFERÊNCIAS

- AMWAYI, P. The development of secondary palate: update on concepts and mechanisms. ***East Afr. Med. J.*****,** Nairobi, v. 70, n. 9, p. 558-591, Sept. 1993.

- ASLING, C.W.; WAGENEN, G. A note on development of the secondary palate in the Rhesus Monkey (*Macaca Mulatta*). ***Arch. Oral Biol***., Oxford, v. 12, n. 7, p. 909-910, July 1967.

- BEAUDOIN, A.R. Embryology and teratology**.** In: BAKER, H.J., LINDSEY, J.R., WEISBROTH, S.H. (Ed.). ***The laboratory rat: Research Applications.*** New York: Academic Press, 1980. v.2, p.75-101.

- BERKOVITZ, B.K.B.; HOLLAND, G.R., MOXHAM, B.J. **Anatomia, Embriologia e Histologia Bucal.** 3 ed. Porto Alegre: ARTMED editora S.A., Cap. 18: Desenvolvimento do Palato, 2004.

- BERTHOLET, J.Y. Mating method to produce accurate timed pregnancies in rats. ***Lab. Anim. Sci.***, Joliet, v. 31, n. 2, p.180, 1981.

- BHASKAR, S.N. **Histologia e embriologia oral de Orban**. 10. ed. São Paulo: Artes Médicas, 1989. Cap. 1; p. 1 -25.

- BIENENGRABER, V.; MALEK, A.F.; MORITZ, U.K.; FANGHANEL, J.; GUNDLACH, K.K.H.; WEINGARTNER, J. Is it possible prevent cleft palate by prenatal administration of

folic acid? An experimental study**. *Cleft Palate Craniofac. J.***, Pittsburgh, v. 38, n.4, p.393-398, July, 2001.

- BITTENCOURT, M. A. V.; BOLOGNESE, A. M. Epithelial alterations of secondary palate formation. ***Braz. Dent. J.***, Ribeirão Preto, v. 11, n. 2, p.117-126, Oct. 2000.

- BLANDAU, R.J.; MONEY, W.L. Observations on the rate of transport of spermatozoa in the female genital tract of the rat. ***Anat. Rec***., Philadelphia, v. 90, n. 3, p. 255- 260, Nov. 1944.

- BORDEN, C.S.Jr. Motor enervation of the fetal rat tongue: its development, function and significance in the mechanism of palate closure. ***Am. J. Orthod.***, St. Louis, v. 56, n. 5, p. 531-532, Nov. 1969.

- CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE. **Guide to the care and use of experimental animals.** Ottawa: Canadian Council on Animal Care, 1980.

- CARREIRÃO, S.; LESSA, S.; ZANINI, S. A., ***Tratamento das fissuras lábios palatais.*** 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 1995. p. 13 – 18.

- COHEN, M. M. Syndromes with cleft lip and cleft palate. **Cleft Palate J**., Baltimore, v. 15, n. 4, p. 306-328, Oct. 1978.

- CONWAY, H.; WAGNER, K. J. Congenital anomalies of the head and neck as reported on birth in New York City**, *Plast. Reconstr. Surg***., Baltimore, v. 36, n. 4, p. 71 - 79, April, 1965.

- COOPER, M.E.; STONE, R.A.; LIU, Y.; HU, D.N.; MELNICK, M.; MARAZITA, M.L., Descriptive epidemiology of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in Shangai, China, from 1980 to 1989. ***Cleft Palate Craniofac. J***., Pittsburgh, v. 37, n. 3, p. 274-280, Jan. 2000.

- CZEIZEL, A.E.; DUDÁS, I. Prevention of the first occurence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation**. *N. Engl. J. Med***., Boston, v. 327, n. 26, p 1832-1835, Dec. 1992.

- CZEIZEL, A.E., TOTH, M.; ROCKENBAUER, M. Population-based case control study of folic acid supplementation during pregnancy. ***Teratology***, New York, v. 53, n. 3, p.345 – 351, Aug. 1996.

- CZEIZEL, A. E.; TÍMAR, L.; SARKOZI, A. Dose-dependent effect of folic acid on the prevention of orofacial clefts**. *Pediatrics***, Springfield, v. 104, n. 6, p. 121-129, Dec. 1999.

- DEANGELIS, V.; NALBANDIAN, J. Ultrastructure of mouse and rat palatal processes prior to and during secondary palate formation. ***Arch. Oral Biol.***, Oxford, v. 13, n. 6, p. 601 – 608, Jun. 1968.

- DIEWERT, V.M. Correlation between mandibular retrognathia and induction of cleft palate with 6-aminonicotinamide in the rat. ***Teratology***, New York, v. 19, n. 4, p.213-228, Oct. 1979.

- DIEWERT, V.M. A quantitative coronal plane evaluation of craniofacial growth and spatial relations during secondary

palate development in the rat. ***Arch. Oral Biol.***, Oxford v. 23, n.8, p. 607-629, May 1978.

- DIEWERT, V. M.; PRATT, R.M. Cortisone-induced cleft palate in mice: failure of palatal shelf contact. ***Teratology***, Philadelphia, v.24, n.2, p. 149-162, Oct. 1981.

- DRILLIEN, C. M.; INGRAM, T. T. S.; WILKINSON, E. M. ***The causes and natural history of cleft lip and palate.*** Baltimore: Williams & Wilkins, 1966.

- ESKES, K.A.B. Open or closed. ***Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol***., Amsterdam, v.78, n. 2, p.169-177, Jun. 1998.

- FERGUSON, M. W. J. The mechanism of palatal shelf elevation and the pathogenesis of cleft palate. **Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histol**., Berlin, v. 375, n.2, p. 97-113, Aug. 1977.

- GEFRIDES, L. A.; BENNET, G. D.; FINNELL, R. H. Effects of folate supplementation on the risk of spontaneous and induced neural tube defects in splotch mice. ***Teratology***, New York, v. 65, n. 1, p. 63-69, Feb. 2002.

- GOSS, A. N. Human Palatal Development. In Vitro. ***Cleft Palate J***., Baltimore, v. 12, n. 2, p. 210 – 221, Mar. 1975.

- GRILLO, E.; SILVA, R. Neural tube defects and congenital hydrocephalus: Why is prevalence important?. ***J. Pediatr.***, St. Louis, vol. 79, n. 2, p.105-106, Mar./Apr. 2003.

- HABIB, Z. Factors determining occurrence of cleft lip and cleft palate. **Surg. Gynecol. Obstet.**, Chicago, v. 146, n.1, p. 105-110, Jan. 1978.

- HANSEN, D. K.; GRAFTON, T. F. Lack of attenuation of valproic acid-induced effects by folinic acid in rat embryos in vitro. ***Teratology***, New York, v. 43, n. 4, p.575-582, Jun. 1991.

- HANSEN, D. K.; GRAFTON, T. F.; DIAL, S. L.; GERHING, T. A.; SIITONEN, P. H. Effect of supplemental folic acid on valpróico acid-induced embryotoxocity and tissue zinc levels in vivo. ***Teratology***, New York, v. 52, n. 2, p.277-285, Mar. 1995.

- HARTRIDGE, T.; ILLING, H. M.; SANDY, J. R., The role of folic acid in oral clefting. ***Br. J. Orthod.,*** London v. 26, n. 2, p. 115 – 120, Jun. 1999.

- HAYNES, R. C. J. ***Hormônio adrenocorticotrópico; esteróides córtico-supre-renais e seus análogos sintéticos; inibidores da síntese e ações dos hormônios córtico-supra-renais.*** In: GILMAN, A. G.; RALL, T. W.; NIES, A. S., (Ed.) Goodman e Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p. 951-972.

- HUGHES, L.V.; FURSTMAN, L.; BERNICK, S. Prenatal development of the rat palate. ***J. Dent. Res***., Chicago, v. 46, n. 2, p. 373 – 379, Mar./ Apr. 1967.

- HUMPHREY, T. Development of oral and facial motor mechanisms in human fetuses and their relation to craniofacial

growth. ***J. Dent. Res.,*** Chicago, v. 50, n. 6, p.1428 – 1441, nov./dec. 1971.

- INGALLS, T. H.; TAUBE, I.; KLINGBERG, M. A. Cleft lip and cleft palate: epidemiologic considerations. ***Plast. Reconstr. Surg*.,** Baltimore, v. 34, n.1, p.1-10, July 1964.

- ITIKALA, P.R.; WATKINS, M.L.; MULINARE, J.; MOORE, C.A.; LIU, Y. Maternal multivitamin use and orofacial clefts in offspring. ***Teratology***, New York, v. 63, n. 1, p. 79 – 86, Jan. 2001.

- KALLEN, B. Maternal drug use and infant cleft lip / palate with special reference to corticoids**.** ***Cleft Palate-Craniofac. J.,*** Pittsburgh, v. 40, n. 6, p. 624-628, Nov. 2003.

- KALTER, H. The inherence of susceptibility to the teratogenic action of cortisone in mice. ***Genetics***, Lancaster, v. 39, n. 2, p.185-196, mar. 1954.

- KITAMURA, H. Evidence for cleft palate as a post fusion phenomenon. ***Cleft Palate Craniofac. J.,*** Pittsburgh, v. 28, n. 2, p. 195-211, April. 1991.

- KJAER, I. Human prenatal palatal shelf elevation related to craniofacial skeletal maturation. ***Eur. J. Orthod***., Oxford, v. 14, n.1, p. 26-30, Feb. 1992.

- KRAPELS, I. P. C.; VAN ROOIJ, I. A. L. M.; OCKÉ, M. C.; WEST, C. E.; VAN DER HORST, C. M. A. M.; STEEGERS-THEUNISSEN, R. P. M., Maternal nutritional status and the

risk for orofacial cleft offspring in humans. **J. *Nutr.***, Philadelphia, v. 134, n. 11, p. 3106-3113, Nov. 2004.

- LARSSON, K. S. Studies on the closure of the secondary palate – attempts to study the teratogenic action of cortisone in mice, ***Acta Odontol. Scand***., Stockholm, v. 20, n. 1, p. 01 - 13, Feb. 1962.

- LEITE, I. C. G.; PAUNGARTEN, F. J. R.; KOIFMAN, S. Chemical exposure during pregnancy and oral clefts in newborns. ***Cad. Saúde Pública***, Rio de Janeiro, v. 18, n. 1, p.17 – 31, Jan. – Fev. 2002.

- LOFFREDO, L.C.M.; SOUZA, J.M.P.; FREITAS, J.A.S.; MOSSEY, P.A.. Oral clefts and vitamin supplementation. ***Cleft Palate Craniofac. J.,*** Pittsburgh, v. 38, n.1, p.76-83, Jan. 2001.

- MALEK, F.A.; MÖRITZ, K.U.; FANGHÄNEL, J.; BIENENGRÄBER, V. Reduction of procarbazina-induced cleft palates by prenatal folic acid supplementation in rats**. *Pathol. Res. Pract.,*** Sttutgart, v. 200, n. 1, p.33-40, Jan. 2004.

- MALEK, F. A.; MORITZ, K. U.; FANGHANEL, J.; BIENENGRABER, V. Sex-related differences in procarbazina – induced cleft palate and microgenia and the anti-teratogenic effect of prenatal folic acid supplementation in rats. ***Anat. Anz.***, Jena, v. 185, n. 5, p. 465 – 470, Oct. 2003.

- MAZAHERI, M., Statistical analysis of patients with congenital cleft lip and/or palate at the lancaster cleft palate clinic. ***Plast.***

Reconstr. Surg., Baltimore, v. 21, n. 2, p. 193 - 203, Feb. 1958.

- McCOY, S.J.; SHIRLEY, B.A. Effects of prenatal administration of testosterone and cortisone on the reproductive system of the female rat. ***Life Sci***., Oxford, v. 50, n. 9, p. 621-628, July 1992.

- McEVITT, W. G. Cleft lip and palate and parental age: a statistical study of etiology. ***Plast. Reconstr. Surg***., Baltimore, v. 10, n. 1, p.77-82, Jan. 1952.

- MELBY, J. C. Systemic corticosteroid therapy, pharmacology and endocrinologic considerations. ***Ann. Intern. Med***., Philadelphia, v. 81, n. 5 , p. 505-512, Sep. 1974.

- MELSEN, B. Palatal growth studied on human autopsy material. ***Am. J. Orthod***., St. Louis, v. 68, n. 1, p. 42 – 54, July 1975.

- MILUNSKY, A.; HERSHEL, J.; JICK, S. S.; BRUEL, C. L.; MACLAUGHLIN, D. S.; ROTHMAN, K. J.; WILLET, W. Multivitamin/folic acid supplementation in early pregnancy reduces the prevalence of neural tube defects. ***JAMA,*** Chicago***,*** v. 262, n. 20, p.2847-2852, May 1989.

- MOORE, K. L., ***Embriologia clínica.***; 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1986. p.170.

- NAGEN FILHO, H.; MORAES, N.; FLAQUER, R.G. Contribuição para o estudo da prevalência das más formações congênitas lábio-palatais na população escolar da bauru. ***Rev. Fac. Odontol. São Paulo***, São Paulo, v. 6,n.2,p.111-128, abr./jun. 1968.

- NANDA, R.; VAN DER LINDEN, F. P. G. M.; JANSEN, H. W. B. Production of cleft palate with dexamethasone and hypervitaminosis A. ***Experientia,*** *Basel*, v. 26, n. 10, p. 1111 – 1112, Oct. 1970.

- NOGUEIRA, N. N.; PARENTE, J. V.; COZZOLINO, S. M. F.. Mudanças na concentração plasmática de zinco e ácido fólico em adolescentes grávidas submetidas a diferentes esquemas de suplementação**.** ***Cad.Saúde Pública***, Rio de Janeiro, v. 19, n. 1, p.155-160, jan./fev., 2003.

- PAROS, A.; BECK, S.L., Folinic acid reduces cleft lip (CL(P)) in A/WySn mice. ***Teratology***, New York, v. 60, n. 3, p. 344-347, Mar. 1999.

- PEER, L. A.; BRYAN, W. H.; STREAN, L. P.; WALKER, J. C.; BERNHARD, W. G.; PECK, G. C. Induction of cleft palate in mice by cortisone and its reduction by vitamins. ***J. Int. Coll. Surg***., Chicago, v. 20, n. 2, p.249-254, Mar. 1958.

- PRATT, R. M.; KING, C. T. G. Collagen synthesis in the secondary palate of the developing rat. ***Arch. Oral Biol***., Oxford, v.16, n.10 p.1181-1185, Oct. 1971.

- PROFFIT, W.R.; FIELDS, H. W. ***Ortodontia contemporânea***, 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995, cap. 3, pág. 53-55.

- RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. ***Farmacologia***. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 703p.

- REED, S. C. An embryological study of harelip in mice. ***Anat. Rec***., New York, v. 56, n. 2, p. 168- 173, May, 1933.

- RODRIGUEZ-PINILLA, E.; MARTINEZ-FRIAS, M. L. Corticosteroids during pregnancy and oral clefts: a case-control study. ***Teratology***, New York, v. 58, n. 1, p.2-5, Jan. 1998.

- SATO, M.; SHIROTA, M.; NAGAO, T. Pantothenic acid decreases valpróico acid-Induced neural tube defects in mice (I). ***Teratology***, New York, v. 52, n. 2, p.143-148, Mar. 1995.

- SAXÉN,I. Cleft lip and palate in finland: parental histories, course of pregnancy and selected environmental factors. ***Int. J. Epidemiol***., London, v. 3, n.3, p. 263-270, Sep. 1974.

- SCHUBERT, J.; SCHMIDT R. B Group vitamins and cleft lip and cleft palate. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg**., Wittenberg, v. 31, n. 4, p. 410-413, Aug. 2002.

- SCOTT, J.H. The embryology of cleft palate and hare lip. ***Br. Dent. J.,*** London, v. 120, n.1, p. 17-20, Jan. 1966.

- SHAH, R. M. Cellular reactions during drug-induced cleft palate. ***J. Craniofac. Genet. Dev. Biol.***, New York, v. 2, n. 3, p.277-283, Oct./dec. 1986.

- SHAH, R. M.; TRAVILL, A. A. Morphogenesis of the secondary palate in normal and hydrocortisone-treated hamsters. ***Teratology***, New York, v. 13, n. 1, p.71-84, Jan. 1975.

- SHAH, R. M.; TRAVILL, A. A. The teratogenic effects of hydrocortisone on palatal development in the hamster. ***J. Embryol. Exp. Morphol***., London, v. 35, n. 1, p. 213 – 224, Feb. 1976.

- SHAH, R. M.; CHEN, Y. P.; BURDETT, D. N. Growth of the secondary palate in the hamster following hydrocortisone treatment: shelf area, cell number, and DNA synthesis. ***Teratology***, New York, v.40, n. 2, p. 173-180, Mar. 1989.

- SHIN, J. H.; SHIOTA, K. Folic acid supplementation of pregnant mice suppresses heat-induced neural tube defects in the offspring. ***J. Nutr.***, Philadelphia, v. 129, n. 11, p. 2070 – 2073, Nov. 1999.

- SMILEY, G.; DIXON, A. Fine structure of midline epithelium in the developing palate of the mouse. ***Anat. Rec.***, Philadelphia, v. 161, n. 3, p. 293-310, July 1968.

- SMILEY, G.R. A possible gênesis for cleft palate formation. ***Plast. Reconstr. Surg.***, Baltimore, v.50, n.4, p. 390-394, Oct. 1972.

- STREAN, L. P.; PEER, L. A., Stress as an etiologic factor in the development of cleft palate. ***Plast. Reconstr. Surg.***, Baltimore, v. 18, n. 1, p. 1 – 7, Jan. 1956.

- TALAROVA, M.; HARRIS, J. Reduced recurrence of orofacial clefts after preconception supplementation with high-dose folic acid and multivitamins. ***Teratology***, New York, v. 51, n. 1, p.71-78, Jan. 1995.

- TAYLOR, R. G. Craniofacial growth during closure of the secondary palate in the hamster. ***J. Anat.***, London, v. 125, n. 2, p. 361-370, Dec. 1978.

- TEN CATE, A. R. ***Oral histology*****:** development, structure, and function**.** 4th ed. St. Louis: Mosby, 1994.

- TÖNDURY, G. Concerning the development of the human face. the genesis of lip, maxillary and palatine clefts. ***Int. Dent. J***., London, v. 8, n. 3, p. 496 – 511, June 1958.

- WALKER, B. E. Induction of cleft palate in rats with antiinflamatory drugs. ***Teratology***, Philadelphia, v.4, n.1, p.39-42, Feb. 1971a.

- WALKER, B. E. Palate morphogenesis in the rabbit. ***Arch. Oral Biol*****.**, Oxford v. 16, n. 2, p. 275-286, Feb. 1971b.

- WALKER, B. E.; FRASER, F. C. The embryology of cortisone-induced cleft palate**.** ***J. Embryol. Exp. Morph*****.,** London, v. 5, n. 2, p. 201 – 209, June. 1957.

- WALKER, B. E.; PATTERSON, A. Palate development after fetal tongue removal in cortisone-treated mice. ***Teratology***, New York, v.17, n.1, p. 51-56, Jan. 1978.

- WATANABE, T.; ENDO, A. Sex difference in digit and palate formation of mouse embryos at midge station. ***Teratology***, New York, v. 40, n. 3, p.359-364, May 1989.

- WEINGARTNER, J.; MARTENS, A.; BIENENGRABER, V.; FANGHANEL, J.; KUNDT, G. Do folic acid and thiocyanate

have a preventive effect on exogenously induced disturbances of embryonic cranial development? ***Clin. Oral Investig,*** Berlin**,** v. 8, n. 2, p. 161-164, June 2004.

- WHITTEN, W. K. Modification of the estrous cycle of the mouse by external stimuli associated with the male. ***J. Endocrin***., Chicago, v.13, n. 3, p. 399-404, Sep. 1956.

- YONEDA, T.; PRATT, R. M. Vitamin B6 reduces cortisone-induced cleft palate in the mouse. ***Teratology***, New York, v. 26, n. 3, p. 255-258, May 1982.

- YOUNG, A.; FEELEY, E.; SHAH, R. M. Does the tongue play a role in the initial development of the vertical palatal shelf in hamster? ***J. Craniofac. Gen. Dev. Biol.,*** New York**,** v.11, n. 2, p.146-155, Mar./apr. 1991.

- ZEILER, K. B.; WEISNTEIN, S.; GIBSON, R. D. A study of the morphology and the time of closure of the palate in the albino rat. ***Arch. Oral Biol***., Oxford, v. 9, n. 5, p. 545-554, May 1964.

ANEXO 1 – Aprovação do Comitê de Ética

GUARIZA FILHO, O. **Avaliação do potencial do Ácido Fólico em prevenir o aparecimento de fenda palatina teratogenicamente induzida pela Dexametasona em ratos.** 2006. ???f. Tese (Doutorado em Ortodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi elucidar os mecanismos do Ácido Fólico em prevenir o aparecimento de fenda palatina teratogenicamente induzida pela (dexamatasona) em ratos. Para tanto, foram usadas um total de 13 ratas do tipo Holtzman. G1) 3 ratas receberam 3mg/Kg Dex. Intramuscular (i.m.) do 14^{o} ao 17^{o} dia de prenhez. G2) 4 ratas receberam 3mg/Kg Dexa (i.m.) do 14^{o} ao 17^{o} dia de prenhez, e uma dose de 5mg/kg de ácido fólico (via oral) do dia 14^{o} até 17^{o} de prenhez. G3) 3 ratas receberam 3mg/Kg Dexa (i.m.) do 14^{o} ao 17^{o} dia de gravidez e uma dose de 5mg/kg de ácido fólico (via oral) do início até o final da prenhez. G4) 3 ratas receberam 3mg/Kg Dex (i.m.) do 14^{o} ao 17^{o} dia de prenhez e uma dose de 5mg/kg de ácido fólico (via oral) desde 5 dias antes da concepção até o final da gravidez. As cabeças dos fetos foram removidas no 19^{o} dia de prenhez e estudadas. Foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. O resultados mostraram o seguinte: G1) dos 27 fetos, (96,30%) apresentaram fenda total, e apenas 1 apresentou fenda parcial. G2) Dos 23 fetos apenas (8,7%) com fenda total, (43,35%) com ausência de fenda e (47,80%) apresentaram fenda parcial. G3) Observou-se 88,24% apresentaram fenda incompleta, 5,88% apresentaram fenda completa e 5,88% ausência de fenda. G4) dos 31 animais, (54,4%) apresentaram fenda incompleta, e 32,26% apresentaram fenda completa e (12,9%) sem fenda.

Palavras – chave: Fenda Palatina, Dexametasona, Ácido Fólico.

GUARIZA FILHO, O. **Does Folic Acid have a Preventive Effect on Dexamethasone-Induced Cleft Palate Mice?** 2006. ???f. Tese (Doutorado em Ortodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

ABSTRACT

The aim of the present study is to determine whether (FA) prevented cortisone-induced cleft palate (CP) in the *Holtzman* mouse. The animals were divided in 4 groups: G1- 3 pregnant mice had 3mg/Kg of Dex intramuscularly administrated (IA) from the 14th to 17th day of gestation; G2- 4 pregnant mice had 3mg/Kg of Dex IA from the 14th to 17th day of gestation, with a daily dose (dd) of 5mg/kg FA oral administrated (OA) from 14th to 17th day of gestation; G3- 3 pregnant mice had 3mg/Kg of Dex IA from the 14th to 17th day of gestation, with a (dd) of 5mg/kg FA OA from day 0 until 17th day of gestation; G4- 3 pregnant mice had 3mg/Kg of Dex IA from 14th to 17th day of gestation, with a (dd) of 5mg/kg FA OA 5 days before the fertilization until the 17th day of gestation. The fetuses were examined on 19th day of gestation. The data was analyzed by not paired Kruskal-Wallis test, and showed statistical difference among average score values. The results demonstrated that (96,3%) (G1) had total CP, and only 1 partial CP. In the (G2), (8,7%) showed total CP, (47,8%) partial CP and (43,35%) showed no CP. The (G3) showed (5,88%) had total CP, (88,24%) partial CP and (5,88%) had no CP. In the (G4), (54,4%) showed partial CP and (32,26%) total CP. Only (12,9%) had no CP. These results indicated that FA reduces the incidence of Dex-induced cleft palate independently on the period of the administration.

Keywords: Cleft Palate, Dexamethasone, Folic Acid.

Autorizo a reprodução deste trabalho.

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, outubro de 2006.

ODILON GUARIZA FILHO